

В.В. Зверева, М.Н. Бойченко

**Микробиология,
вирусология руководство к
практическим занятиям**

Год издания 2017

Библиография Микробиология, вирусология: руководство к практическим занятиям [Электронный ресурс] : учеб. пособие / Зверев В.В. [и др.]; под ред. В.В. Зверева, М.Н. Бойченко - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2017. - <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970440063.html>

Авторы Зверев В.В. [и др.]; под ред. В.В. Зверева, М.Н. Бойченко

Издательство ГЭОТАР-Медиа

Год издания 2017

Прототип Электронное издание на основе: Микробиология, вирусология : руководство к практическим занятиям : учеб. пособие / Зверев В. В. [и др.] ; под ред. В.В. Зверева, М. Н. Бойченко. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2017. - 360 с. : ил. - ISBN 978-5-9704-4006-3.

Аннотация

Учебное пособие состоит из 21 модуля и приложения. Модули 1-10 включают материал общего курса микробиологии, где рассмотрены основные методы микробиологических исследований. Модули 11-21 посвящены диагностике инфекционных заболеваний, материал в них дан по эпидемическому принципу. При изложении методов диагностики инфекционных заболеваний учтены госстандарты и рекомендации ВОЗ. В приложении приведены прописи питательных сред и ответы на вопросы для самоконтроля. Предназначено для студентов, обучающихся по специальности "Лечебное дело", а также может быть полезно студентам других специальностей высших медицинских учебных заведений в качестве дополнительного материала.

Оглавление

АВТОРСКИЙ КОЛЛЕКТИВ	7
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	7
ЧАСТЬ I. ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОБИОЛОГИИ И ВИРУСОЛОГИИ.....	10
МОДУЛЬ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ И ВИРУСОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИЙ	10
1.1. ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ И ВИРУСОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИЙ	10
1.2. ОСНАЩЕНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРИЙ	11
1.3. ПРАВИЛА РАБОТЫ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ	12
МОДУЛЬ 2. МИР, КЛАССИФИКАЦИЯ И ПРИНЦИПЫ ТАКСОНОМИИ МИКРООРГАНИЗМОВ	13
2.1. МИР, КЛАССИФИКАЦИЯ И ПРИНЦИПЫ ТАКСОНОМИИ МИКРООРГАНИЗМОВ	13
2.2. СТРУКТУРА БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ. ПРОСТЫЕ И СЛОЖНЫЕ МЕТОДЫ ОКРАСКИ БАКТЕРИЙ	14
2.3. МОРФОЛОГИЯ ГРИБОВ. ПРИНЦИПЫ КЛАССИФИКАЦИИ ГРИБОВ И МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ИХ МОРФОЛОГИИ	29
2.4. МОРФОЛОГИЯ И ПРИНЦИПЫ КЛАССИФИКАЦИИ ПРОСТЕЙШИХ	31
2.5. МОРФОЛОГИЯ ВИРУСОВ. ПРИНЦИПЫ КЛАССИФИКАЦИИ И МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ МОРФОЛОГИИ ВИРУСОВ	32
2.6. МЕТОДЫ МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ. ТЕХНИКА СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ С МАСЛЯНОЙ ИММЕРСИЕЙ.....	34
МОДУЛЬ 3. ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ.....	38
3.1. УСЛОВИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БАКТЕРИЙ.....	38
3.2. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ	39
3.3. МЕТОДЫ ПОСЕВОВ НА ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ.....	43
3.4. ФЕРМЕНТЫ БАКТЕРИЙ. ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ СРЕДЫ.....	45
3.5. ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ БАКТЕРИЙ	54
3.6. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ АНАЭРОБОВ	56
МОДУЛЬ 4. БАКТЕРИОФАГИ. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	59
4.1. БАКТЕРИОФАГИ	59
4.2. МЕТОДЫ ВНУТРИВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ (ЭПИДЕМИЧЕСКОГО МАРКИРОВАНИЯ)	60
4.3. МЕТОДЫ ОБНАРУЖЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ БЕЗ ВЫДЕЛЕНИЯ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ .	64
МОДУЛЬ 5. МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ, ИНДИКАЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИРУСОВ	70

5.1. МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВИРУСОВ	70
5.2. МЕТОДЫ ИНДИКАЦИИ ВИРУСОВ	72
МОДУЛЬ 6. ЭКОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ. РАСПРОСТРАНЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ. САНИТАРНО-ПОКАЗАТЕЛЬНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ, ИХ ОБНАРУЖЕНИЕ	76
6.1. САНИТАРНО-БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОДЫ, ПОЧВЫ И ВОЗДУХА	76
6.2. МЕТОДЫ САНИТАРНО-БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ВОДЫ И ВОЗДУХА	79
6.3. МИКРОФЛОРА ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА	80
6.4. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРОФЛОРЫ ТЕЛА ЧЕЛОВЕКА	83
МОДУЛЬ 7. ДЕЙСТВИЕ НА МИКРООРГАНИЗМЫ ФИЗИЧЕСКИХ И ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ. АНТИБИОТИКИ.....	90
7.1. ПОНЯТИЕ О СТЕРИЛИЗАЦИИ И ДЕЗИНФЕКЦИИ	91
7.2. ПОНЯТИЕ ОБ АСЕПТИКЕ И АНТИСЕПТИКЕ. МЕТОДЫ АСЕПТИКИ И АНТИСЕПТИКИ.....	93
7.3. САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СМЫВОВ С РУК ПЕРСОНАЛА И ПОВЕРХНОСТЕЙ ПРЕДМЕТОВ	94
7.4. АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ ХИМИОПРЕПАРАТЫ	95
Модуль 8. УЧЕНИЕ ОБ ИНФЕКЦИИ. ИНФЕКЦИОННЫЙ ПРОЦЕСС. СВОЙСТВА ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ. БИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ.....	102
8.1. ПОНЯТИЕ ОБ ИНФЕКЦИОННОМ ПРОЦЕССЕ И ИНФЕКЦИОННОМ ЗАБОЛЕВАНИИ. ФОРМЫ ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА	102
8.2. ПОНЯТИЕ О ПАТОГЕННОСТИ И ВИРУЛЕНТНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ	103
8.3. БИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ	106
МОДУЛЬ 9. СЕРОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ В ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ.....	107
9.1. РЕАКЦИИ ИММУНИТЕТА	107
9.2. РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ	109
9.3. РЕАКЦИЯ КУМБСА.....	113
9.4. РЕАКЦИЯ ПАССИВНОЙ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ	113
9.5. РЕАКЦИЯ ПРЕЦИПИТАЦИИ	117
9.7. РЕАКЦИЯ СВЯЗЫВАНИЯ КОМПЛЕМЕНТА.....	122
9.8. РЕАКЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕЧЕНЫХ АНТИТЕЛ ИЛИ АНТИГЕНОВ	125
9.9. РЕАКЦИЯ ТОРМОЖЕНИЯ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ	143
9.10. РЕАКЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ	146
МОДУЛЬ 10. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ.....	149
10.1. МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ	149

ЧАСТЬ II. ЧАСТНАЯ МЕДИЦИНСКАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ	155
МОДУЛЬ 11. ВОЗБУДИТЕЛИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ: ОСНОВНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, ПРИНЦИПЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ	155
11.1. ДИАГНОСТИКА ОСТРЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ.....	155
11.2. ДИАГНОСТИКА ХОЛЕРЫ	168
11.3. ДИАГНОСТИКА ИЕРСИНИОЗОВ	171
11.4. ДИАГНОСТИКА КАМПИЛОБАКТЕРИОЗА.....	172
11.5. ДИАГНОСТИКА ХЕЛИКОБАКТЕР-ИНФЕКЦИИ.....	174
11.6. ДИАГНОСТИКА ЛЕПТОСПИРОЗА	175
11.7. ДИАГНОСТИКА ЛИСТЕРИОЗА.....	175
11.8. ДИАГНОСТИКА БОТУЛИЗМА	176
МОДУЛЬ 12. ВОЗБУДИТЕЛИ РЕСПИРАТОРНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ: ОСНОВНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, ПРИНЦИПЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ	178
12.1. ДИАГНОСТИКА СПЕЦИФИЧЕСКИХ ИНФЕКЦИЙ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ	179
12.2. ДИАГНОСТИКА НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ИНФЕКЦИЙ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ	194
12.3. ДИАГНОСТИКА ЛЕГИОНЕЛЛЕЗОВ И АТИПИЧНЫХ ПНЕВМОНИЙ	197
МОДУЛЬ 13. ВОЗБУДИТЕЛИ РАНЕВОЙ ИНФЕКЦИИ: ОСНОВНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, ПРИНЦИПЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ	200
13.1. ДИАГНОСТИКА РАНЕВОЙ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ КИСЛОРОДОРЕЗИСТЕНТНЫМИ БАКТЕРИЯМИ	201
13.2. ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗВАННЫХ НЕСПОРООБРАЗУЮЩИМИ АНАЭРОБНЫМИ БАКТЕРИЯМИ	206
13.3. ДИАГНОСТИКА КЛОСТРИДИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ.....	207
МОДУЛЬ 14. ВОЗБУДИТЕЛИ ЗООНОЗНЫХ ИНФЕКЦИЙ (ЧУМЫ, ТУЛЯРЕМИИ, СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ): ОСНОВНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, ПРИНЦИПЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ	210
14.1. ДИАГНОСТИКА ЧУМЫ.....	210
14.2. ДИАГНОСТИКА ТУЛЯРЕМИИ	212
14.3. ДИАГНОСТИКА СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ.....	213
14.4. ДИАГНОСТИКА БРУЦЕЛЛЕЗА.....	217
МОДУЛЬ 15. ВОЗБУДИТЕЛИ ИНФЕКЦИЙ МОЧЕПОЛОВОЙ СИСТЕМЫ: ОСНОВНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, ПРИНЦИПЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ	220
15.1. ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИЙ МОЧЕВЫВОДЯЩЕЙ СИСТЕМЫ.....	221
15.2. ДИАГНОСТИКА БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ, ПЕРЕДАВАЕМЫХ ПОЛОВЫМ ПУТЕМ.....	223
МОДУЛЬ 16. ВОЗБУДИТЕЛИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КРОВЯНЫХ ИНФЕКЦИЙ: ОСНОВНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, ПРИНЦИПЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ	232
16.1. ДИАГНОСТИКА РИККЕТСИОЗОВ	232
16.2. ДИАГНОСТИКА БОРРЕЛИОЗОВ	234

МОДУЛЬ 17. ВОЗБУДИТЕЛИ РЕСПИРАТОРНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ: ОСНОВНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, ПРИНЦИПЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ	237
17.1. ДИАГНОСТИКА ГРИППА.....	237
17.2. ДИАГНОСТИКА КРАСНУХИ.....	240
17.3. ДИАГНОСТИКА НАТУРАЛЬНОЙ ОСПЫ	243
МОДУЛЬ 18. ВОЗБУДИТЕЛИ ПОЛИОМИЕЛИТА: ОСНОВНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, ПРИНЦИПЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ	246
18.1. СБОР ПРОБ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ВИРУСА	246
18.2. ВЫДЕЛЕНИЕ ПОЛИОВИРУСА ИЗ КЛИНИЧЕСКИХ ПРОБ.....	247
18.3. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВЫДЕЛЕННОГО ПОЛИОВИРУСА	247
18.4. СЕРОКОНВЕРСИЯ.....	248
МОДУЛЬ 19. ВОЗБУДИТЕЛИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ: ОСНОВНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, ПРИНЦИПЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ	248
МОДУЛЬ 20. ВОЗБУДИТЕЛИ ВИРУСНЫХ ГЕПАТИТОВ: ОСНОВНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, ПРИНЦИПЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ	253
20.1. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА В.....	254
20.2. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА D	256
20.3. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА С.....	256
20.4. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА А	257
20.5. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА Е.....	257
МОДУЛЬ 21. ВОЗБУДИТЕЛИ НЕЙРОВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ: ОСНОВНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, ПРИНЦИПЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ	258
21.1. ВИРУС КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА: ОСНОВНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, ПРИНЦИПЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ.....	258
21.2. БЕШЕНСТВО	261
ПРОПИСИ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД.....	264
ОТВЕТЫ НА ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ.....	267
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	269

АВТОРСКИЙ КОЛЛЕКТИВ

Зверев В.В. - д-р мед. наук, проф., акад. РАН, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России

Бойченко М.Н. - д-р биол. наук, проф. кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России

Несвижский Ю.В. - д-р мед. наук, проф. кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России

Богданова Е.А. - канд. мед. наук, доц. кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России

Буданова Е.В. - канд. мед. наук, доц. кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России

Карамзин А.М. - канд. биол. наук, доц. кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России

Кравцова Е.О. - канд. мед. наук, доц. кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России

Усатова Г.Н. - канд. мед. наук, доц. кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АБП - антибактериальные препараты

АТФ - аденозинтрифосфат

ВДД - вирусный гепатит D

ВГА - вирусный гепатит A

ВГВ - вирусный гепатит B

ВГЕ - вирусный гепатит E

ВГС - вирусный гепатит C

ВИЧ - вирус иммунодефицита человека

ВДД - внутритиповая дифференциация

ГАЕ - гемагглютинирующие единицы

ГЖХ - газожидкостная хроматография

ГСЭН - Госсанэпиднадзор

ЖКТ - желудочно-кишечный тракт

ЖСА - желточно-солевой агар

ИА - индекс avidности

ИБ - иммуноблоттинг

ИППП - инфекции, передаваемые половым путем
ИФА - иммуноферментный анализ
ИХА - иммунохроматографический анализ
ИЭМ - иммуноэлектронная микроскопия
КОЕ - колониеобразующие единицы
КП - калибровочные пробы
КПЛ - клещевая пятнистая лихорадка
КСР - комплекс серологических реакций
КУА - казеиново-угольный агар
КЭ - клещевой энцефалит
ЛОС - липоолигосахарид
ЛПУ - лечебно-профилактические учреждения
ЛС - лекарственные средства
ЛЦР - лигазная цепная реакция
МБС - микроскоп бинокулярный стереоскопический
МПА - мясопептонный агар
МПБ - мясопептонный бульон
МПК - минимальная подавляющая концентрация
МУ - методические указания
ОВП - острый вялый паралич
ОКИ - острые кишечные инфекции
ОМЧ - общее микробное число
ОП - оптическая плотность
ОРИД - реакции одиночной радиальной иммунодиффузии
ОТ-ПЦР - полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
ПАВ - поверхностно-активные вещества
ПКПЭ - прогрессирующий краснушный панэнцефалит
ПЦР - полимеразная цепная реакция
ПЭС - почки эмбриона свиньи
РА - реакция агглютинации
РАР - реакции агглютинации риккетсий
РБН - реакция биологической нейтрализации
РГА - реакция гемагглютинации
РГАд - реакция гемадсорбции
РИА - радиоиммунологический анализ
РИФ - реакция иммунофлюоресценции
РН - реакция нейтрализации
РНГА - реакция непрямой гемагглютинации
РП - реакция преципитации

РПГА - реакция пассивной гемагглютинации
РСК - реакция связывания комплемента
РТ - ретикулярные тельца
РТГА - реакция торможения гемагглютинации
РТНГА - реакция торможения непрямой гемагглютинации
СанПиН - санитарные правила и нормы
СПИД - синдром приобретенного иммунодефицита
СПМ - санитарно-показательные микроорганизмы
ТОА - транскрипционно-опосредованная амплификация
ТМБ - тетраметилбензидин
ФИТЦ - флуоресцеин изотиоцианат
ФЭК - фотоэлектроколориметр
ЦНИЛ - центральная научно-исследовательская лаборатория
ЦНС - центральная нервная система
ЦПД - цитопатогенное действие
ЦПЭ - цитопатический эффект
ЭТ - элементарные тельца
АТК (*Alt Tuberculin Koch*) - старый туберкулин Коха
DCL - абсолютная смертельная доза
DIM - минимальная смертельная доза
LD₅₀ - полуметальная доза

ЧАСТЬ I. ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОБИОЛОГИИ И ВИРУСОЛОГИИ

МОДУЛЬ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ И ВИРУСОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИЙ

Цели модуля

- Знать: структуру микробиологических лабораторий в соответствии с делением микроорганизмов на группы по степени биологической опасности.
- Уметь: организовывать рабочее место бактериолога.
- Владеть: правилами техники безопасности при работе с инфицированными материалами.

1.1. ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ И ВИРУСОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИЙ

Работу с микроорганизмами проводят в лабораториях, которые в зависимости от основных задач могут быть:

- научно-исследовательскими;
- диагностическими;
- производственными.

В системе органов здравоохранения имеются:

- клинико-диагностические лаборатории общего или специального (биохимическая, бактериологическая, иммунологическая, цитологическая и др.) типа, входящие в состав больниц, поликлиник, диспансеров и других лечебно-профилактических учреждений;

- бактериологические лаборатории Госсанэпиднадзора (ГСЭН);
- санитарно-бактериологические лаборатории ГСЭН;
- санитарно-химические лаборатории ГСЭН;
- центральные (ЦНИЛ), проблемные, отраслевые, учебные лаборатории вузов;
- специализированные лаборатории (особо опасных инфекций и др.).

В настоящее время лаборатории и более крупные лабораторные учреждения (отделы, институты, производственные предприятия), как правило, специализированные и работают с той или иной группой микроорганизмов.

С вирусами работают в вирусологических лабораториях, располагающих соответствующим оборудованием и использующих специальные методы исследования. Существуют микологические и протозоологические лаборатории. Специализированный характер приобретают и бактериологические лаборатории, в которых работа концентрируется на определенных группах бактерий, например, риккетсиозные, туберкулезные, лептоспирозные, анаэробные и др. Лабораторную работу с патогенными микроорганизмами проводят в специально оборудованных лабораториях, обеспечивающих режим работы и технику безопасности, исключающих возможность заражения персонала и утечку микроорганизмов за пределы лаборатории.

Необходимость четкой регламентации условий работы с микроорганизмами, в различной степени опасными для сотрудников лабораторий и окружающего населения, обусловила разработку классификации микроорганизмов, разбив их на четыре группы по

степени биологической опасности (классификация ВОЗ). В России, в соответствии с рекомендациями ВОЗ, патогенные микроорганизмы также разделяют на четыре группы:

- I - возбудители особо опасных инфекций (чумы, оспы, желтой лихорадки);
- II - возбудители высококонтагиозных эпидемических заболеваний человека (сибирской язвы, бруцеллеза, сыпного тифа);
- III - возбудители инфекционных болезней, выделяемые в самостоятельные нозологические группы (брюшного тифа, шигеллез);
- IV - условно-патогенные микроорганизмы, возбудители оппортунистических инфекций.

Нумерация групп микроорганизмов, принятая в России, отличается обратным порядком от классификации ВОЗ, где к I группе относят микроорганизмы самой низкой патогенности, а к IV - особо опасные.

В соответствии с разделением микроорганизмов на группы по степени биологической опасности лаборатории также подразделяют на категории. По номенклатуре ВОЗ выделяют три категории микробиологических лабораторий:

- базовые (основные или общего типа) лаборатории, которые в связи с конкретными особенностями работы могут быть оборудованы различными защитными устройствами;

- режимные (изолированные) лаборатории;
- лаборатории особого режима (максимально изолированные). Безопасность работ в лабораториях всех категорий обеспечивают:
 - выполнением распорядка и правил работы в лаборатории;
 - выполнением требований к лабораторным помещениям и их оснащению;
 - обеспечением лабораторий соответствующим оборудованием;
 - медицинским наблюдением за состоянием здоровья сотрудников;
 - обучением и тренировкой персонала технике безопасности в лаборатории.

1.2. ОСНАЩЕНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРИЙ

Помещения базовой лаборатории должны быть просторными для обеспечения безопасного проведения лабораторной работы. Стены, потолок, пол должны иметь гладкую, легко моющуюся поверхность, непроницаемую для жидкостей, устойчивую к дезинфектантам, обычно используемым в лаборатории. Поверхность рабочих столов должна быть водонепроницаемой, устойчивой к дезинфектантам, кислотам, щелочам, органическим растворителям и умеренному нагреванию. Лабораторная мебель должна быть прочной. Пространство под столами и между мебелью должно быть легкодоступно для уборки. В лаборатории должен находиться автоклав для обеззараживания отходов. Контейнеры для сбора отработанного материала должны быть маркированы желтым цветом.

Оборудование базовой лаборатории должно ограничивать или предупреждать контакт микробиолога с инфекционным материалом, должно быть изготовлено из прочных материалов, непроницаемых для жидкостей, устойчивых к коррозии. Оборудование должно быть сконструировано и установлено так, чтобы оно легко подвергалось чистке, обеззараживанию и проверке.

Лабораторию оснащают микроскопом, автоклавом, термостатами, сушильными, стерилизационными шкафами, аппаратом для свертывания сыворотки, дистиллятором, центрифугами, лабораторными весами, рН-метром, ФЭК, магнитной мешалкой, моечной ванной.

Рабочие помещения лаборатории должны быть снабжены подводкой холодной и горячей воды, электричеством, вакуумом, кислородом, воздухом высокого давления и др. В некоторых кабинетах оборудуют боксы и вытяжные шкафы.

В число обязательных помещений входят лаборатории кишечных, капельных инфекций, санитарно-бактериологическая, серологическая, а также вспомогательные помещения: средоварка, моечная, стерилизационная (чистая и грязная), регистратура, кладовые, санузел и душ для сотрудников, виварий. В лабораториях с пунктами для обследования на носительство микроорганизмов дополнительно оборудуют приемную, процедурную, туалеты для забора материала.

Помещения располагают таким образом, чтобы грязный и чистый потоки не перекрещивались и не соприкасались.

В отношении помещений режимных лабораторий должны соблюдаться те же требования, которые предусмотрены для базовой лаборатории. Кроме того, лаборатория этого типа должна быть отделена от тех частей здания, где передвижение сотрудников не ограничивается. Устройства для мытья рук должны быть снабжены приспособлениями для открывания воды ножной педалью или локтем. Окна должны быть закрыты и заклеены. Входные двери в лабораторные помещения должны быть самозакрывающимися и запирающимися на замок. Вытяжная вентиляция проектируется так, чтобы наиболее низкое давление создавалось в помещениях самой высокой опасности инфицирования. В этом случае движение воздуха будет происходить из вспомогательных помещений в направлении основного рабочего помещения. Отработанный воздух выбрасывается в окружающую среду только после фильтрации через бактериальные фильтры. При оснащении режимных лабораторий оборудованием руководствуются рекомендациями, разработанными для базовых лабораторий, с тем дополнением, что вся работа с инфекционным материалом в них проводится в защитных боксах.

В режиме максимально изолированных лабораторий существует ряд особенностей для обеспечения максимальной биологической безопасности персонала, населения и окружающей среды. Вход в лабораторию и выход из нее осуществляются через санитарный пропускник. При входе обязательно полное переодевание в специальную одежду, при выходе, перед переодеванием, обязательна целевая санитарная обработка (душем, дезинфектантами) персонала. Для снижения риска попадания инфекционного материала в окружающую среду применяют боксирование. С помощью боксов (настольных, ламинарных) создают физические барьеры для предотвращения возможных контактов работающего персонала с инфекционным материалом.

1.3. ПРАВИЛА РАБОТЫ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Основные правила работы в базовой лаборатории включают:

- запрет работ с пипеткой с помощью рта;
- запрет приема пищи, питья, курения, хранения пищи и применения косметических средств в рабочих помещениях;
- поддержание чистоты и порядка;
- дезинфекцию рабочих поверхностей не реже 1 раза в день и после каждого попадания на них заразного материала;

- мытье рук персоналом после работы с заразным материалом, животными, перед уходом из лаборатории;
- проведение всех работ таким образом, чтобы свести к минимуму возможность образования аэрозоля;
- обеззараживание всех инфицированных материалов перед выбросом или повторным использованием.

Вопросы для самоконтроля

1. Назовите группу по степени биологической опасности, к которой относят возбудителей особо опасных инфекций.
2. Можно ли в бактериологической лаборатории принимать пищу?
3. Назовите цвет маркировки контейнеров для микробиологических отходов.
4. Отходы микробиологической лаборатории подлежат обязательному...

Цели модуля

- Знать: принципы классификации, таксономическое положение и номенклатуру микроорганизмов; особенности строения микроорганизмов; методы микроскопии микробиологических объектов.
- Уметь: готовить и окрашивать микропрепараты простыми и сложными методами окраски, применяемыми в микробиологии.
- Владеть: методикой световой микроскопии препаратов с помощью иммерсионной системы и методами оценки результатов проведенных исследований.

МОДУЛЬ 2. МИР, КЛАССИФИКАЦИЯ И ПРИНЦИПЫ ТАКСОНОМИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

2.1. МИР, КЛАССИФИКАЦИЯ И ПРИНЦИПЫ ТАКСОНОМИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Мир микроорганизмов включает различные категории доклеточных и клеточных форм жизни, которые можно наблюдать только с помощью оптических приборов (различных видов микроскопов или лупы). К микробному миру отнесены бактерии, грибы, простейшие, вирусы, вириды и прионы (табл. 2.1).

Классификация - раздел систематики, распределяющий микроорганизмы по таксономическим категориям - таксонам (от греч. *taxis* - «расположение, порядок») на основе сходства однородных признаков. В основу таксономии микроорганизмов положены их морфологические, физиологические, биохимические и молекулярно-биологические свойства. Различают следующие основные таксономические категории микроорганизмов:

Таблица 2.1. Классификация мира микроорганизмов

Мир микроорганизмов			
неклеточные формы	клеточные формы		
Прионы	Домен <i>Bacteria</i>	Домен <i>Archaea</i>	Домен <i>Eukarya</i>
Вириды	Прокариоты		Эукариоты

Вирусы	Эубактерии	Архебактерии	Грибы	Простейшие
--------	------------	--------------	-------	------------

- царство;
- отдел;
- класс;
- порядок;
- семейство;
- род;
- вид.

Одна из основных таксономических категорий микроорганизмов - вид (*species*) - совокупность особей, объединенных по близким свойствам, но отличающихся от других представителей рода. Микроорганизмы получают свои видовые названия в соответствии с международными правилами бинарной (биномиальной) номенклатуры. Согласно этим правилам, первое слово обозначает название рода (пишется с прописной буквы); второе слово определяет название вида и пишется со строчной буквы, например, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и др. При повторном написании вида родовое название сокращают до начальной буквы, например, *E. coli*, *S. aureus*.

Внутри вида бактерии подразделяют по:

- антигенным свойствам - на серовары (серотипы);
- морфологическим свойствам - на морфовары;
- биохимическим свойствам - на хемовары;
- прочим биологическим признакам - на биовары;
- чувствительности к бактериофагам - на фаговары.

Совокупность однородных микроорганизмов, выросших на питательной среде, которые обладают сходными морфологическими, тинкториальными (отношение к красителям), культуральными, биохимическими и антигенными свойствами, называют чистой культурой. Чистую культуру микроорганизмов, выделенных из определенного источника и отличающихся от других представителей вида, называют штаммом.

2.2. СТРУКТУРА БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ. ПРОСТЫЕ И СЛОЖНЫЕ МЕТОДЫ ОКРАСКИ БАКТЕРИЙ

2.2.1. Классификация бактерий по морфологии. Техника приготовления мазка из чистой культуры бактерий. Простые методы окраски бактерий

Классификация бактерий по морфологии

По форме бактерии подразделяют на несколько морфологических групп (рис. 2.1):

- кокки (круглые, шаровидные бактерии);
- палочки;
- извитые;
- ветвящиеся.

Шаровидные бактерии в зависимости от взаимного расположения клеток подразделяют на:

- микрококки (располагаются одиночно);
- диплококки (лежат попарно);
- стрептококки (образуют линейные цепочки);
- тетракокки (располагаются в группах по четыре клетки);
- сарцины (в виде симметричных пакетов по 8-16 клеток в каждом);
- стафилококки (образуют асимметричные группы, напоминающие гроздь винограда).

Палочковидные бактерии, в свою очередь, могут быть прямыми и изогнутыми (вибрионы), находиться в препарате поодиночке, попарно (диплобациллы) или в цепочках (стрептобациллы).

Извитые бактерии разделяют на спириллы (имеют постоянную ригидную форму) и спирохеты. Спирохеты - извитые подвижные грамтрицательные бактерии, которые отличаются друг от друга по числу, характеру завитков и расстоянию между ними (см. рис. 2.1,В).

Ветвящиеся формы бактерий включают актиномицеты, имеющие вид длинных нитей, внешне сходных с мицелием грибов, и бифидобактерии, которые имеют разветвление (бифуркации) на одном или двух концах и располагаются в препарате скоплениями, напоминающими китайские иероглифы (см. рис. 2.1,Г).

Кроме того, выделяют такие бактерии, как риккетсии, хламидии и микоплазмы. Риккетсии и хламидии - облигатные (обязательные) внутриклеточные паразиты и обычно обнаруживаются внутри зараженной клетки.

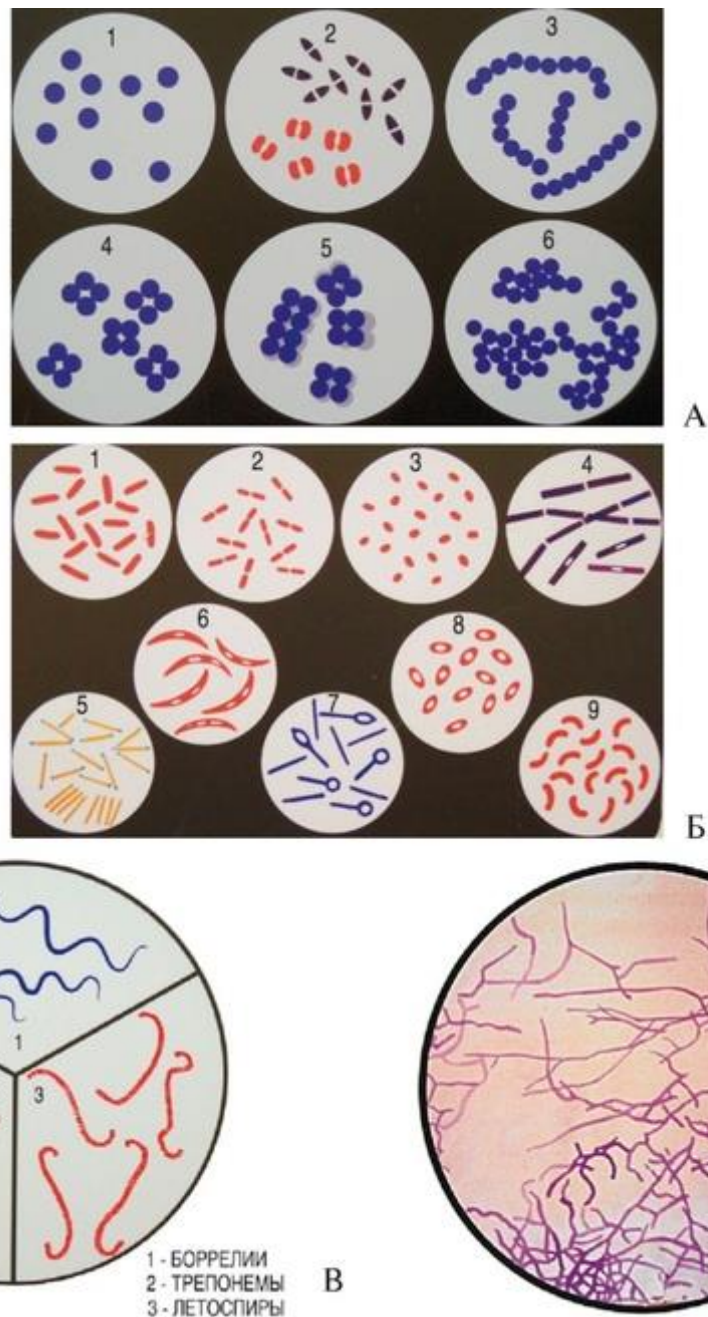


Рис. 2.1. Морфология бактерий. А - шаровидные бактерии (кокки): 1 - микрококки; 2 - диплококки (вверху - пневмококки, внизу - нейссерии); 3 - стрептококки; 4 - тетракокки; 5 - сарцины; 6 - стафилококки. Фиолетовым цветом показаны грамположительные бактерии, красным - грамотрицательные кокки. Б - палочковидные бактерии: 1 - эшерихии; 2 - клебсиеллы; 3 - бруцеллы; 4 - бациллы; 5 - коринебактерии (окраска по Нейссеру); 6 - фузиформные бактерии; 7 - клостридии; 8 - иерсинии; 9 - вибрионы. Фиолетовым цветом показаны грамположительные бактерии, красным - грамотрицательные палочки. В - спирохеты: 1 - боррелии (окраска по Романовскому-Гимзе); 2 - трепонемы (окраска по Граму); 3 - лептоспиры (окраска по Граму). Г - актиномицеты (ветвящиеся бактерии) (окраска по Граму).

Риккетсии - мелкие грамотрицательные плеоморфные¹ бактерии в виде кокков, палочек, коротких цепочек и нитевидных клеток, размер которых составляет от 0,5 до 20-40 мкм. Риккетсии обычно окрашивают специальными методами, позволяющими обнаружить их внутри клетки хозяина; по методу Здороховского, например, они окрашиваются в красный цвет.

Хламидии - также облигатные внутриклеточные паразиты, но, в отличие от других бактерий, у них имеется сложный цикл развития, и они обнаруживаются в двух формах: внеклеточной покоящейся форме хламидий (элементарные тельца), которая превращается внутри клетки хозяина в вегетативную форму (ретикулярные тельца). Хламидии грамотрицательны, но обычно выявляются внутриклеточно при окраске по методу Романовского-Гимзы.

¹ «Плеоморфизм» - термин, обозначающий способность организма образовывать разные по морфологии клетки. В отличие от этого понятия, термин «полиморфизм» обозначает разную морфологию на различных стадиях жизненного цикла организма (например, плазмодии малярии меняют свою морфологию на разных стадиях их размножения в организме человека и малярийного комара).

Микоплазмы и уреоплазмы - мелкие бактерии, размером 0,3-0,8 мкм, лишенные клеточной стенки. Эти бактерии осмотически чувствительны и могут иметь шаровидную, колбовидную или нитевидную форму. Клетки микоплазм можно увидеть в неокрашенном препарате при фазово-контрастной микроскопии (см. раздел 2.6).

Для изучения морфологии бактерий можно готовить из них прижизненные (нативные) препараты и наблюдать бактерии в неокрашенном состоянии или делать мазки из фиксированных культур с последующей окраской различными анилиновыми красителями.

Различают простые и сложные методы окраски.

- Простые методы заключаются в применении одного вида красителей и предназначены главным образом для изучения морфологии бактерий.

- Сложные методы требуют последовательного использования различных видов красителей и в некоторых случаях применения обесцвечивающих веществ. Сложные методы разделяют на *надифференциальные*, позволяющие различать бактерии по результатам окраски (например, методы Грама и Циля-Нельсена), и *структурные*, которые применяют для выявления различных структур бактерий. Применение сложных методов окраски позволяет определить тинкториальные свойства бактерий, т.е. их отношение к красителям.

Процесс приготовления препарата для микроскопии включает следующие основные этапы:

- приготовление мазка;
- высушивание мазка на воздухе;
- фиксацию мазка в пламени спиртовки;
- окраску фиксированного мазка анилиновыми красителями.

При приготовлении микроскопических препаратов исследуемую культуру бактерий обычно забирают из пробирки или чашки Петри с плотной питательной средой с помощью бактериологической петли (рис. 2.2). Жидкую (бульонную) культуру бактерий можно наносить на предметное стекло с помощью стерильной пипетки.

Техника приготовления мазка из чистой культуры бактерий

Для приготовления мазка на чистое, обезжиренное предметное стекло (ближе к одному концу) непосредственно проволоочной петлей наносят небольшую каплю водопроводной воды или стерильного физиологического раствора. Можно также наносить воду с помощью пипетки Пастера. Пробирку берут в одну руку, а бактериальную петлю удерживают в другой руке, затем ее стерилизуют в пламени горелки, нагревая докрасна. После этого открывают пробирку двумя свободными пальцами руки с петлей (безымянным пальцем и мизинцем) и, удерживая пробку в руке, аккуратно обжигают

горлышко пробирки. Затем, предварительно остудив петлю на воздухе, снимают небольшое количество культуры бактерий с поверхности питательной среды и равномерно распределяют петлей в капле воды, чтобы получить тонкий, овальной формы мазок размером до 2 см². Остаток культуры бактерий на петле следует сжечь в пламени спиртовки. Мазок должен быть тонким, и материал в нем должен быть распределен равномерно, так как только при этом условии препарат удобен для изучения окрашенных микроорганизмов. После этого пробирку закрывают (см. рис. 2.2).

После приготовления мазок высушивают на воздухе или для ускорения процесса в струе теплого воздуха над пламенем спиртовки, не давая капле закипеть. Маркером или восковым карандашом отмечают участок с нанесенным мазком с обратной стороны стекла.

Для фиксации мазка предметное стекло (мазком вверх) медленно проносят 3 раза (в течение 5-6 с) через верхнюю часть пламени горелки. При фиксации бактерии погибают, приклеиваются к стеклу и не смываются при дальнейшей обработке. Более длительное нагревание может вызвать деформацию клеточных структур. Для того чтобы проверить, достаточно ли зафиксирован препарат, следует прикоснуться стеклом к тыльной поверхности ладони руки. Ощущение чувства легкого жжения свидетельствует о том, что препарат хорошо зафиксирован.

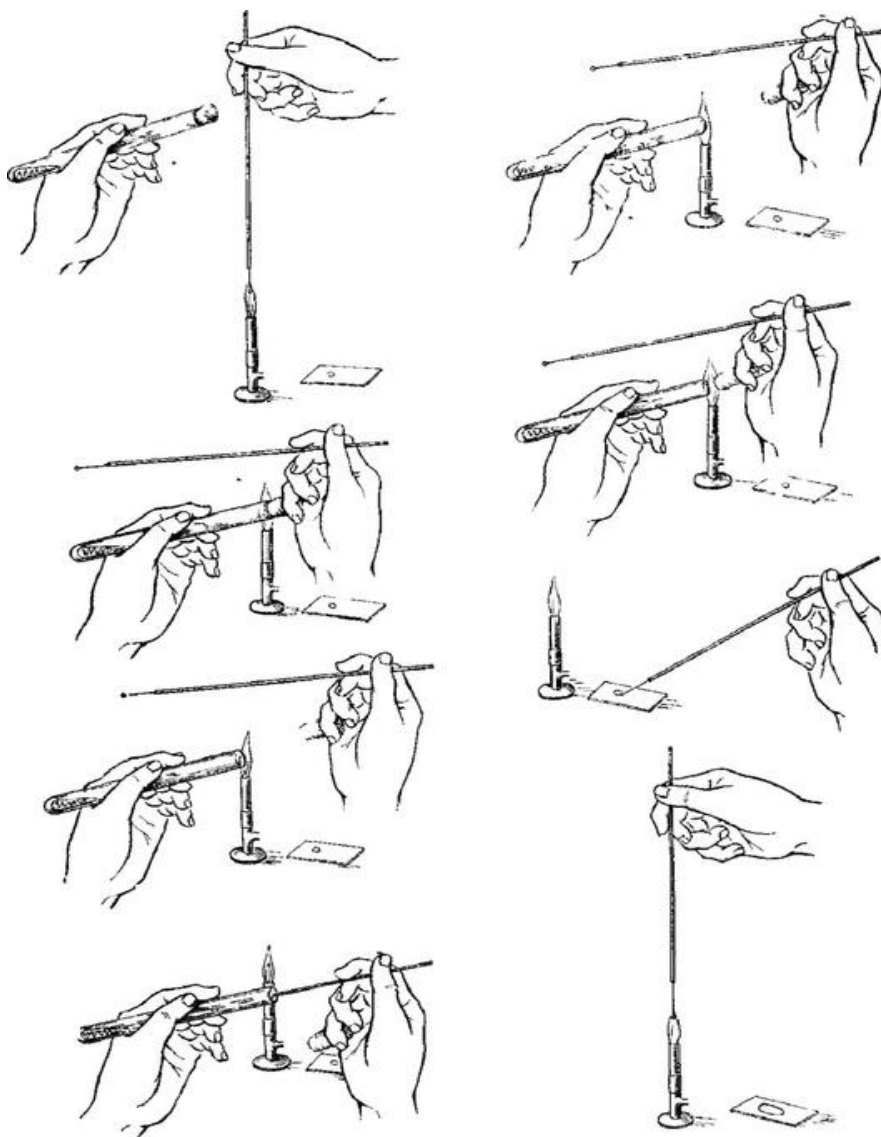


Рис. 2.2. Техника приготовления мазка (пояснения см. в тексте)

Методика окраски мазка простым методом

После охлаждения предметного стекла производят окраску мазка. Для простого метода окраски на поверхность фиксированного мазка пипеткой наносят водный фуксин (краситель красного цвета) на 1-2 мин или метиленовый синий, который выдерживают 3-5 мин. Затем краситель сливают, мазок тщательно промывают водопроводной водой, снова высушивают на воздухе или фильтровальной бумагой (осторожно его промокая).

Приготовленные препараты из чистых культур бактерий микроскопируют с помощью светового микроскопа с иммерсионной системой (см. раздел 2.6). Если препарат правильно приготовлен, то поле зрения должно быть бесцветным, а бактерии интенсивно окрашены в цвет красителя.

2.2.2. Строение бактериальной клетки

В строении бактериальной клетки различают (рис. 2.3):

- основные, жизненно необходимые структуры (клеточную стенку, цитоплазматическую мембрану с мезосомами, цитоплазму, рибосомы и нуклеоид);
- дополнительные структуры (пили, жгутики, капсулу, споры, плазмиды и различные виды цитоплазматических включений), которые встречаются не у всех бактерий, но дают им преимущества, поскольку позволяют адаптироваться к различным условиям существования в окружающей среде.

Клеточная стенка - четко очерченная, относительно прочная структура, обладающая эластичностью и упругостью:

- обеспечивает стабильность формы бактерий, сдерживает высокое осмотическое давление в клетке;
- защищает бактерии от механических воздействий;
- участвует в процессе деления бактерий и спорообразовании, транспорте метаболитов;
- является рецептором для бактериофагов;
- контактирует с внешней средой.

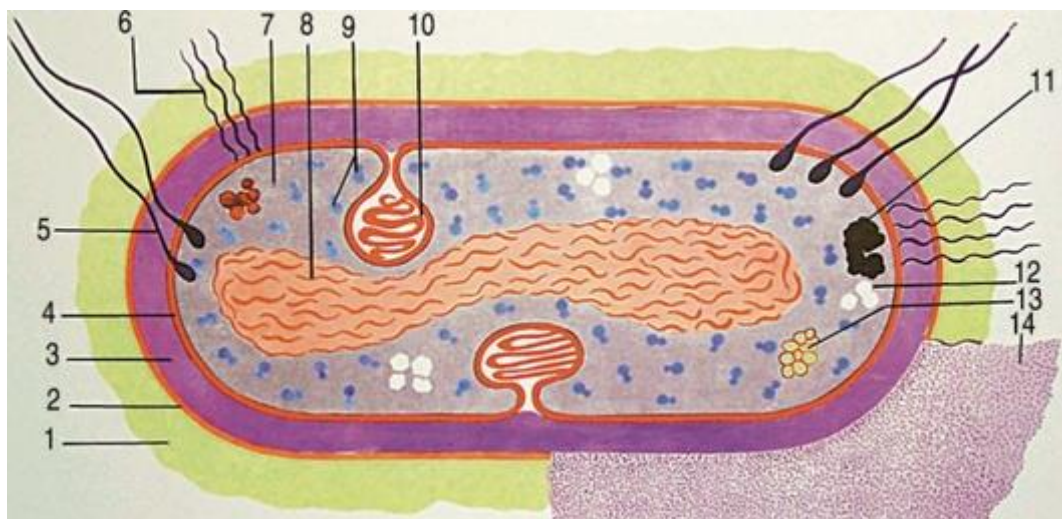


Рис. 2.3. Структура бактериальной клетки: 1-2 - капсула*; 3 - клеточная стенка; 4 - цитоплазматическая мембрана; 5 - жгутики*; 6 - пили*; 7 - цитоплазма; 8 - нуклеоид; 9 - рибосомы; 10 - мезосома; 11-13 - цитоплазматические включения*; 14 - слизь* (пояснения см. в тексте); * - дополнительные структуры

По строению клеточной стенки различают грамположительные и грамотрицательные бактерии (методику окраски по Граму см. в разделе 2.2.3).

Цитоплазматическая мембрана прилежит к внутренней поверхности клеточной стенки бактерий и окружает цитоплазму. Цитоплазматическая мембрана состоит из двойного слоя фосфолипидов и интегральных белков, пронизывающих ее насквозь. Эта структура участвует в регуляции осмотического давления, транспорте веществ и энергетическом метаболизме клетки.

Выросты цитоплазматической мембраны представляют собой сложно закрученные мембранные структуры - мезосомы, которые участвуют в энергетическом обмене клетки, а также в процессах деления и спорообразования бактерий.

Цитоплазма - внутренняя среда клетки, содержит большое количество воды, растворимых белков, рибонуклеиновых кислот и других органических и неорганических веществ и микроэлементов. В цитоплазме расположены рибосомы бактерий, нуклеоид, а также различные включения: гранулы гликогена, полисахаридов, полифосфатов (зерна волютина).

Рибосомы бактерий состоят из двух субъединиц (30S и 50S) и имеют константу седиментации 70S, в отличие от эукариот, размер рибосом которых 80S. Рибосомы принимают участие в синтезе белка.

Нуклеоид (хромосома бактерий) - ядерный аппарат бактерий, представлен двунитевой ДНК, обычно замкнутой в кольцо, но может быть и линейной формы. Нуклеоид бактерий не имеет ядерной оболочки, ядрышка и белков гистонов.

Капсула - слизистая структура, которая может закрывать клеточную стенку снаружи и имеет четко очерченные границы. Капсула состоит из полисахаридов или полипептидов, защищает бактерии от высушивания и препятствует фагоцитозу. Капсулы присущи некоторым видам бактерий или могут образовываться при попадании микроорганизма в макроорганизм. Капсулы выявляют методами негативного контрастирования (см. раздел 2.2.4).

Жгутики - дополнительные структурные образования, придающие бактериям подвижность. Они состоят из белка флагеллина и прикрепляются к цитоплазматической мембране и клеточной стенке с помощью специальных дисков. В длину жгутики значительно превышают размер бактериальной клетки, но значительно тоньше ее. Жгутики обычно обнаруживают у палочковидных бактерий.

В зависимости от числа и расположения жгутиков бактерии подразделяют (рис. 2.4) на:

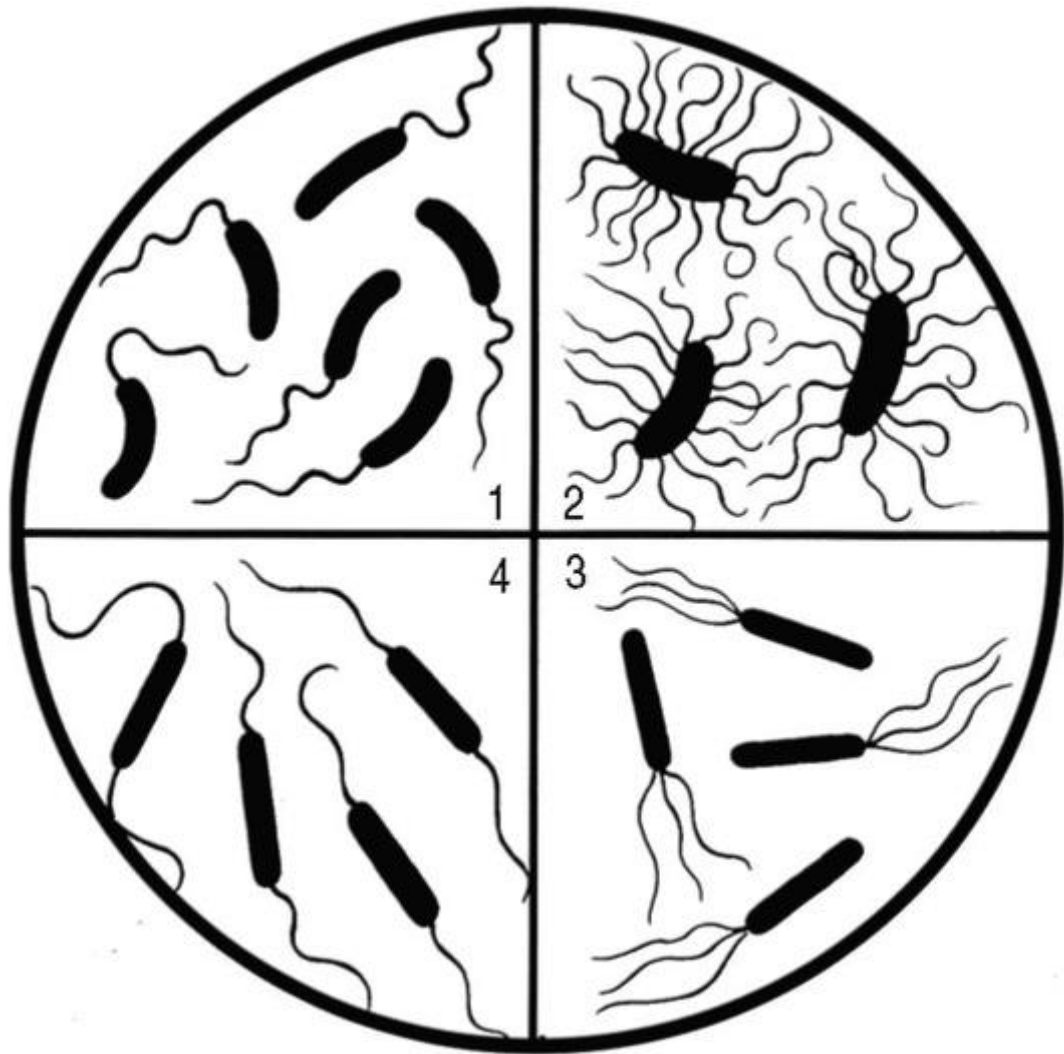


Рис. 2.4. Классификация бактерий по расположению жгутиков: 1 - монотрихи; 2 - перитрихи; 3 - лофотрихи; 4 - амфитрихи

- монотрихи, имеющие один жгутик на одном из полюсов клетки;
- перитрихи, обладающие десятками жгутиков, отходящих по периметру бактерии;
- лофотрихи, имеющие пучок жгутиков на одном из полюсов клетки;
- амфитрихи, имеющие жгутики на обоих полюсах клетки (по одному или в виде пучков).

Жгутики можно обнаружить у бактерий по их подвижности в нативном препарате (висячей или раздавленной капле) либо при окраске методами Леффлера или серебрения (см. ниже).

Пили (фимбрии) - нитевидные структуры, более тонкие и короткие, чем жгутики, которые отходят от поверхности клетки и состоят из белка пилина. Пили служат для прикрепления (адгезии) бактерий к клетке-мишени, ответственны также за питание, водно-солевой обмен, являются рецептором для бактериофагов. F-пили участвуют в процессе передачи генетического материала при конъюгации. Пили у бактерий можно увидеть с помощью электронного микроскопа.

Споры - своеобразная покоящаяся форма существования некоторых грамположительных бактерий (клостридий и бацилл). Они образуются во внешней среде при неблагоприятных условиях существования бактерий (высушивании, дефиците питательных веществ и др.). Споры не служат для размножения бактерий, поэтому из

одной бактериальной клетки формируется только одна спора (эндоспора). Споры бактерий могут длительное время (десять лет) сохраняться в объектах окружающей среды, например в почве, поскольку имеют плотную, многослойную оболочку, содержащую дипиколинат кальция, обуславливающий устойчивость спор.

Споры различных бактерий отличаются по форме, размеру и расположению (центральному, терминальному или субтерминальному) в вегетативной части клетки, что является дифференциально-диагностическим видовым свойством бактерий (рис. 2.5). У бактерий рода *Bacillus* диаметр споры не превышает поперечника вегетативной клетки, а у бактерий рода *Clostridium* размер споры больше диаметра клетки.

Споры бактерий окрашивают по методу Ауески, а также по методу Циля-Нильсена (см. раздел 2.2.4).

В цитоплазме некоторых бактерий можно обнаружить включения в виде зерен гликогена, крахмала, поли- β -масляной кислоты или волютина, которые представляют собой запас питательных веществ, метаболитов или источников энергии для бактерий. У дифтерийной палочки такие включения носят название зерен волютина и располагаются на концах клетки, что придает им вид булавы. Эти включения у *Corynebacterium diphtheriae* состоят из полифосфатов и проявляют феномен метахромазии: волютин окрашивается в иной цвет, чем цитоплазма бактерии. Для обнаружения зерен волютина применяют окраску по Нейссеру.

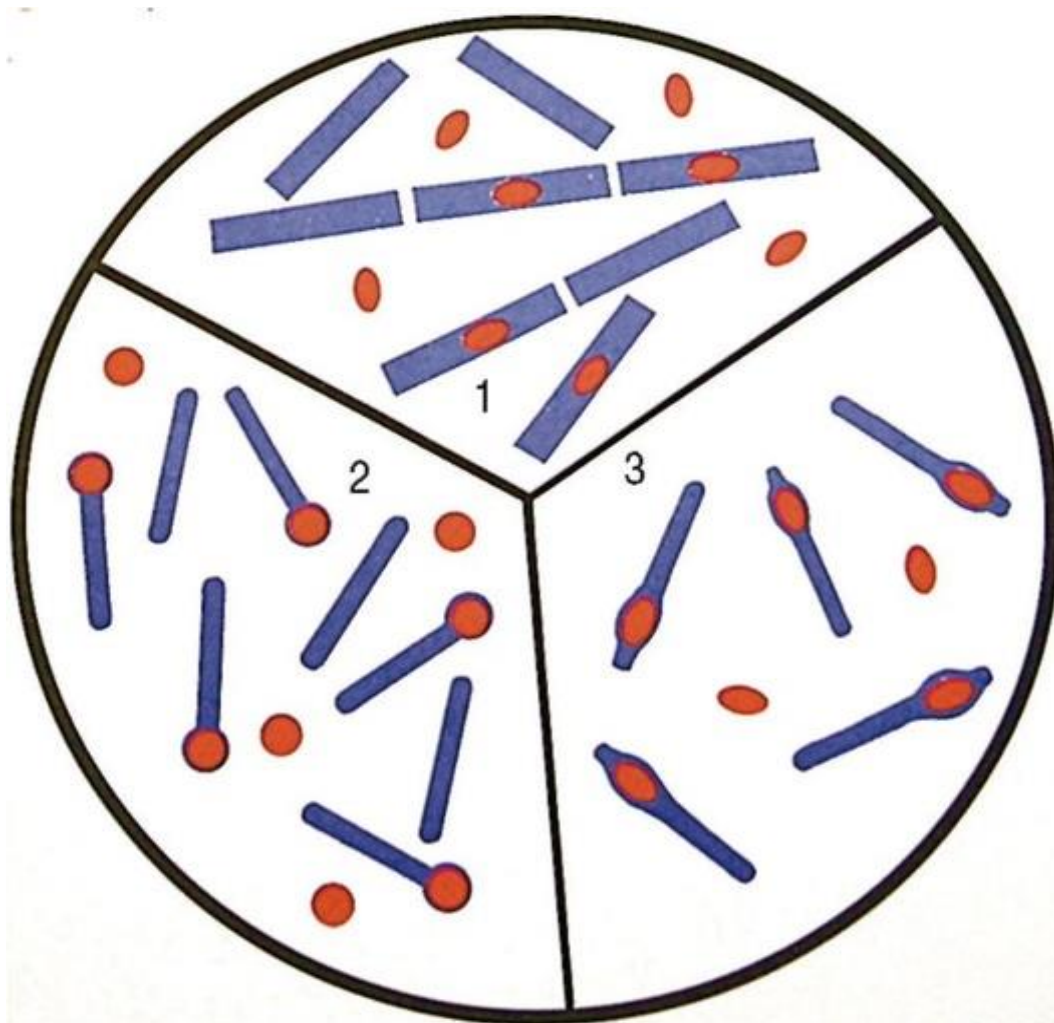


Рис. 2.5. Варианты расположения спор у бактерий (окраска по Ауески): 1 - центральное расположение у бацилл; 2 - терминальное расположение у клостридий столбняка; 3 - субтерминальное расположение у клостридий ботулизма

2.2.3. Дифференциальные методы окраски бактерий (окраска по Граму и методу Циля-Нильсена)

Сложные дифференциальные методы окраски широко применяют в микробиологии, поскольку позволяют отличить бактерии друг от друга по тинкториальным свойствам. При использовании этих методов окраски последовательно применяют красители контрастного цвета и обесцвечивающие (дифференцирующие) вещества (спирт или кислоту).

Методика окраски по Граму (модификация по Синеву)

- На фиксированный мазок кладут сухую полоску фильтровальной бумаги, пропитанной карболово-спиртовым раствором генцианового фиолетового (по Синеву), наносят на нее 2-3 капли воды и выдерживают 1-2 мин.
- Бумагу снимают пинцетом и, не промывая водой, наносят на мазок раствор Люголя (содержит йод) на 1 мин; мазок при этом чернеет.
- Сливают раствор Люголя, обесцвечивают 95% этиловым спиртом, наливая его 2-3 раза или погружая стекло в стаканчик со спиртом в течение 30-40 с до прекращения отхождения фиолетовых струек красителя.
- Тщательно промывают мазок водой для удаления спирта.
- Наносят на мазок водный раствор фуксина на 1-2 мин.
- Сливают краску, промывают мазок водой, высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют.

Грамположительные бактерии окрашиваются основным красителем в темно-фиолетовый цвет в начале окраски, грамотрицательные - контрастным красителем в красный цвет на последнем этапе окрашивания (рис. 2.6).

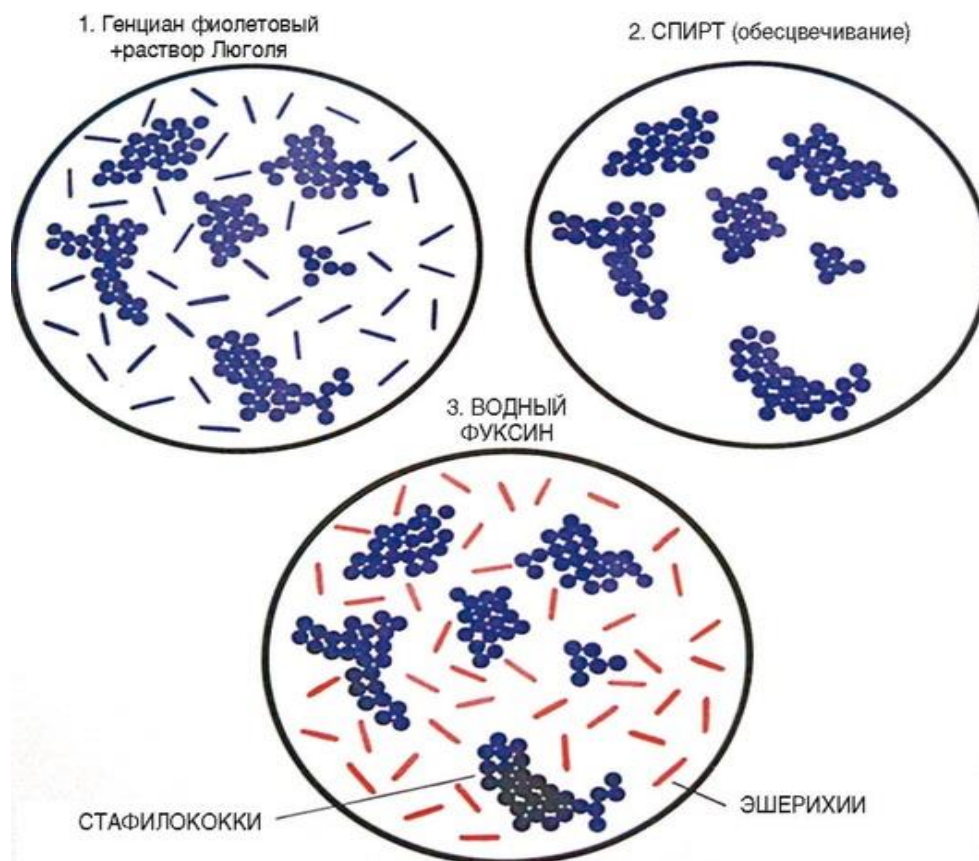


Рис. 2.6. Механизм и этапы окраски по Граму. Фиолетовым цветом показаны грамположительные бактерии, красным - грамотрицательные (пояснения см. в тексте)

В основе дифференциации бактерий лежит строение клеточной стенки грамположительных (толстостенных) и грамотрицательных (тонкостенных) бактерий, вследствие чего они неодинаково воспринимают красители при окраске по методу Грама. Способность грамположительных бактерий удерживать краситель генциановый фиолетовый в комплексе с йодом связана со значительным содержанием в их клеточной стенке многослойного пептидогликана, наличием тейхоевых и липотейхоевых кислот (которые отсутствуют у грамотрицательных бактерий) и особенностями структурной организации клеточной стенки, поры в которой сужаются при обработке спиртом, задерживая краску. В связи с тем что грамотрицательные бактерии имеют один слой пептидогликана и большое количество липидов в составе их клеточной стенки, она имеет более высокую проницаемость и при обесцвечивании спиртом комплекс «генциановый фиолетовый-йод» легко удаляется через поры клеточной стенки, в результате чего грамотрицательные бактерии приобретают цвет контрастного (дополнительного) красителя - водного фуксина.

подавляющее большинство бактерий хорошо окрашиваются по методу Грама, поэтому его считают основным в микробиологии. Исключение составляют спирохеты, плохо воспринимающие анилиновые красители, внутриклеточные паразиты (риккетсии и хламидии), а также бактерии, не имеющие клеточной стенки (микоплазмы и L-формы бактерий). Микобактерии в связи с особенностями строения их клеточной стенки обычно окрашивают по методу Циля-Нильсена.

Методика окраски по Цилю-Нильсену

Метод также относят к сложным дифференциальным способам окраски бактерий и применяют для окрашивания кислотоустойчивых микобактерий - возбудителей туберкулеза (*Mycobacterium tuberculosis* и других микобактериозов) и лепры (*Mycobacterium leprae*). В связи со значительным количеством липидов, миколовых кислот и восков в их клеточной стенке кислотоустойчивые бактерии слабо воспринимают анилиновые красители, поэтому по Граму окрашиваются плохо. Для выявления этих бактерий можно применять флюорохромы (аурамин) или концентрированные растворы красителей, содержащие протравители (например, карболовую кислоту). Для увеличения проницаемости клеточной стенки первый этап окрашивания проводят при подогревании мазка. При последующем воздействии минеральных кислот окрашенные микобактерии не обесцвечиваются, так как являются кислотоустойчивыми.

Техника окраски по Цилю-Нильсену

- На высушенный и фиксированный мазок кладут кусочек фильтровальной бумаги (по размеру мазка), наливают карболовый раствор фуксина Циля и, удерживая стекло пинцетом, подогревают над пламенем спиртовки (но не в пламени!) до появления паров. При подсыхании красителя вследствие его испарения осторожно доливают карболовый фуксин на полоску фильтровальной бумаги. Манипуляцию повторяют 2-3 раза, каждый раз отставляя стекло в сторону для охлаждения (наблюдать за появлением паров удобнее, глядя на мазок сбоку).

- Снимают бумагу пинцетом. Дают препарату остыть и после этого промывают водой.

- Обесцвечивают мазок 5% раствором серной кислоты, погружая в стаканчик с кислотой 3-5 раз, не задерживая в кислоте. Можно также наносить кислоту на препарат на 1-2 мин до полного обесцвечивания. На этом этапе мазок становится бесцветным, почти таким, каким был до окрашивания карболовым фуксином.

- Мазок тщательно промывают водой, чтобы прекратить обесцвечивание.

- Окрашивают препарат метиленовым синим в течение 5-7 мин. Мазок становится интенсивно голубым.

- Промывают водой, высушивают, микроскопируют. При микроскопии голубой фон облегчает обнаружение кислотоустойчивых бактерий.

Микобактерии (тонкие, длинные, слегка изогнутые или толстые, короткие, прямые палочки) приобретают рубиново-красную окраску на первом этапе, когда препарат окрашивают горячим карболовым фуксином Циля, и не обесцвечиваются раствором серной кислоты. Не кислотоустойчивые бактерии легко теряют окраску при обработке кислотой и окрашиваются в синий цвет метиленовым синим на последнем этапе окрашивания по Цилю-Нильсену (рис. 2.7).

2.2.4. Дополнительные структуры бактерий и их выявление

Сложные методы окраски для обнаружения различных структур бактерий применяют реже, чем дифференциальные методы. Среди них наиболее часто используют выявление капсул, спор и зерен волютин у бактерий.



Рис. 2.7. Препарат мокроты, окрашенный по методу Циля-Нельсена. Красным цветом показаны кислотоустойчивые микобактерии (пояснения см. в тексте)

Капсула бактерий не воспринимает анилиновые красители вследствие большого содержания воды и отсутствия у нее жесткой структуры. В связи с этим для выявления капсул применяют методы негативного контрастирования, когда окрашивают фон (предметное стекло, ткань органа, слизь мокроты и др.) и клеточную стенку бактерий, а капсула остается неокрашенной. При этом в мазках из органов зараженного животного или из патологического материала, взятого от больного человека (например, мокроты), капсулы бактерий можно выявить с помощью простого метода окраски или метода Грама.

В препарате, окрашенном, например, водным фуксином, на розовом фоне будут видны бактерии красного цвета, окруженные бесцветной капсулой. При окраске по Граму грамположительные бактерии, окрашенные в сине-фиолетовый цвет, располагаются на красном фоне и также окружены бесцветной капсулой (рис. 2.8).

Для окраски чистой культуры бактерий, выращенных на питательной среде, используют метод Бурри-Гинса.

Техника окраски по Бурри-Гинсу для выявления капсул у бактерий

- На предметное стекло (ближе к одному концу) наносят каплю черной туши, а рядом с ней - каплю воды, в которую вносят культуру бактерий, образующих капсулу. Обе капли тщательно перемешивают узким краем другого чистого предметного стекла, ставят его под углом 45° и, когда капля смеси растечется вдоль его ребра, готовят мазок по типу мазка крови. Тушевый мазок высушивают и фиксируют в пламени спиртовки.



Рис. 2.8. Выявление капсул у бактерий методами негативного контрастирования (пояснения см. в тексте)

- Наносят карболовый фуксин Циля (в разведении 1:3) на 2-3 мин.

Промывают водой, высушивают на воздухе и микроскопируют.

В препарате из чистой культуры, окрашенном по методу Бурри-Гинса, видны бактерии красного цвета, вокруг которых контрастно выделяются неокрашенные капсулы на коричнево-черном фоне (см. рис. 2.8).

Выявление капсул у бактерий, находящихся в тканях макроорганизма, проводят по методу Романовского-Гимзы. Техника окраски по Романовскому-Гимзе

- Приготовленный препарат высушивают и фиксируют жидким фиксатором (метанолом, этиловым спиртом) в течение 5-20 мин.

- Фиксированный препарат подсушивают и помещают в стаканчик с красителем на 20-25 мин. Краситель (сухая краска Романовского-Гимзы) состоит из азура, метиленового синего и эозина, которые отдельно растворяют в 1 л дистиллированной воды и перед употреблением смешивают в соотношении 10 мл дистиллированной воды, 4 мл эозина, 8 мл краски Романовского-Гимзы.

Жгутики бактерий настолько тонки (толщина 12-20 нм), что их не удастся увидеть при световой микроскопии при обычных способах окраски. Жгутики у бактерий можно обнаружить в электронном, световом микроскопе с помощью окраски методом Леффлера или методом серебрения по Морозову либо по подвижности бактерий в препарате раздавленной или висячей капли (косвенный метод выявления жгутиков).

Жгутики бактерии окрашиваются плохо, поэтому для их выявления применяют различные протравы, которые вызывают их разбухание в результате денатурации белка флагеллина, увеличивая визуально их толщину. При окраске, например, по методу Леффлера молодую культуру бактерий, выращенную при оптимальных условиях в течение 12-18 ч, протравливают смесью спиртового раствора фуксина, танина и раствора сернокислого железа с подогревом. Затем докрасивают карболовым фуксином Циля. При микроскопии препарата видны крупные красные палочки, окруженные длинными жгутиками розового цвета (рис. 2.9).

Для обнаружения подвижности живых бактерий готовят препараты висячей или раздавленной капли.



Рис. 2.9. Выявление жгутиков у бактерий (пояснения см. в тексте)

Для приготовления препарата висячей капли используют специальные предметные стекла с углублением (лункой) в центре. Небольшую каплю исследуемого материала наносят на середину покровного стекла. Края лунки предметного стекла смазывают вазелином и накрывают им покровное стекло так, чтобы капля находилась в центре лунки. Быстро переворачивают препарат покровным стеклом вверх. Капля должна свободно свисать над центром герметично закрытой полости лунки, не касаясь ее дна и краев.

При приготовлении препарата раздавленной капли на середину чистого, обезжиренного предметного стекла стерильной петлей или пастеровской пипеткой наносят каплю исследуемого материала и накрывают ее покровным стеклом так, чтобы не образовалось пузырьков воздуха (т.е. раздавливают каплю). Необходимо следить, чтобы капля была небольшой: жидкость должна заполнить все пространство под покровным стеклом, но не вытекать за его края.

Приготовленные нативные препараты в виде раздавленной или висячей капли рассматривают в затемненном поле зрения светового микроскопа при опущенном конденсоре и суженной диафрагме (для уменьшения интенсивности освещения). Сначала

микроскопируют с помощью объектива с увеличением х8, а после обнаружения края капли устанавливают объектив х40 или иммерсионный. В поле зрения должны быть видны хорошо освещенные подвижные бактерии на темном фоне (см. рис. 2.9).

Форма, величина и характер расположения спор в клетке - видовой признак бактерий, и их обнаружение используют при постановке микробиологического диагноза. Споры бактерий имеют толстую оболочку (кортекс) и поэтому не воспринимают водные растворы анилиновых красителей. При окраске простыми методами или по Граму они остаются бесцветными структурами внутри окрашенных вегетативных клеток бактерий, поэтому для окраски спор используют сложные, специальные методы окраски - методы Ауески¹ или Циля-Нельсена.

Техника приготовления препарата и окраска спор бактерий по методу Ауески. Метод Ауески основан на предварительном протравливании нефиксированного мазка из спорообразующих бактерий в кислоте для повышения проницаемости оболочки спор и последующем воздействии концентрированных растворов красителей при высокой температуре.

- На предметном стекле готовят густой мазок из бактерий. Мазок высушивают и, не фиксируя, наливают на него 0,5% раствор хлористоводородной кислоты для протравы; осторожно подогревают над пламенем горелки в течение 1-2 мин до закипания.

- Остатки кислоты сливают. Мазок (после охлаждения) промывают водой, высушивают, фиксируют в пламени горелки.

- Далее фиксированный препарат окрашивают по методу Циля-Нельсена (см. выше).

Споры окрашиваются фуксином Циля в красный цвет и вследствие их кислотоустойчивости не обесцвечиваются в последующем серной кислотой. Цитоплазма вегетативных форм бактерий обесцвечивается кислотой и окрашивается метиленовым синим (см. рис. 2.5).

Выявление зерен волютина у *Corynebacterium diphtheriae* имеет важное диагностическое значение при постановке диагноза дифтерии и для дифференциации дифтерийной и ложнодифтерийной бактерий.

¹ Метод Ауески (*Anjesky*) в некоторых вариантах транскрипции читают как метод Ожешко (Ожешки).

Выявление зерен волютина по Нейссеру

- Фиксированный препарат в течение 1-2 мин окрашивают ацетатом синьки Нейссера.

- Краситель смывают и на препарат наносят несколько капель раствора Люголя на 1 мин.

- Мазок промывают водой и подсушивают.

- Докрашивают препарат раствором везуина или хризоидина в течение 2-3 мин. По окончании окрашивания мазок промывают водой, высушивают и исследуют под микроскопом. Зерна волютина, имеющие щелочную реакцию, окрашиваются ацетатом синьки в темно-синий цвет. Цитоплазма клеток, имеющая кислое значение рН, воспринимает щелочной краситель везуин (хризоидин) и окрашивается в желтый или светло-коричневый цвет. У возбудителя дифтерии зерна волютина расположены строго на обоих полюсах клетки (рис. 2.10).

2.3. МОРФОЛОГИЯ ГРИБОВ. ПРИНЦИПЫ КЛАССИФИКАЦИИ ГРИБОВ И МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ИХ МОРФОЛОГИИ

Грибы - эукариотические микроорганизмы, которые относят к царству *Fungi* (*Mycota*). Грибы отличаются от бактерий более сложным строением, например, они имеют оформленное ядро, митохондрии, эндоплазматический ретикулум и мощную клеточную стенку, в состав которой входят хитин, маннаны, гликаны, а их цитоплазматическая мембрана содержит эргостерол.

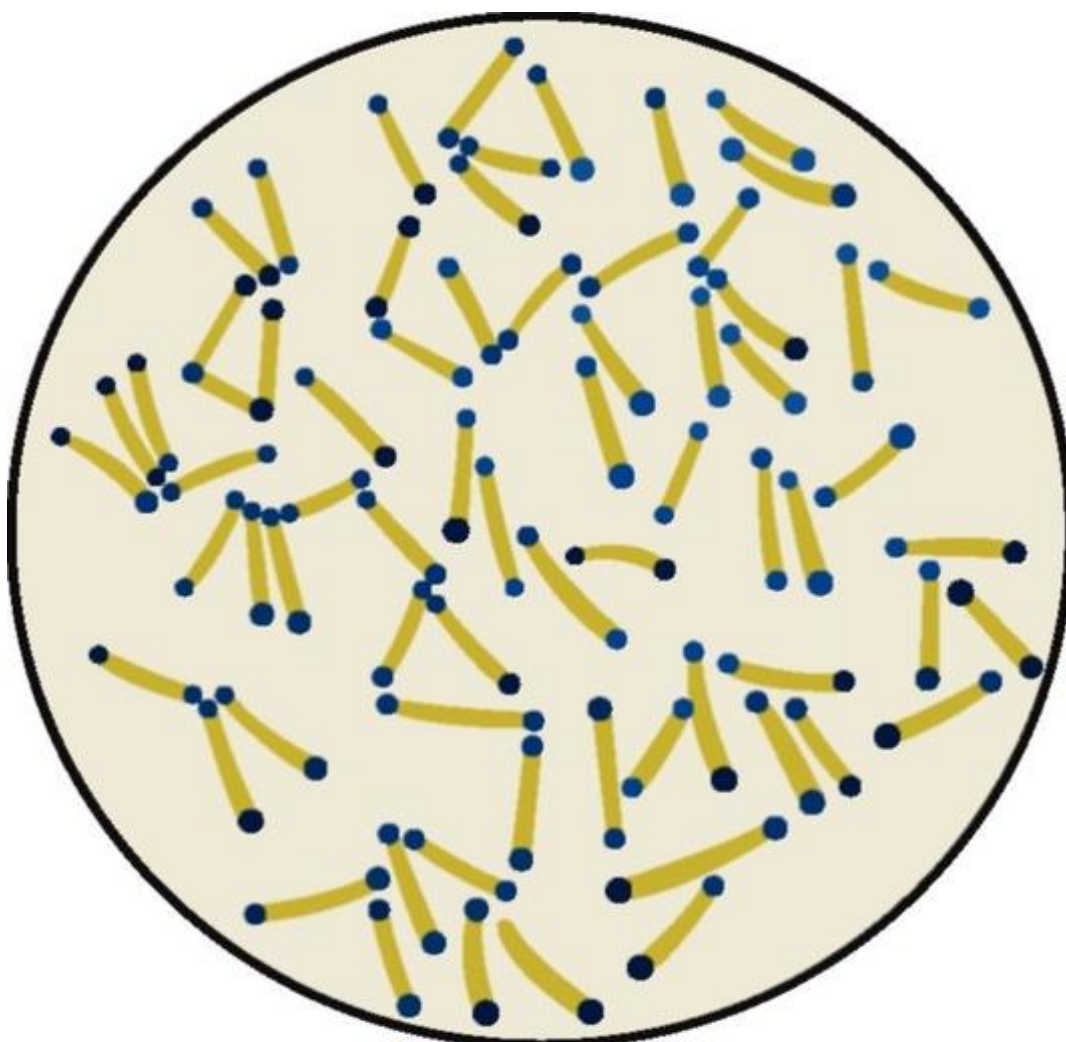


Рис. 2.10. Выявление зерен волютина у коринебактерий дифтерии (окраска по Нейссеру) (пояснения см. в тексте)

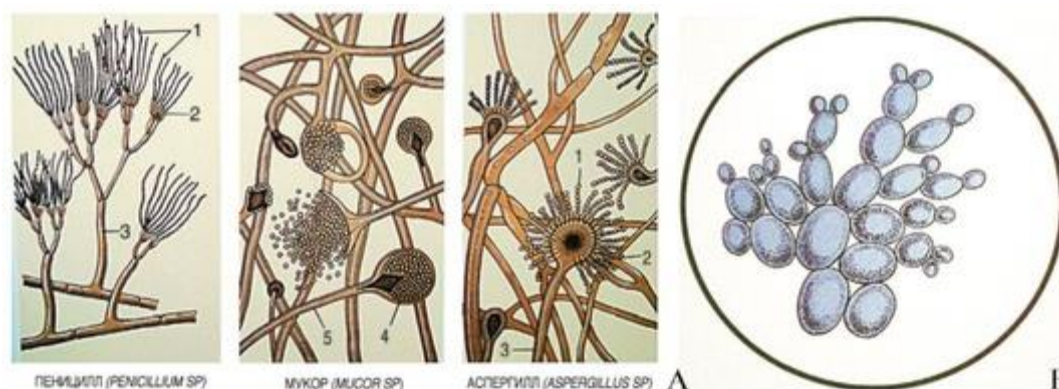


Рис. 2.11. Морфология грибов. А - гифальные (плесневые) грибы в нативном препарате: 1 - конидии; 2 - стеригмы; 3 - конидиеносец; 4 - спорангий со спорами; 5 -

спорангиеносец (пояснения см. в тексте). Б - дрожжеподобные грибы рода *Candida* (окраска метиленовым синим)

По форме различают два основных типа грибов (рис. 2.11):

- *гифальные* (синонимы: плесневые, нитевидные или мицелиальные);
- *дрожжевые*, которые образуют отдельные почкующиеся клетки округлой или овальной формы.

Гифальные грибы построены из длинных тонких нитей (гиф), сплетающихся в грибницу, или мицелий. Гифы низших грибов не имеют перегородок, у высших грибов гифы разделены перегородками.

По способу размножения грибы подразделяют на:

- *совершенные*, имеющие как половой, так и бесполой способы размножения;
- *несовершенные*, у которых отсутствует или не установлен половой способ размножения.

Половое размножение грибов происходит путем образования половых форм, называемых телеоморфами: гамет, половых спор (зигоспор, аскоспор, базидиоспор) и др. При бесполом размножении образуются разнообразные формы, называемые анаморфами. Размножение несовершенных грибов осуществляется путем почкования, фрагментацией гиф и бесполой спорами (например, спорангиоспорами у зигомицетов, конидиоспорами у аскомицетов). К совершенным грибам относят зигомицеты, аскомицеты и базидиомицеты, к несовершенным - дейтеромицеты (табл. 2.2).

Поскольку клеточная стенка гифальных грибов содержит хитин, они не воспринимают анилиновые красители. В связи с этим морфологию плесневых грибов изучают путем микроскопии культур (колоний) этих грибов непосредственно на субстрате (питательной среде) и при исследовании нативных микропрепаратов с помощью стереоскопической лупы или при малом увеличении светового микроскопа (с объективом х8 или х40). Колонии плесневых грибов пушистые, нередко пигментированные.

Таблица 2.2. Классификация грибов, имеющих медицинское значение

Царство <i>Fungi</i> (<i>Eumycota</i>)	
таксоны	основные роды
Низшие грибы	
Зигомицеты (тип <i>Zygomycota</i>)	<i>Mucor</i> , <i>Rhizopus</i> и др. Микроспоридии
Высшие грибы	
Аскомицеты (тип <i>Ascomycota</i>)	Телеоморфы <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Trichophyton</i> , <i>Microsporum</i> ; <i>Candida</i> , а также <i>Saccharomyces</i> , <i>Pneumocystis jirovecii</i> (ранее - <i>P. carinii</i>) и др.
Базидиомицеты (тип <i>Basidiomycota</i>)	Телеоморфы <i>Cryptococcus neoformans</i> и др.
Дейтеромицеты (тип <i>Deuteromycota</i>)	<i>Epidermophyton</i> ; анаморфы <i>Candida</i> ; <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Cryptococcus</i> и др.

Различают субстратный мицелий, часто вырастающий в питательную среду, и воздушный(репродуктивный) мицелий, направленный вверх (в воздух), на котором созревают споры.

Колонии дрожжевых и дрожжеподобных грибов, в отличие от гифальных, похожи на колонии бактерий. Они гладкие, пастообразные, иногда пигментированные, например, у *Candida albicans*. Дрожжевые грибы, особенно в молодых культурах, хорошо окрашиваются как простыми, так и сложными методами; они грамположительны.

2.4. МОРФОЛОГИЯ И ПРИНЦИПЫ КЛАССИФИКАЦИИ ПРОСТЕЙШИХ

Простейшие - эукариотические одноклеточные микроорганизмы, которых относят к царству *Protozoa*. Размеры простейших в среднем составляют 2-100 мкм. Они имеют ядро с ядерной оболочкой и ядрышком, в их цитоплазме имеются эндоплазматическая сеть с прикрепленными к ней многочисленными 80S-рибосомами, митохондрии, комплекс Гольджи и лизосомы. Клетки простейших окружены мембраной (пелликулой) - аналогом цитоплазматической мембраны клеток животных.

Простейшие могут передвигаться с помощью жгутиков, ресничек или путем образования псевдоподий. Размножаются простейшие бесполом путем, а некоторые из них двумя способами - половым и бесполом и имеют сложный цикл развития со сменой хозяев - промежуточного и окончательного. Некоторые простейшие при неблагоприятных условиях образуют покоящиеся формы - цисты. По строению органов движения и особенностям размножения простейших разделяют на четыре категории (табл. 2.3).

Таблица 2.3. Классификация простейших

Царство <i>Protozoa</i>	
категории	представители
Амебы	<i>Entamoeba histolytica</i> , <i>Entamoeba coli</i> и др.
Жгутиконосцы	<i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Leishmania spp.</i> , <i>Trypanosoma spp.</i> , <i>Lamblia intestinalis (Giardia lamblia)</i> и др.
Споровики	<i>Plasmodium spp.</i> , <i>Toxoplasma gondii</i> , <i>Babesia spp.</i> , <i>Cryptosporidium spp.</i> др.
Реснитчатые	<i>Balantidium coli</i> и др.

Жгутиконосцы включают представителей, патогенных для человека:

- *трипаносомы* - возбудителей африканского трипаносомоза (сонной болезни);
- *лейшмании*, вызывающие кожный и висцеральный лейшманиоз;
- *трихомонады* - возбудителей трихомониаза;
- *лямблии* - возбудителей лямблиоза.

К саркодовым относят возбудителей амебной дизентерии человека.

Споровики представлены возбудителями токсоплазмоза, малярии и криптоспоридиоза.

Реснитчатые могут вызывать кишечный балантидиаз.

Простейшие обычно окрашивают по методу Романовского-Гимзы, при этом их цитоплазма окрашивается в синий, а ядро - в красный цвет (рис. 2.12).

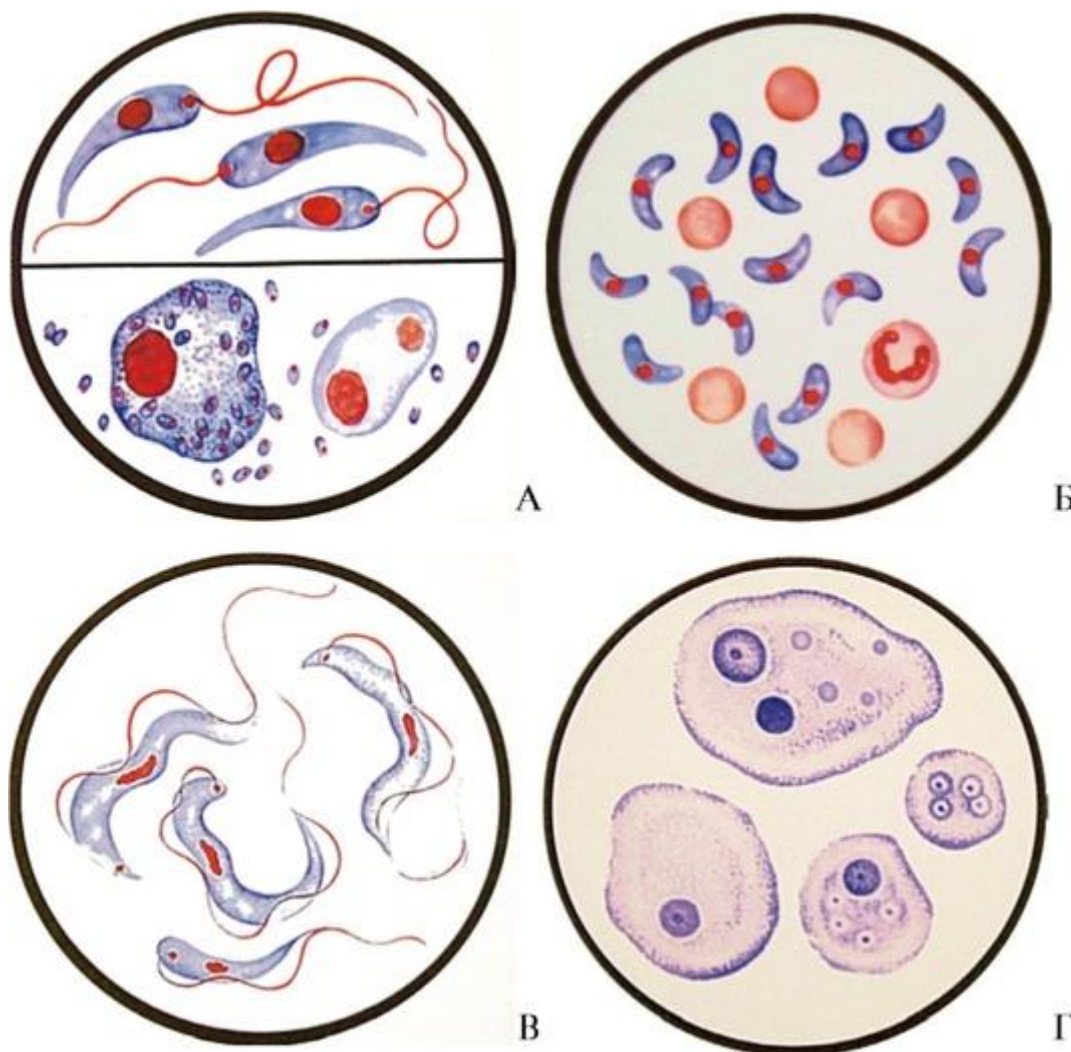


Рис. 2.12. Морфология простейших: А - лейшмании (вверху показана жгутиковая промастиготная форма, внизу - безжгутиковая амастиготная форма); Б - трипаносомы; В - токсоплазмы (окраска по Романовскому-Гимзе); Г - амёбы (окраска метиленовым синим)

2.5. МОРФОЛОГИЯ ВИРУСОВ. ПРИНЦИПЫ КЛАССИФИКАЦИИ И МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ МОРФОЛОГИИ ВИРУСОВ

Вирусы - мельчайшие микроорганизмы, которые не имеют клеточного строения, содержат только один тип нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) и относятся к царству *Vira*. Вирусы - облигатные внутриклеточные паразиты, так как лишены собственных ферментных систем для синтеза белков и генетически зависимы от клетки хозяина. Внеклеточная покоящаяся форма вируса называется *вирионом*.

Вирусы размножаются в цитоплазме или ядре клетки эукариотов (человека, животных, птиц или растений), а также в бактериальных клетках. Вирусы бактерий называют *бактериофагами*.

Вирусная частица состоит из нуклеиновой кислоты (различают ДНК- и РНК-содержащие вирусы) и белковой оболочки, называемой капсидом. Капсид построен из идентичных друг другу морфологических субъединиц - капсомеров. Нуклеиновая кислота и капсид образуют единую структуру - нуклеокапсид. Такое строение характерно для простых (безоболочечных) вирусов. У сложноорганизованных (оболочечных) вирусов капсид окружен дополнительной липопротеиновой оболочкой - суперкапсидом, являющимся производным мембранных структур клетки хозяина.

Капсомеры определенным образом расположены вокруг нуклеиновой кислоты, формируя различные типы симметрии - спиральный, икосаэдрический (кубический) и смешанный (сложный):

- спиральный тип симметрии обусловлен винтообразной структурой нуклеокапсида;
- кубический тип укладки капсомеров образует капсид в виде куба или сложного двадцатигранника - икосаэдра;
- смешанный тип симметрии характерен для бактериофагов: их нуклеокапсид обычно имеет форму куба (икосаэдра), а хвостовой отросток состоит из капсомеров, уложенных по спирали.

Размеры вирусов измеряют в нанометрах ($1 \text{ нм} = 10^{-3} \text{ мкм}$), и у разных представителей этого царства размеры составляют от 18-20 до 350-400 нм.

Форма вирионов также может быть различной (рис. 2.13):

- сферической (пикорнавирусы, аденовирусы);
- палочковидной (вирус табачной мозаики);
- пулевидной (рабдовирусы);
- нитевидной (филовирусы);
- кирпичеобразной (поксвирусы);
- в виде сперматозоида (бактериофаги) и др.

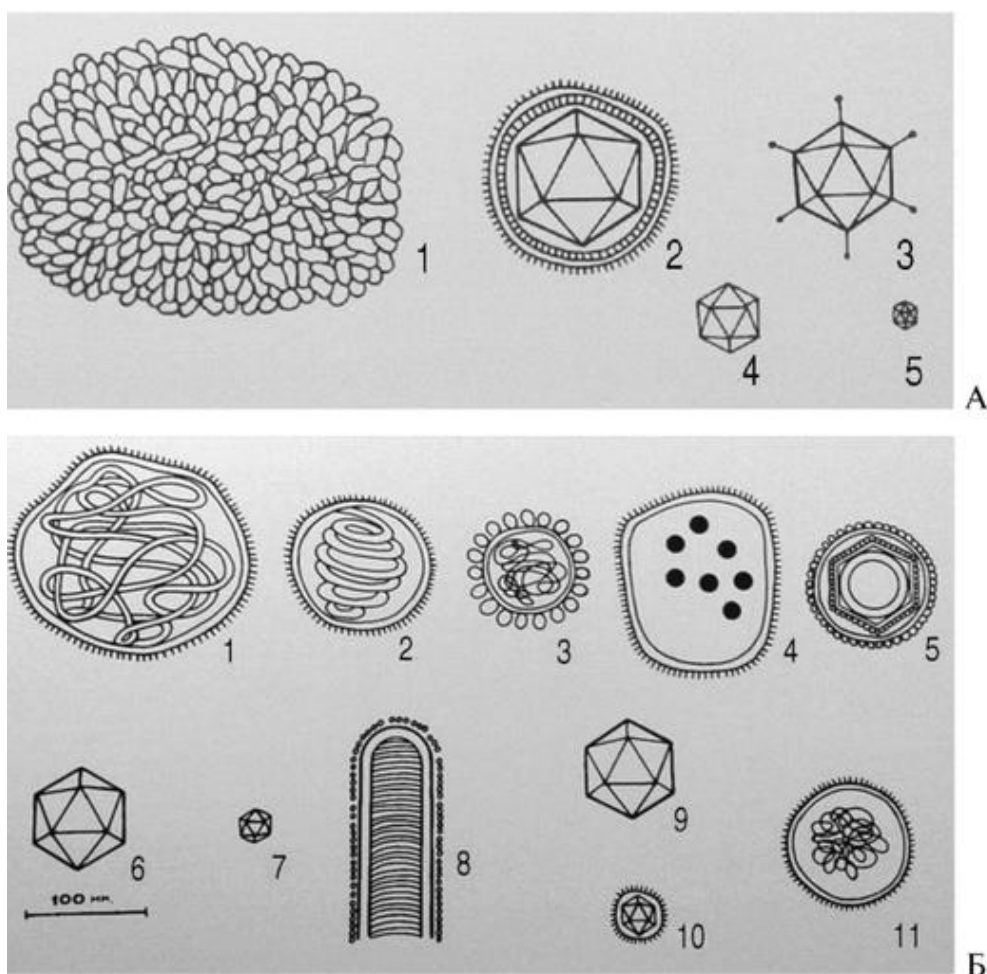


Рис. 2.13. Морфология вирусов. А - ДНК-содержащие вирусы: 1 - поксвирусы; 2 - герпес-вирусы; 3 - аденовирусы; 4 - папилломавирусы и полиомавирусы; 5 - парвовирусы

и цирциновирусы. Б - РНК-содержащие вирусы: 1 - парамиксовирусы; 2 - ортомиксовирусы; 3 - коронавирусы; 4 - аренавирусы; 5 - ретровирусы; 6 - реовирусы; 7 - пикорнавирусы; 8 - рабдовирусы; 9 - калицивирусы; 10 - тогавирусы; 11 - буньявирусы

В основу классификации вирусов положены следующие критерии:

- тип нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК), ее структура, количество нитей (одна или две);
- размеры вирионов;
- форма вирионов;
- количество капсомеров;
- тип симметрии;
- наличие наружной оболочки (суперкапсида);
- чувствительность к детергентам (эфир и дезоксихолату);
- место размножения в клетке;
- особенности воспроизводства («стратегии») вирусного генома;
- антигенные свойства и др.

Морфологию вирусов (размеры, форму, структурную организацию) изучают с помощью электронного микроскопа (см. раздел 2.6). Кроме того, можно окрасить некоторые вирусы методом серебрения по Морозову (например, поксвирусы) или обнаружить их внутри зараженных клеток с помощью люминесцентной микроскопии.

Неклеточные формы микробов представлены прионами - белковыми инфекционными частицами, вызывающими конформационные болезни со смертельным исходом, когда под их воздействием изменяется структура (конформация) нормального клеточного белка. Прионы вызывают у человека и животных так называемые медленные прионные инфекции (болезнь Крейтцфельда-Якоба, куру и др.).

Другие необычные агенты - вириды - небольшие молекулы кольцевой суперспирализованной РНК, не содержащие белка и вызывающие заболевания растений.

2.6. МЕТОДЫ МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ. ТЕХНИКА СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ С МАСЛЯНОЙ ИММЕРСИЕЙ

Микроорганизмы имеют размеры ниже разрешающей способности глаза, поэтому основной метод их исследования - микроскопия, позволяющая изучать морфологию и структуру микроорганизмов.

Для микробиологических исследований применяют несколько видов микроскопов (биологический, люминесцентный, электронный, конфокальный лазерный и др.), а также несколько методов микроскопии (световую, темнопольную, фазово-контрастную, просвечивающую и сканирующую электронную микроскопию и др.).

Световой микроскоп предназначен для изучения объектов размером не менее 0,2-0,3 мкм (это его предельная разрешающая способность). Он состоит из механической и оптической частей (рис. 2.14).

- *Механическая* часть микроскопа состоит из штатива, включающего основание и тубусодержатель, тубуса с револьвером для крепления объективов, предметного столика для закрепления препарата. В нижней части штатива-тубусодержателя находятся макро- и микровинты для грубой и тонкой настройки изображения путем перемещения столика или тубуса с объективами (в зависимости от модели).

- *Оптическая часть* микроскопа включает набор объективов на револьверной насадке, окуляров, конденсор с ирисовой диафрагмой, в некоторых моделях - двустороннее зеркало для направления лучей света непосредственно в линзу объектива. Большинство современных световых микроскопов оснащено встроенным осветителем и не комплектуется зеркалом.



Рис. 2.14. Устройство светового микроскопа (на примере микроскопа МИК-МЕД-5): 1 - окуляр; 2 - тубус; 3 - бинокулярная насадка; 4 - штатив-тубусодержатель; 5 - револьверная насадка; 6 - набор сухих и иммерсионных объективов; 7 - зажим для закрепления предметного стекла; 8 - предметный столик; 9 - координатный столик; 10 - конденсор с ирисовой диафрагмой; 11 - осветительное устройство; 12 - основание (подставка); 13 - винт плавного перемещения предметного столика по горизонтали/вертикали; 14 - тумблер включения осветителя; 15 - регулировка яркости осветителя; 16 - винт точной микрометрической настройки (микровинт). Винт грубой макрометрической настройки (макрвинт) расположен на противоположной стороне корпуса микроскопа

Применяют монокулярный (имеет один окуляр) и бинокулярный (имеющий два одинаковых окуляра) тубусы. Конденсор микроскопа предназначен для фокусировки

света от осветительного прибора на исследуемом препарате. Апертурная диафрагма необходима для правильного освещения препарата.

Общее увеличение микроскопа ориентировочно определяют произведением увеличения объектива на увеличение окуляра. Таким образом, в световом микроскопе при использовании иммерсионного объектива $\times 90$ или $\times 100$ и окуляра $\times 15$ возможно получить 1350-1500-кратное увеличение. Однако качество изображения определяется не максимальным увеличением, а разрешающей способностью микроскопа, т.е. возможностью различать отдельно две близко расположенные точки.

Объективы, расположенные на револьверной насадке, разделяют на сухие (увеличение до $\times 40$) и иммерсионные (погружные).

- При использовании сухого объектива между его фронтальной линзой и рассматриваемым препаратом находится воздух. Вследствие разницы показателей преломления предметного стекла и воздуха часть световых лучей не попадает в глаз наблюдателя, и объект остается недостаточно освещенным и плохо фокусируется.

- При применении погружных объективов используют иммерсионное масло, которое заполняет воздушное пространство между объектом на предметном стекле и фронтальной линзой объектива. Кедровое, вазелиновое, парафиновое и другие иммерсионные масла имеют коэффициент преломления, сходный с таковым у стекла. Благодаря этому достигаются наилучшее освещение объекта и хороший фокус на исследуемом объекте, так как лучи не рассеиваются, а собираются маслом и попадают прямо в объектив (рис. 2.15).

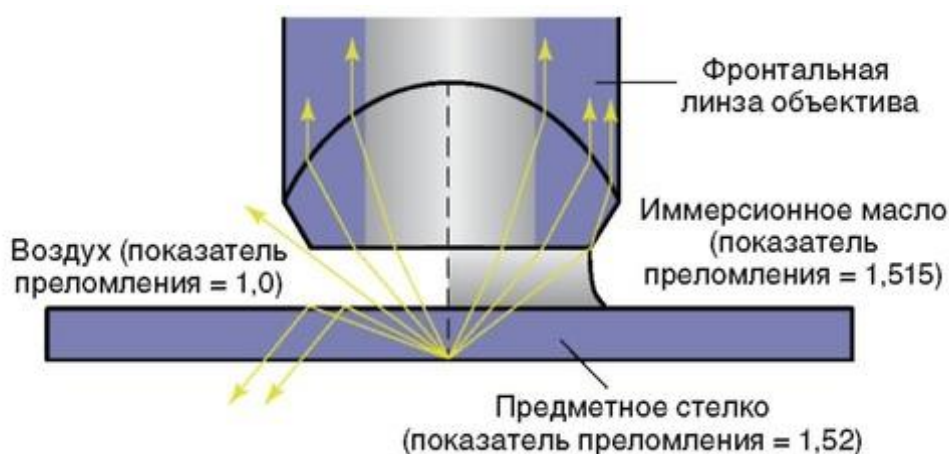


Рис. 2.15. Принцип работы иммерсионного объектива светового микроскопа (масляная иммерсия) (пояснения см. в тексте)

При обычной световой микроскопии (в том числе с масляной иммерсией) наблюдаемый объект рассматривается в проходящем свете. Поскольку микроорганизмы, как и другие биологические объекты, малоконтрастны, для лучшей видимости изучают окрашенные препараты.

Техника микроскопии с иммерсионной системой (см. рис. 2.14)

- Поднимают конденсор до уровня предметного столика, полностью открывают диафрагму.

- На сухое предметное стекло (лицевую сторону препарата) с окрашенным препаратом наносят небольшую каплю иммерсионного масла и помещают стекло с препаратом на предметный столик микроскопа, зафиксировав его специальным зажимом.

- Включают осветитель микроскопа.

- Поворачивают револьвер с объективами так, чтобы иммерсионный объектив располагался прямо над препаратом.
- Под визуальным контролем сбоку осторожно погружают иммерсионный объектив в каплю масла, вращая макровинт.
- Глядя в окуляр, макровинтом очень медленно поднимают объектив до появления изображения. При этом необходимо следить, чтобы объектив не вышел из капли масла.
- Проводят окончательную фокусировку препарата микровинтом, вращая его только в пределах одного оборота. При необходимости можно отрегулировать яркость освещения с помощью специального регулятора на станине микроскопа.

При темнопольной микроскопии нативных препаратов раздавленной или висячей капли пользуются обычными объективами и специальными конденсорами с затемненной центральной частью. При этом объекты освещаются косыми лучами или боковым пучком света, и в объектив микроскопа попадают только лучи, рассеянные объектами, находящимися в поле зрения. Именно поэтому наблюдатель видит эти объекты ярко светящимися на темном фоне. Темнопольную микроскопию применяют для прижизненного изучения трепонем, лептоспир, боррелий, при оценке подвижности бактерий (косвенное обнаружение жгутиков).

При фазово-контрастной микроскопии используют обычный микроскоп со специальными насадками (фазово-контрастное устройство: специальные конденсор и объектив) и осветителями. Эти приспособления позволяют увидеть в микроскоп прозрачные, неокрашенные объекты, не поглощающие свет вследствие усиления контраста изображения. При этом контраст может быть *позитивным* (наблюдается темное изображение объекта на светлом фоне) и *негативным* (светлый объект на темном фоне). Фазово-контрастную микроскопию используют для прижизненного изучения бактерий, грибов, простейших, клеток растений и животных. При некоторых исследованиях применяют так называемые инвертированные микроскопы с обратным расположением оптики: конденсор у таких устройств расположен сверху, а объективы - снизу.

Люминесцентная (флюоресцентная) микроскопия - метод световой микроскопии, основанный на явлении люминесценции микроорганизмов, т.е. способности объекта светиться при освещении невидимым ультрафиолетовым или синим светом. Для люминесцентной микроскопии обычно применяют специальные люминесцентные микроскопы, в которых используют мощный источник коротковолновой (ультрафиолетовой) части спектра, специальные светофильтры и оптику из нелюминесцирующих сортов оптического стекла. Микроорганизмы могут обладать собственной (обычно слабой) первичной люминесценцией, однако для ее усиления принято использовать специальные флюоресцирующие красители (флюорохромы). Люминесцентная микроскопия нашла широкое применение в микробиологии для обнаружения различных возбудителей инфекционных заболеваний (для ускоренной идентификации микроорганизмов), а также в различных цитохимических исследованиях. Помимо прямого флюорохромирования, применяют реакцию иммунофлюоресценции(РИФ), представляющую собой сочетание микроскопического метода с иммунологическим.

В электронном микроскопе вместо света используют поток электронов в глубоком вакууме. В роли своеобразных линз, фокусирующих электроны, выступает электромагнитное поле, создаваемое электромагнитными катушками. Разрешающая способность электронных микроскопов значительно выше, чем световых, и достигает 0,15 нм (1,5 А), что позволяет получить полезное увеличение в миллионы раз и наблюдать объекты, размеры которых лежат за пределами разрешающей способности светового

микроскопа. Электронную микроскопию применяют для изучения субмикроскопического строения вирусов, бактерий, грибов, простейших.

Наиболее часто выполняют просвечивающую (трансмиссивную) и сканирующую электронную микроскопию.

- *Просвечивающую электронную микроскопию* применяют для изучения ультратонких срезов микроорганизмов, тканей, а также строения мелких объектов (вирусов, органелл бактерий и др.).

- *Сканирующую электронную микроскопию* применяют для получения рельефного изображения поверхности объектов, однако при этом способе электронной микроскопии разрешающая способность приборов значительно ниже.

Использование электронной микроскопии в сочетании с иммунологическими методами обусловило развитие иммуноэлектронной микроскопии (ИЭМ), которая сыграла большую роль при диагностике вирусных гепатитов А и В, вирусных гастроэнтеритов и других заболеваний.

Вопросы для самоконтроля

1. Морфологическую форму, размеры и взаиморасположение бактерий изучают с помощью методов окраски.

2. Для окраски кислотоустойчивых бактерий используют метод ...

3. Метод Грама позволяет дифференцировать бактерии в зависимости от строения .

4. Метод Бури-Гинса используют для выявления .

5. Метод Ауески используют для выявления .

6. Темнопольную и фазово-контрастную микроскопию используют для микроскопии . препаратов.

Составьте пары «вопрос-ответ».

7. Дрожжи	А. Окраска по Романовскому-Гимзе
8. Гифальные грибы	Б. Электронная микроскопия
9. Простейшие	В. Окраска анилиновыми красителями
10. Вирусы	Г. Микроскопия в нативном состоянии

МОДУЛЬ 3. ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ

Цели модуля

- Знать: основные условия культивирования бактерий.
- Уметь: выделять чистую культуру бактерий.
- Владеть: методами посева на плотные и жидкие питательные среды.

3.1. УСЛОВИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БАКТЕРИЙ

Культивирование микроорганизмов проводят с различными целями: для выделения и изучения свойств возбудителя при диагностике инфекционных заболеваний, накопления биомассы при приготовлении вакцин и диагностикумов и др. Культивирование бактерий

возможно лишь при создании определенных условий для их жизнедеятельности. Для этого необходимо соблюдать ряд условий.

- Наличие полноценной *питательной среды*.

• *Температуру культивирования*, которая влияет на скорость размножения. По отношению к температуре роста бактерии разделяют на три основные группы - психрофилы, мезофилы и термофилы.

— *Психрофилы* живут и размножаются при пониженных температурах (от -10 до 20 °С).

— *Мезофилы* включают бактерии, температурный диапазон роста которых находится между 10 и 45 °С. Оптимальная температура для их культивирования - 25-37 °С.

— *Термофилы* способны расти при повышенных температурах (42-50 °С).

Для поддержания требуемой температуры используют специальные приборы - термостаты.

- *Атмосферу культивирования*.

— Для роста и размножения *строгих аэробов* необходим кислород. Аэробы хорошо растут на поверхности агара на чашках Петри или в тонком верхнем слое жидкой среды. *Факультативные анаэробы* культивируют в аналогичных условиях.

— *Микроаэрофилы*, нуждающиеся в пониженной концентрации кислорода, культивируют в атмосфере 5% CO₂ в специальных CO₂-инкубаторах либо посеvy помещают в эксикаторы, в которых устанавливают горящую свечу.

— *Облигатные анаэробы* для своего роста и размножения требуют исключения доступа кислорода воздуха.

• *Время культивирования* зависит от времени генерации. Большинство бактерий культивируют для получения видимого роста в течение 18-48 ч. Для ряда бактерий требуются более длительные сроки культивирования.

• *Освещение*. Для выращивания фототрофных микроорганизмов необходим свет. Некоторые условно-патогенные микобактерии в зависимости от освещенности образуют пигмент, что используют при их идентификации.

• *Условия, исключаящие попадание других видов бактерий*: использование стерильной посуды и стерильных питательных сред.

3.2. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

3.2.1. Основные требования, предъявляемые к питательным средам

• Каждая питательная среда должна содержать воду, так как все процессы жизнедеятельности бактерий протекают в воде.

• Для культивирования гетероорганотрофных бактерий в среде должен содержаться органический источник углерода и энергии (углеводы, аминокислоты, органические кислоты, липиды).

• Для биосинтетических процессов бактериям требуются источники азота, серы, фосфаты, микроэлементы. Источником азота служит пептон - продукт неполного гидролиза белков, который также поставляет аминокислоты для построения бактериальных белков; минеральные вещества бактерии способны утилизировать в виде неорганических солей.

- Поддержание определенного рН имеет значение для предотвращения гибели микроорганизмов от ими же образованных продуктов обмена.

- Среда должна обладать определенным осмотическим давлением. Большинство бактерий способно расти на изотоничных средах, изотоничность которых достигается добавлением раствора натрия хлорида в концентрации 0,87%.

- Питательные среды должны быть стерильными.

3.2.2. Классификация питательных сред

В зависимости от консистенции питательные среды могут быть:

- жидкими;
- полужидкими;
- плотными.

Плотность среды достигается добавлением агара. Агар - полисахарид, получаемый из водорослей. Он плавится при температуре 100 °С, но при охлаждении остывает при температуре 42-50 °С. Агар добавляют в концентрации 0,5% для полужидких сред и 1,5-2% для создания плотных сред.

Для посева крови (выделения гемокультуры) используют двухфазные среды (рис 3.1). Они состоят из слоя агара, покрывающего одну сторону флакона, и налитого в этот флакон обогащенного ростовыми факторами бульона.

Расплавленный агар разливают в чашки Петри по 10-15 мл, в пробирки - по 7-10 мл. Налитый в пробирки агар можно скосить для получения скошенного агара. Для этого после разлива агара пробирки кладут на наклонную поверхность до полного застывания агара (рис. 3.2).

По происхождению различают:

- *естественные среды* - готовят из овощей (картофеля), яиц, молока, сыворотки крови;

- *искусственные среды* - включают переработанные естественные продукты: мясную воду, печеночный перевар, мозговой экстракт; вещества, полученные из этих продуктов (пептон, дрожжевой экстракт);

- *синтетические среды* - создают из химических соединений с точным химическим составом.



Рис. 3.1. Двухфазная среда

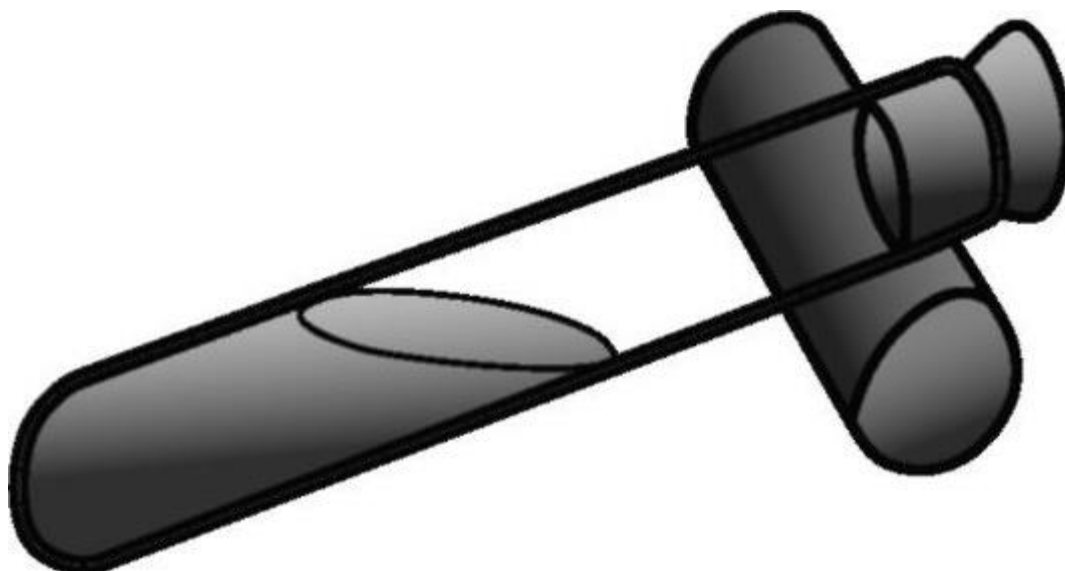


Рис. 3.2. Скошенный агар

В зависимости от состава и цели применения различают:

- *основные среды*;
- *специальные среды*, которые в зависимости от состава и цели применения разделяют на:
 - сложные;
 - элективные;
 - дифференциально-диагностические;
 - комбинированные.

К основным (простым, универсальным) средам относят пептонную воду, питательный бульон, мясопептонный агар. На основе этих простых сред готовят сложные среды, например сахарный и сывороточный бульоны, кровяной агар.

В зависимости от назначения специальные среды подразделяют на элективные, обогащения, дифференциально-диагностические.

- Под *элективными* понимают *среды*, на которых лучше растет какой-то определенный микроорганизм. Например, щелочной агар, имеющий $pH=9,0$, служит для выделения холерного вибриона. Другие бактерии, в частности кишечная палочка, из-за высокого pH на этой среде не растут.

- *Среды обогащения* стимулируют рост какого-то определенного микроорганизма, ингибируя рост других. Например, среда, содержащая селенит натрия, стимулирует рост бактерий рода *Salmonella*, ингибируя рост кишечной палочки.

- *Дифференциально-диагностические среды* служат для изучения ферментативной активности бактерий. Они состоят из простой питательной среды с добавлением субстрата, на который должен подействовать фермент, и индикатора, меняющего свой цвет в результате ферментативного превращения субстрата.

Комбинированные питательные среды сочетают в себе элективную среду, подавляющую рост сопутствующей микрофлоры, и дифференциальную среду, диагностирующую ферментативную активность выделяемого микроорганизма. Примером таких сред служат среда Плоскирева и висмут-сульфитный агар, используемые при выделении патогенных кишечных бактерий. Обе эти среды ингибируют рост кишечной палочки.

Прописи некоторых основных питательных сред приведены в приложении.

3.3. МЕТОДЫ ПОСЕВОВ НА ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

Инструменты для осуществления посевов: бактериологическая петля, шпатель, специальный ватный тампон (рис. 3.3).

Техника посева по Дригальскому. Посев осуществляют стерильным шпателем на три чашки Петри с плотной питательной средой. На середину первой чашки пипеткой или бактериологической петлей вносят исследуемый материал, который распределяют по поверхности чашки круговыми движениями, вращая приоткрытую чашку левой рукой. Не стерилизуя, шпатель переносят во вторую, а затем в третью чашку, проводя распределение истощенного материала по их поверхности (рис. 3.4).

Метод Коха (количественный метод). Готовят 10-кратные разведения исследуемого материала в стерильном физиологическом растворе. Отбирают по 1 мл из каждого разведения, которые вносят в пробирки с расплавленным и охлажденным до 45 °С агаром. После перемешивания содержимое пробирки выливают в стерильную чашку Петри.

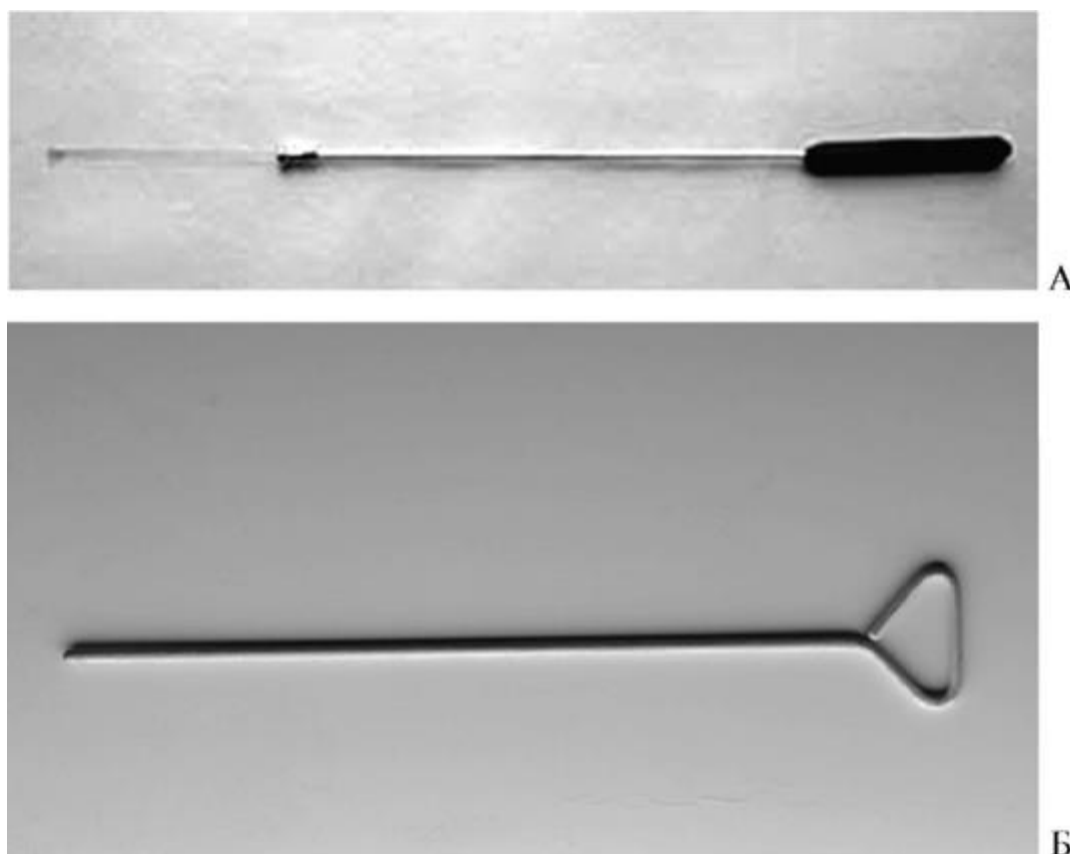


Рис. 3.3. Инструменты для осуществления посевов: А - бактериологическая петля; Б - шпатель

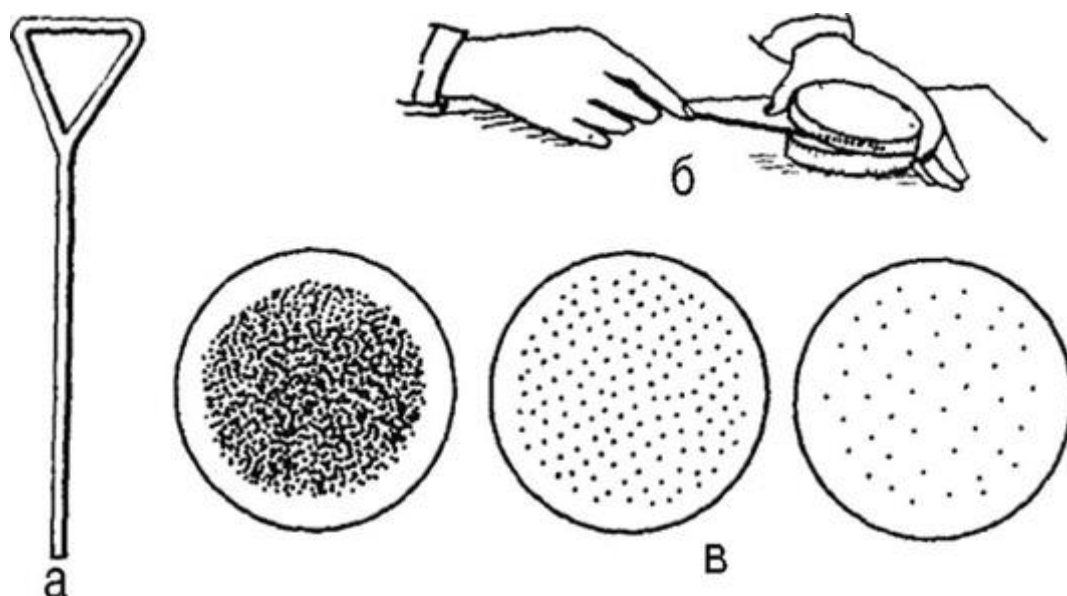


Рис. 3.4. Метод посева по Дригальскому: а - шпатель Дригальского; б - рассев; в - рост микроорганизмов после рассева

Техника посева петлей секторами. Чашку Петри делят на 4-5 радиальных секторов. Взяв материал стерильной петлей, делают посев одной петлей на всех секторах.

Техника посева петлей по Голду (см. в разделе 3.5).

Техника посева тампоном. Проводят тампоном по диагонали дорожку, затем петлей через дорожку делают засев по обе стороны от нее. Другой способ: тампон вносят к краю агара и круговыми движениями втирают материал с тампона.

Пересев колонии с чашки Петри в пробирку со скошенным агаром. Приподнимают крышку чашки Петри. Стерильной петлей отбирают колонию. Чашку закрывают. В левую руку берут пробирку со скошенным агаром, над пламенем открывают правой рукой пробку, прижимая ее мизинцем к ладони, вводят петлю в пробирку до дна в конденсационную воду, прикасаются к поверхности агара и делают посев штрихом по скошенной части агара. Края пробирки обжигают, закрывают пробкой над пламенем горелки.

Посев по методу Щукевича (для выделения подвижных бактерий). Петлю с отобранным материалом вносят в пробирку со скошенным агаром, не касаясь стекла и агара, в конденсационную воду, не распределяя материал по скосу агара. Пробирки помещают в термостат в вертикальном положении. Подвижные бактерии будут распространяться вверх по влажной поверхности скоса агара.

Посев в столбик полужидкого агара. Стерильной петлей забирают колонию, в левую руку берут пробирку со столбиком среды, над пламенем горелки открывают мизинцем правой руки пробку и производят укол петлей в среду с поверхности до дна пробирки. Пробирку закрывают пробкой над пламенем горелки.

Посев в жидкую среду. Петлю с инокулятом бактериальной культуры слегка погружают в жидкость и растирают посевной материал по стенке пробирки, после чего смывают его средой. Петлю извлекают, пробирку закрывают, проведя через огонь пробку, петлю прокалывают.

Выполненные посевы помещают в термостат с необходимой для культивирования температурой.

3.4. ФЕРМЕНТЫ БАКТЕРИЙ. ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ СРЕДЫ

Ферментативную активность бактерий изучают для идентификации выделенной чистой культуры бактерий, в частности, для установления возбудителя инфекционного заболевания, до рода и вида. Для этих целей используют различные дифференциально-диагностические среды, наиболее часто употребляемые из которых указаны в таблице 3.1 и на рисунках 3.5 -3.12.

Таблица 3.1. Дифференциально-диагностические среды, используемые для идентификации бактерий

Среда	Цель применения	Механизм действия	Внешний вид положительного результата
Цитратный агар Симмонса	Определяют способность бактерий утилизировать цитрат в качестве единственного источника углерода	Исходный цвет среды - зеленый. Если бактерии утилизуют цитрат, они растут на этой среде, защелачивая ее	Рост бактерий на среде, окрашивание ее в синий цвет (см. рис. 3.5)
Среда Клиглера	Определяют способность бактерий ферментировать глюкозу, лактозу и продуцировать сероводород	Содержит глюкозу (0,1%), лактозу (1%), индикатор фенолрот, сульфат железа, тиосульфат натрия. Сероводород образуется из тиосульфата натрия под действием бактериального фермента	Ферментация глюкозы - желтый столбик. Ферментация лактозы - желтый скок. Образование сероводорода - почернение среды (см. рис. 3.6). При образовании сероводорода индикаторная бумажка чернеет

Продолжение табл. 3.1

Среда	Цель применения	Механизм действия	Внешний вид положительного результата
		тиосульфатредуктазы. Образованный сероводород взаимодействует с сульфидом железа, образуя сульфид железа черного цвета. Вследствие малого количества глюкозы при неспособности бактерий ферментировать лактозу глюкоза быстро расходуется в скошенной части среды, и на ней начинает утилизироваться пептон, в результате защелачивается среда, окрашиваясь в розовый цвет. Продукцию сероводорода можно определить с помощью индикаторной бумажки,	

		пропитанной ацетатом свинца	
Проба на индол	Определяют способность бактерий продуцировать индол	Под влиянием бактериального фермента триптофаназы, присутствующего в среде, триптофан распадается на индол, аммиак и пировиноградную кислоту. Индол образует с реактивом диметиламинобензальдегидом соединение красного цвета. Индолообразование можно определить также с помощью индикаторной бумажки, пропитанной щавелевой кислотой, укрепленной под пробкой пробирки с питательным бульоном (проба Мореля)	Добавление к среде диметиламинобензальдегида (реактива Ковача) вызывает образование кольца красного цвета (см. рис. 3.7). В случае индолообразования индикаторная бумажка краснеет

Продолжение табл. 3.1

Среда	Цель применения	Механизм действия	Внешний вид положительного результата
Среда с мочевиной	Определяют способность бактерий продуцировать уреазу	Продуцируемая бактериями уреазы расщепляет мочевины (диаминкетон) на аммоний и углекислый газ. Аммоний защелачивает среду, изменяя цвет индикатора фенолрота	Среда приобретает розовый цвет (см. рис. 3.8)
Среда Кларка	Глюкозо-фосфатный бульон, используемый для определения у микроорганизмов отношения к реакциям метилрота и Фогеса-Проскауэра	Среда содержит пептон, глюкозу и гидрофосфат калия. При сильном закислении среды в результате ферментации глюкозы муравьинокислым брожением появляется красная окраска. Если в результате ферментации глюкозы образуется ацетоин (ацетилметилкарбинол), то добавление альфа-нафтола в щелочной среде приводит к образованию бордовой окраски	Реакцию ставят в парных пробирках, по окончании роста бактерий в одну из них закапывают индикатор метилрот, а в другую - КОН и альфа-нафтол. Образование красной окраски с индикатором метилротом свидетельствует о положительной реакции метилрота (см.рис. 3.9). Появление бордового цвета после добавления КОН и альфа-нафтола свидетельствует о положительной реакции Фогеса-Проскауэра (см. рис. 3.10)

Среды Гисса	Определяют сахаролитические свойства бактерий	Набор пробирок с питательной средой в жидкой или полужидкой форме, в каждую из которых добавлены определенный углевод (сахар) и индикатор, меняющий окраску в кислой среде. В пробирки с жидкой средой вкладывают стеклянный поплавок	При ферментации сахаров происходит образование газа и кислот, которые понижают рН, что приводит к изменению цвета индикатора. Газообразование учитывают по образованию пузырьков в полужидкой среде или газа в поплавке
-------------	---	---	---

Продолжение табл. 3.1

Среда	Цель применения	Механизм действия	Внешний вид положительного результата
Среды с лизином, аргинином и орнитином	Тест на декарбоксилазную активность	Используют питательные среды с добавлением диаминоаминокислот (лизина, аргинина и орнитина) и индикатора, меняющего окраску в щелочной среде	При расщеплении диаминоаминокислот образуются амиины и CO ₂ , которые защелачивают среду, изменяя окраску индикатора
ФА-тест	Тест на фенилаланиндезаминазную активность	В результате окислительного дезаминирования фенилаланина образуется фенилпировиноградная кислота	Для выявления бесцветной фенилпировиноградной кислоты на поверхность посева добавляют хлорид железа, с которым фенилпировиноградная кислота образует темное окрашивание (см. рис 3.11)
Проба Пизу	Определение цистионазной активности	В столбик питательного агара с цистином и ацетатом свинца уколом засевают исследуемую культуру. Посев инкубируют при температуре 37 °С	При расщеплении цистина образуется сульфид свинца, в результате происходит почернение по ходу посева (см. рис 3.12)
Желатиновый тест	Бактерии, выделяющие фермент желатиназу, вызывают гидролиз аминокислот, входящих в	Бактериальную культуру засевают в столбик с 1012% мясо-пептонного желатина	Разжижение может иметь различные формы (воронкообразную, перевернутой елочки и

	желатину		др.)
ОФ-тест	Определяют механизм утилизации глюкозы по ферментативному или окислительному пути	Бактериальную культуру засевают уколом в две пробирки с окислительно-ферментативной средой, содержащей питательный агар, глюкозу, индикатор бромтимол синий. Одну пробирку поверх агара заливают вазелиновым маслом.	Изменение окраски среды только в пробирке без масла свидетельствует об окислительном пути утилизации глюкозы. Изменение окраски в обеих пробирках свидетельствует о преобладании бродильных процессов.

Окончание табл. 3.1

Среда	Цель применения	Механизм действия	Внешний вид положительного результата
		Посевы инкубируют в термостате при температуре 37 °С в течение 3-4 сут	Отсутствие изменения цвета среды свидетельствует об отсутствии утилизации глюкозы

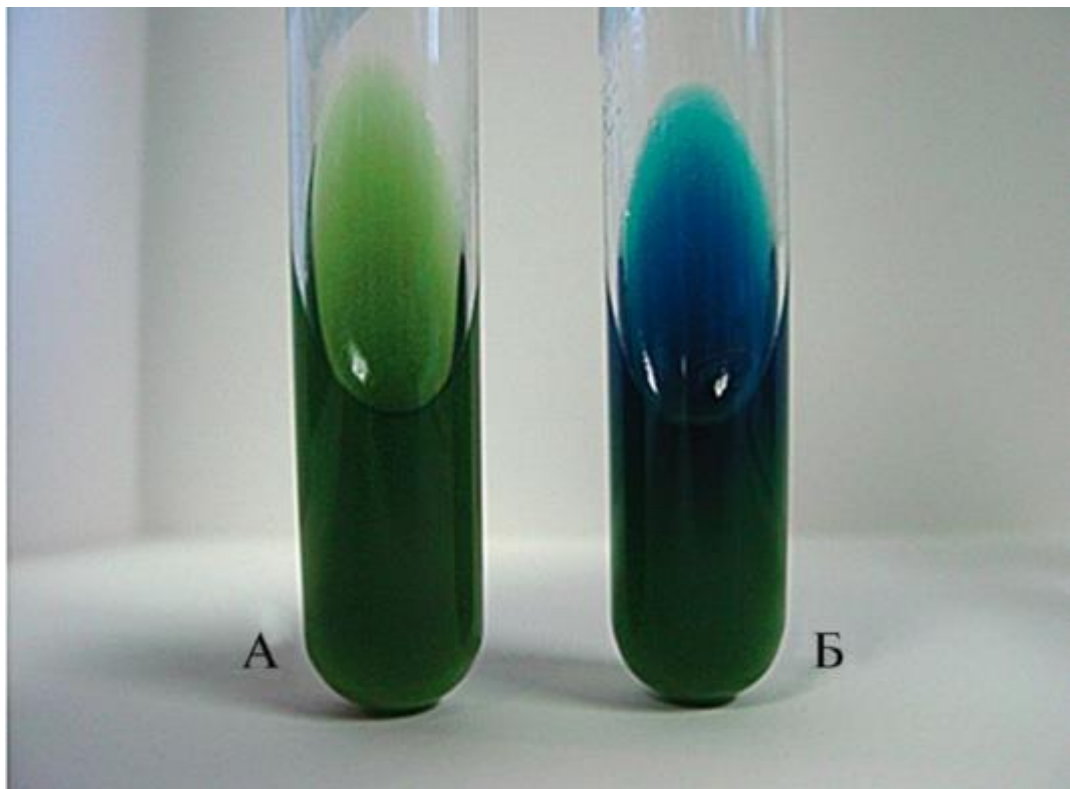


Рис. 3.5. Утилизация цитрата на среде Симмонса: А - до посева; Б - положительный результат



Рис. 3.6. Определение способности продуцировать сероводород и ферментировать глюкозу и лактозу на среде Клиглера: 1 - ферментация глюкозы и лактозы; 2 - ферментация глюкозы и отсутствие ферментации лактозы; 3 - продукция сероводорода, отсутствие ферментации лактозы; 4 - среда до посева

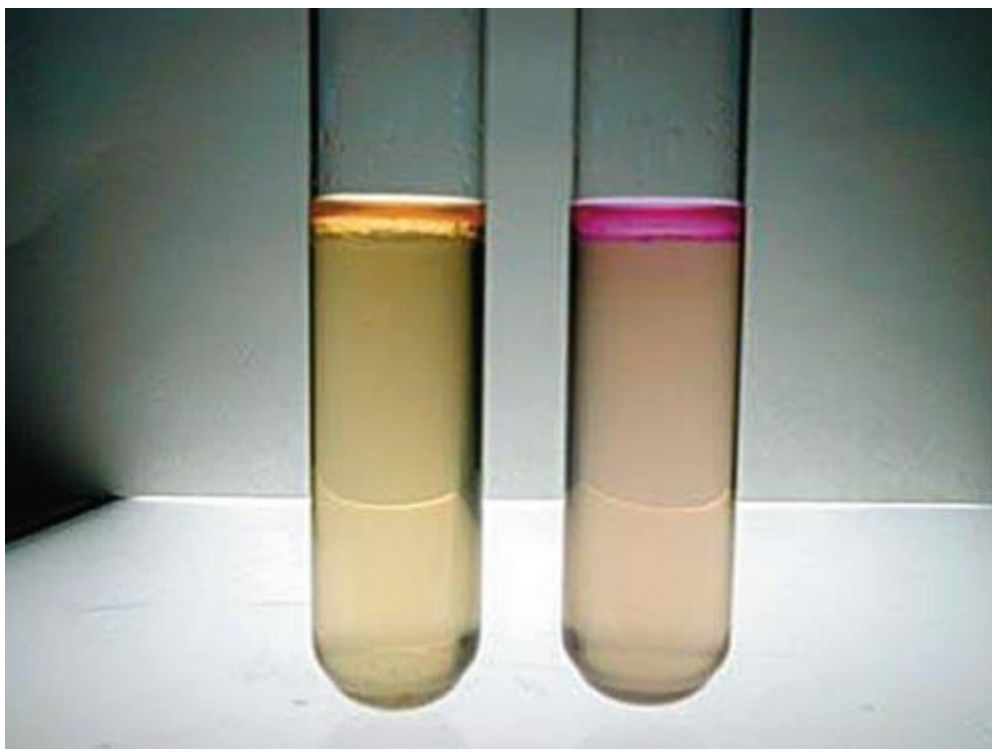


Рис. 3.7. Определение продукции индола с помощью реактива Ковача

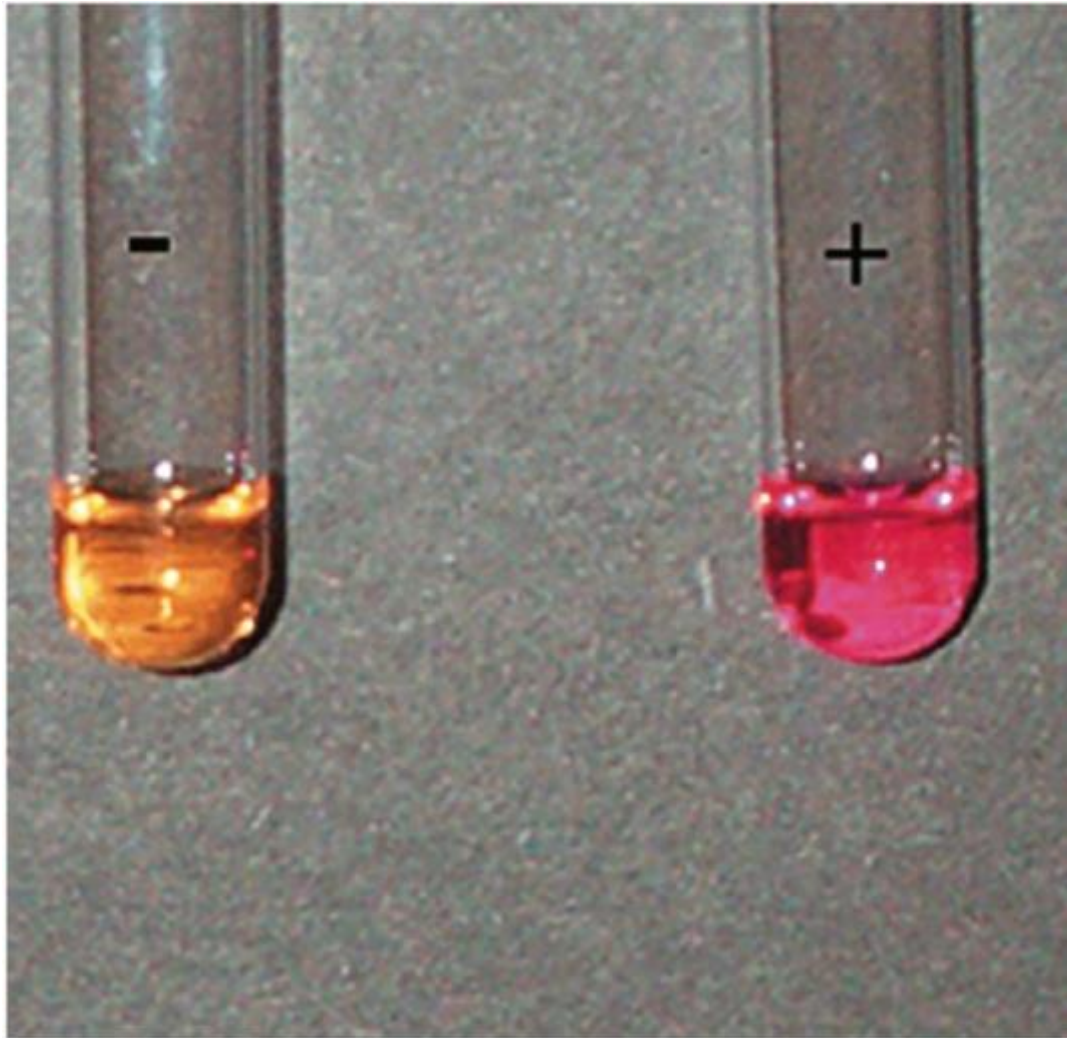


Рис. 3.8. Расщепление мочевины (тест на уреазу)

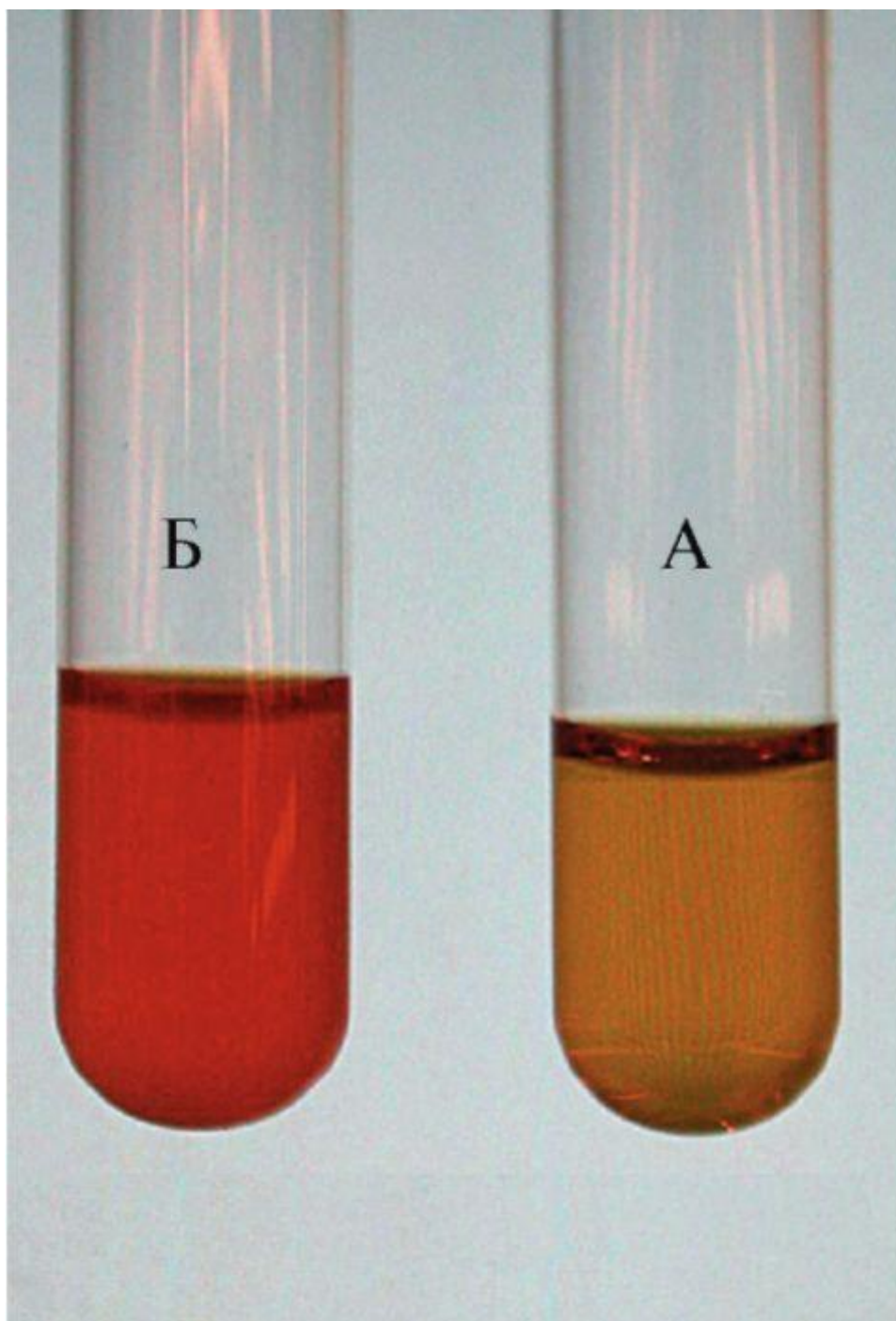


Рис. 3.9. Реакция метилрота: А - до посева; Б - положительный результат

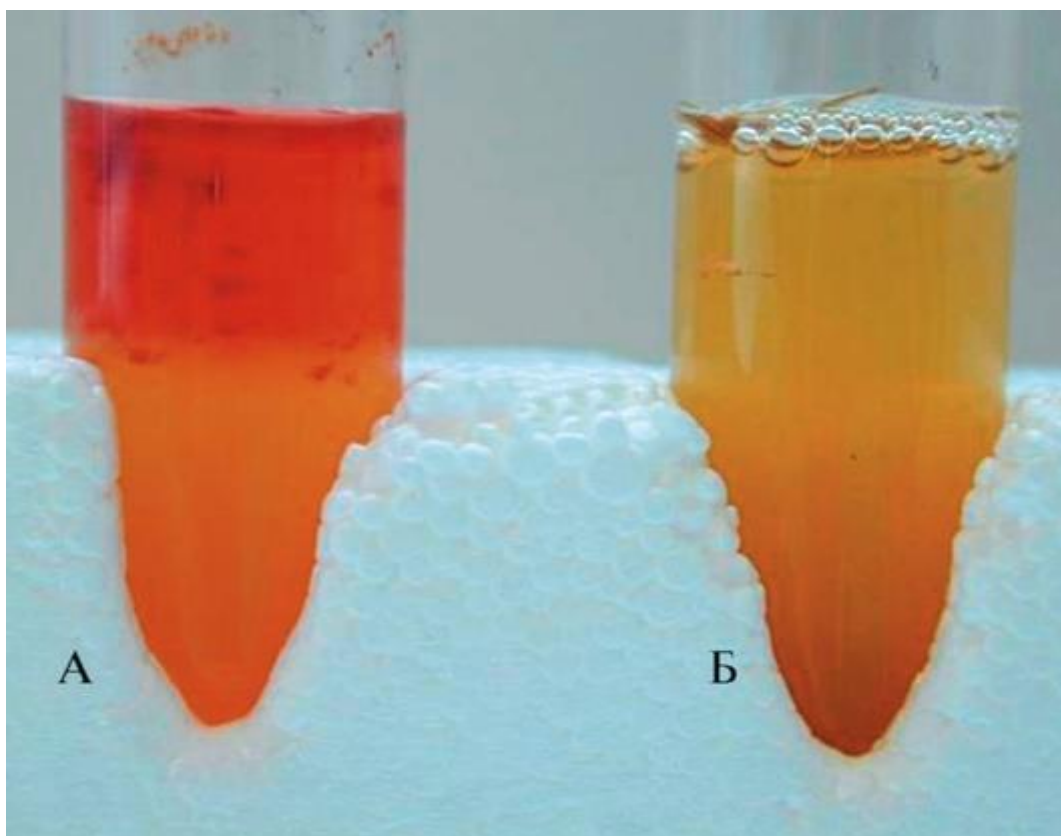


Рис. 3.10. Реакция Фогеса-Проскауэра: А - положительный результат; Б - отрицательный результат

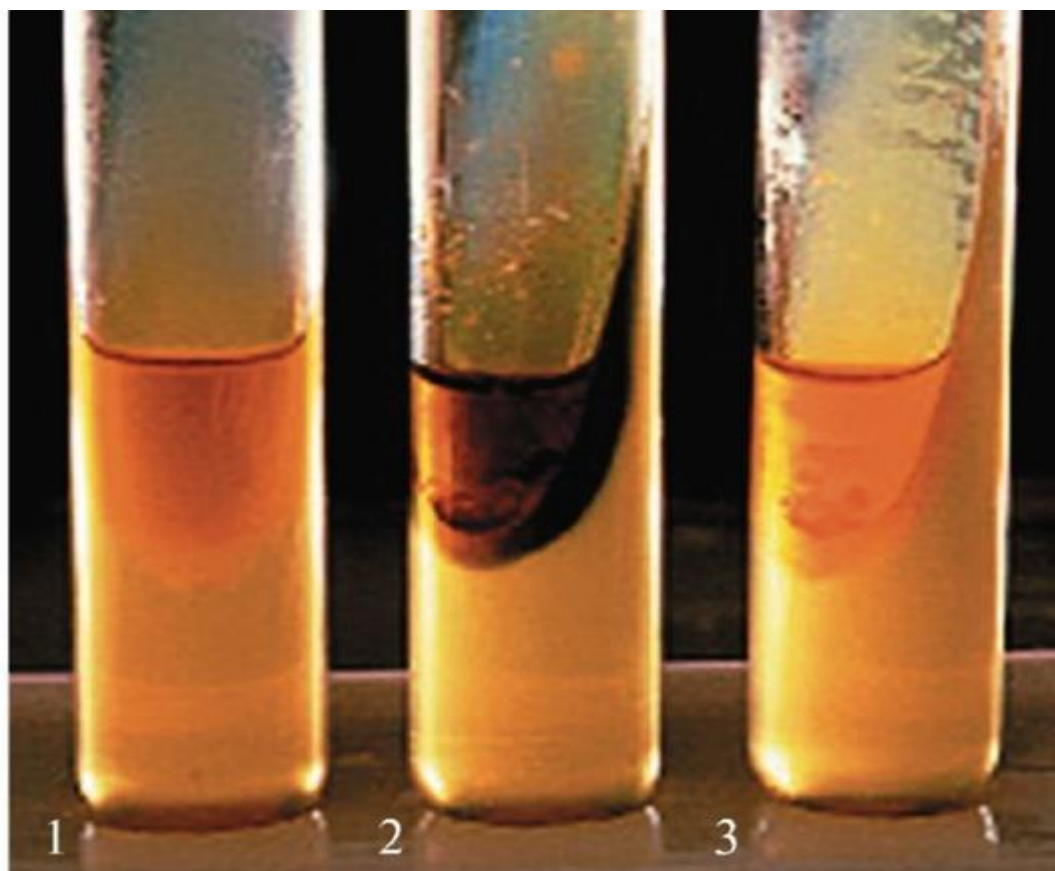


Рис. 3.11. Тест на фенилаланиндеаминазу: 1 - до посева; 2 - положительный результат; 3 - отрицательный результат



Рис. 3.12. Положительная проба Пизу

В настоящее время для биохимической идентификации бактерий часто вместо дифференциально-диагностических сред используют готовые тест-системы - полистероловые или картонные планшеты с лунками, в которые помещены сухие дифференциально-диагностические среды или субстраты, на которые должен подействовать искомый бактериальный фермент (рис. 3.13). Идентификацию выделенной чистой культуры в тест-системах проводят следующим образом.

- Из выделенной чистой культуры готовят бактериальную суспензию в физиологическом растворе или в прилагаемом буфере.
- Проводят инокуляцию приготовленной суспензии в лунки планшета.
- Инкубируют (обычно при температуре 37 °С в течение 18-24 ч).
- Оценивают результат по изменению окраски дифференциально-диагностических сред в планшете.



Рис. 3.13. Тест-система для биохимической идентификации бактерий

Помимо изучения ферментативной активности, с помощью дифференциально-диагностических сред для идентификации бактерий определяют ферменты, принимающие участие в процессах получения энергии: каталазу, нитратредуктазу, оксидазу.

- Каталаза расщепляет перекись водорода на молекулярный кислород и воду. Этим ферментом обладают облигатные аэробы и факультативные анаэробы. Для определения каталазы в пробирку с 2 мл жидкой бактериальной культуры добавляют несколько капель 3% перекиси водорода. Появление пузырьков газа свидетельствует о наличии каталазы.

- Нитратредуктаза восстанавливает нитрат в нитрит, при этом нитрат используется конечным акцептором электронов в процессе неокислородного нитратного дыхания, которое характерно для факультативных анаэробов. Определение нитритов проводят крах-мало-йодной реакцией, основанной на том, что в кислой среде нитриты окисляют йодистый калий с выделением йода, который при взаимодействии с крахмалом образует синее окрашивание. Для этого культуру выращивают в питательном бульоне с добавлением в него KNO_3 , к 2-3 мл культуры добавляют 1 мл реактива, состоящего из равных объемов 10% H_2SO_4 и раствора, содержащего в 100 мл воды 0,5 г йодистого калия и 1 г крахмала. При положительном результате наблюдают синюю окраску.

- Оксидаза имеется у бактерий с аэробным типом дыхания. Для ее определения на поверхность выросшей на плотной среде бактериальной культуры добавляют несколько капель 1% спиртового раствора альфа-нафтола, 1% водного раствора метола. Появление лиловой окраски свидетельствует о положительной реакции.

3.5. ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ БАКТЕРИЙ

В природе микроорганизмы существуют в смешанных популяциях. Для изучения свойств микроорганизмов, определения их систематического положения необходимо, прежде всего, изолировать отдельные виды микроорганизмов и вырастить их в виде чистой культуры.

Чистыми культурами бактерий называют культуры, полученные из одной клетки, их выделение - основа всей микробиологической техники. Основу современных методов выделения чистых культур бактерий составляют принципы, заложенные Р. Кохом. Сущность их заключается в получении культуры бактерии из отдельной колонии, которую считают результатом развития одной клетки. Для получения роста отдельных колоний исследуемый материал необходимо механически разобщить. Этого достигают использованием нескольких методов посева (посевом штрихом, посевом петлей по методу Голда, методом предварительного серийного разведения материала, посевом шпателем по Дригальскому). Весь процесс в целом занимает 3-4 дня и состоит из четырех этапов.

- I - посев исследуемого материала в целях получения отдельных колоний.
- II - проводят учет роста колоний на питательной среде и изучение их культуральных свойств (таких как величина, цвет, форма колоний, их прозрачность, характер поверхности, однородность структуры). Изучение культуральных свойств заканчивают приготовлением мазка из колонии и окраской его по Граму, определяя при этом морфологические и тинкториальные свойства бактерии. После этого делают пересев на скошенный агар или чашку Петри для накопления чистой культуры.

- III - проверяют чистоту накопленной культуры (готовят мазок, окрашивают его по Граму и микроскопируют); если накопленная культура чистая, ее идентифицируют по биохимическим свойствам, антигенной структуре. Для биохимической дифференциации используют дифференциально-диагностические среды, содержащие различные субстраты или специальные тест-системы.

- IV - оценивают результаты биохимических исследований, по ним определяют таксономическое положение микроорганизма, что является основой антигенной идентификации.

Первый день исследования

Исследуемый материал отбирают петлей диаметром 2 мм и засевают на чашку Петри с питательной средой по методу Голда. Для этого чашку Петри со стороны дна предварительно расчерчивают на четыре квадрата. В первом квадрате делают посев исследуемого материала 20-30 штрихами. Петлю прожигают и проводят четыре перпендикулярных штриха из материала первого квадрата во второй квадрат. Петлю снова прожигают и проводят четыре перпендикулярных штриха из второго квадрата в третий, захватывая последовательно материал от первого, затем второго штриха, далее - третьего и четвертого штрихов. Посевы помещают в термостат с температурой 37 °С на 24 ч.

Второй день исследования

Засеянные чашки вынимают из термостата и изучают выросшие на питательной среде колонии. Вначале проводят описание характера роста колоний на питательной среде, т.е. их культуральные свойства. Описание проводят по следующей схеме.

- Форма колонии: круглая, неправильной формы, розоидная и др.
- Поверхность колонии: гладкая, шероховатая, морщинистая и др.
- Профиль колонии: плоский, выпуклый, кратерообразный.
- Блеск и прозрачность: матовая, блестящая, прозрачная, полупрозрачная, непрозрачная.
- Цвет колонии: бесцветная или пигментированная.
- Край колонии: ровный, волнистый, зубчатый (изучают при малом увеличении микроскопа).
- Структура колонии: однородная, неоднородная.
- Консистенция колонии: мягкая, тягучая, слизистая, хрупкая.

Результат описания культуральных свойств заносят в таблицу (табл. 3.2).

Таблица 3.2. Форма таблицы для описания результатов культуральных свойств колонии

Форма колонии	Поверхность колонии	Профиль колонии	Блеск и прозрачность	Цвет колонии	Край колонии	Структура колонии	Консистенция колонии
---------------	---------------------	-----------------	----------------------	--------------	--------------	-------------------	----------------------

После изучения культуральных свойств выросшей колонии из ее половины готовят мазок, который окрашивают по методу Грама, микроскопируют, определяя морфологические и тинкториальные свойства колонии.

После определения культуральных, морфологических и тинкториальных свойств выросшей колонии вторую ее половину пересевают на скошенный агар или чашку Петри с плотной питательной средой, посев помещают в термостат.

Третий день исследования

Проверяют чистоту выделенной культуры, для чего приготавливают из посева мазок, который окрашивают по Граму и микроскопируют. Если выделенная культура чистая, приготавливают из нее суспензию в физиологическом растворе. Для этого с посева на чашке Петри отбирают 3-5 колоний и ресуспендируют в 5 мл физиологического раствора. Если культура выделена на скошенном агаре, физиологический раствор наливают в пробирку с посевом и, вращая пробирку между ладонями, делают смыв, который стерильной пипеткой переносят в чистую стерильную пробирку. Полученную взвесь засевают на дифференциально-диагностические среды или специальную тест-систему для биохимической идентификации. Помимо идентификации по биохимическим свойствам, при идентификации кокковых форм бактерий определяют:

- активность плазмокоагулазы (в пробирку с 1 мл цитратной плазмы кролика помещают 2-3 петли культуры стафилококка; пробирку помещают в термостат, результат фиксируют на следующие сутки, проверяя образование сгустка);
- чувствительность к желчи, антибиотик бацитрацину (для идентификации стрептококков); и антибиотик новобиоцину (при идентификации стафилококков), для чего делают пересев выделенной культуры на кровяной агар, на поверхность которого помещают диски, пропитанные вышеперечисленными веществами.

Четвертый день исследования

Проводят учет биохимической активности выделенной чистой культуры. По специальным схемам определяют таксономическое положение выделенной чистой культуры. При необходимости проводят внутривидовую идентификацию для эпидемиологического маркирования рутинными (фаготипированием, колицинотипированием, определением хемоваров) или молекулярными методами. Также определяют чувствительность выделенной чистой культуры к антибиотикам (при необходимости проводят серотипирование выделенной чистой культуры).

При выделении чистых культур можно использовать методы, основанные не только на механическом разобщении, но и на различии их биологических свойств (метод Щукевича, использование селективных питательных сред, атмосферы культивирования). Также используют комбинированный способ, сочетающий механическое и биологическое разобщение. Для выделения чистой культуры бактерий и одновременного определения концентрации этого вида бактерий в исследуемом материале перед посевом проводят серийные разведения этого материала в физиологическом растворе.

3.6. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ АНАЭРОБОВ

Для культивирования анаэробных микроорганизмов необходимо создать бескислородные условия. Этого достигают несколькими методами.

3.6.1. Физические методы

Физические методы основаны на создании вакуума в специальных аппаратах - анаэростатах (рис. 3.14). Анаэростат представляет собой металлический толстостенный цилиндр с хорошо притертой крышкой, снабженной отводным краном и манометром. После помещения в цилиндр засеянных чашек или пробирок крышку плотно закрывают и удаляют воздух с помощью вакуумного насоса (иногда воздух заменяют каким-либо другим газом, например CO_2).



Рис. 3.14. Анаэростат

Доступ кислорода в питательную среду можно затруднить, если культивировать анаэробы в глубоких столбиках сахарного агара или среды Вильсона-Блера, налитых в пробирки в расплавленном состоянии и охлажденных до температуры 46°C.

3.6.2. Химические методы

Химические методы заключаются в том, что при культивировании на жидких питательных средах в них добавляют редуцирующие кислород вещества - аскорбиновую или тиогликолевую кислоту. Тиогликолевая среда - универсальная среда для накопления анаэробных бактерий. Для этих целей можно использовать среду Китта-Тароцци, которая состоит из сахарного бульона, налитого в количестве 10 мл в пробирку; на ее дно помещают кусочек вареных паренхиматозных органов (печени), который связывает растворенный в среде кислород, адсорбируя его на себе. Перед употреблением среду кипятят на водяной бане для удаления кислорода, сверху заливают вазелиновым маслом.

Следует помнить, что при культивировании анаэробов в пробирках они обязательно должны быть закрыты стерильными резиновыми пробками.

В случае культивирования анаэробных бактерий на плотных питательных средах посеvy помещают в герметически закрытые емкости, в которые вносят поглотители кислорода, например пирогаллол или гидросульфит натрия. В настоящее время для этих целей используют систему *Gas Pak*.

Система *Gas Pak* (рис. 3.15) состоит из двух основных компонентов: герметично закрывающегося пластикового контейнера *Gas Pak* с прозрачными стенками и газорегенерирующих пакетов одноразового применения. При вынимании этих пакетов из упаковки происходит их активация, в результате которой создаются анаэробные условия.



Рис. 3.15. Система *Gas Pak*

3.6.3. Биологический метод (метод Фортнера)

Биологический метод основан на одновременном культивировании строгих аэробов и анаэробов на плотной среде в чашках Петри, которые герметически закупоривают. Вначале кислород поглощается строгим аэробом, растущим на одной половине чашки, а затем начинается рост анаэробов, материал на которые посеян на другой половине чашки.

При выделении чистой культуры анаэробных бактерий рост изолированных колоний можно получить при рассеивании исследуемого материала по поверхности сахарно-красящего агара и другой специальной среды для культивирования анаэробов, разлитых в чашки Петри. После посева чашки помещают в анаэроостат или *Gas Pak* и вносят в термостат. После инкубации выросшие колонии пересевают на тиогликолевую среду или среду Китта-Тароцци.

Вопросы для самоконтроля

1. Микроаэрофилы культивируют в атмосфере .
2. Мезофильные бактерии культивируют при температуре .
3. Метод Фортнера используют для ...
4. Элективные среды используют для .
5. Идентификацию выделенной чистой культуры по биохимическим свойствам проводят с помощью .
6. Определение количества бактерий в единице объема исследуемого материала проводят методом ...

МОДУЛЬ 4. БАКТЕРИОФАГИ. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Цели модуля

- Знать: структуру бактериофага и его свойства; свойства генома бактерий; молекулярно-генетические методы обнаружения и идентификации микроорганизмов.
- Уметь: проводить фаго- и колицинотипирование бактериальной культуры.
- Владеть: знаниями об условиях применения молекулярно-генетических методов исследований.

4.1. БАКТЕРИОФАГИ

4.1.1. Получение фаголизатов

Принцип метода. Для получения лизата фага чувствительные бактерии заражают фагом и инкубируют, чтобы произошло размножение фага в бактериальной клетке с последующим ее лизисом. Для окончательного разрушения клеточной стенки добавляют хлороформ. Затем проводят центрифугирование. Отбирают надосадочную жидкость (фаголизат), которую хранят на холоде в закрытой резиновой пробке пробирке или пробирке с завинчивающейся крышкой.

Методика

- 0,2 мл бульонной культуры *E. coli* засевают в 20 мл L-бульона (1% пептон, 0,5% дрожжевой экстракт, 0,5% раствор натрия хлорида при температуре 37 °С, 0,1% глюкоза) и аэрируют в течение 2,5 ч при температуре 37 °С до достижения концентрации 10^8 клеток/мл.

- Добавляют фаголизат в соотношении 1:10 и продолжают аэрацию до тех пор, пока культуральная среда не просветлеет.
- Добавляют несколько капель хлороформа, встряхивают, оставляют на несколько минут.
- Проводят центрифугирование при 3000 об./мин в течение 25 мин. Отбирают надосадочную жидкость.

4.1.2. Определение титра фага методом агаровых слоев по Грацию

Принцип метода. На поверхность плотного слоя питательного агара в чашке Петри наносят смесь фаголизата и чувствительной бактерии в полужидком агаре. Чашку инкубируют. За время инкубации каждая бактерия, присутствующая в посевном материале, образует маленькую колонию, и на поверхности агара образуется сплошной рост бактерий. Фаговые частицы, присутствующие в смеси, заражают бактерии, размножаются в них и лизируют бактериальные клетки, из которых высвобождается новое поколение фагов. Этим фаги заражают соседние бактерии. Процесс размножения фага и бактериального лизиса повторяется снова и снова, таким образом, на бактериальном газоне появляются зоны лизиса в виде бляшек. При низкой множественности заражения каждая бляшка (стерильное пятно) образуется одной фаговой частицей.

Методика

- Пробирки с 0,5% агаром в объеме 5 мл помещают в водяную баню при температуре 45 °С для расплавления.
- Готовят разведения фаголизата в физиологическом растворе - 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} .
- По 0,1 мл каждого разведения фаголизата вносят в пробирки с расплавленным 0,5% агаром.
- В эти же пробирки вносят по 0,1 мл бактериальной культуры, выращенной в L-бульоне.
- Хорошо перемешивают содержимое пробирок (вращая между ладонями) и выливают на мясо-пептонный агар (МПА), равномерно распределяя по поверхности чашки.
- После того как верхний слой агара застынет, чашки подписывают и помещают в термостат на 24 ч.
- На следующие сутки подсчитывают количество бляшек (стерильных пятен), определяют титр фага по формуле:
число бляшек / разведение фага \times 0,1 (объем внесенного фаголизата).

4.2. МЕТОДЫ ВНУТРИВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ (ЭПИДЕМИЧЕСКОГО МАРКИРОВАНИЯ)

4.2.1. Фаготипирование

Фаготипирование - один из методов эпидемиологического маркирования, применяют для выявления источника инфекции. Выделенные бактерии одного фаготипа от разных больных указывают на общий источник их заражения. Методика (рис. 4.1)

- 3-4-часовую бульонную культуру засевают газонем на чашку Петри с питательным агаром.
- Чашку подсушивают при температуре 36 °С в течение 30 мин.

- Дно чашки расчерчивают на квадраты по числу используемых фагов. В каждый квадрат петлей диаметром 2 мм или стерильным наконечником дозатора объемом 5-10 мкл наносят каплю суспензии соответствующих диагностических, типоспецифических бактериофагов.

- После каждого нанесения петлю прожигают, а наконечник заменяют.

- После подсыхания капель чашки инкубируют при температуре 37 °С в течение суток.

- После инкубации наблюдают стерильные зоны отсутствия роста бактерий в результате размножения бактериофагов, вызывающих лизис этих бактерий.

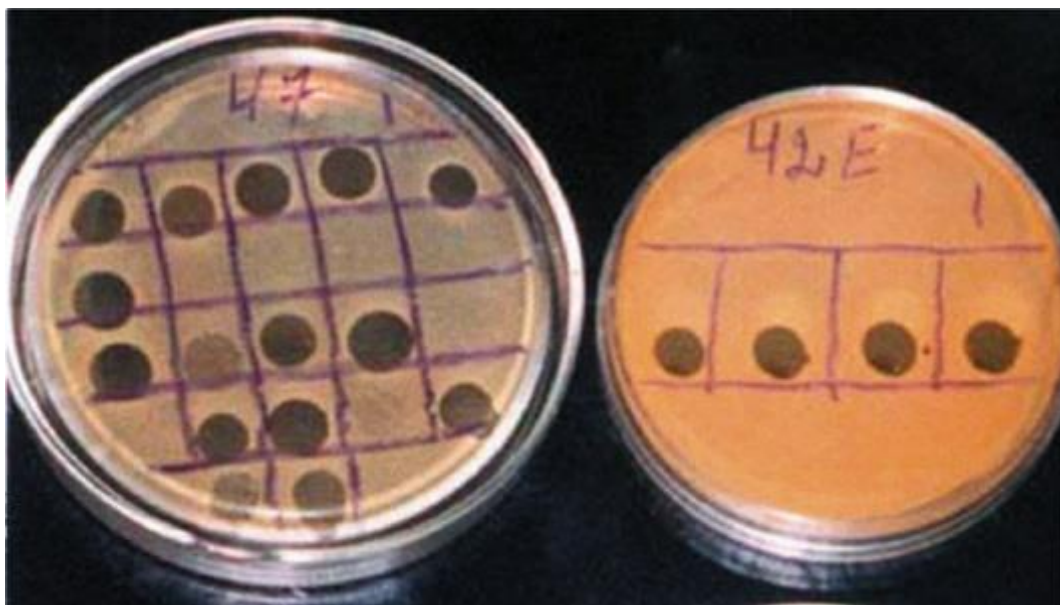


Рис. 4.1. Фаготипирование

4.2.2. Определение продукции колицинов по Фредерику

Определение колицинотипов используют для эпидемического маркирования бактерий.

Методика

- Испытуемые культуры (продуценты колицинов) засевают уколом в питательный агар по 4-5 штаммов на чашку Петри.

- После инкубации в течение 24 ч при температуре 37 °С проводят убивание выросших культур. Для этого чашку переворачивают вверх дном и на внутреннюю поверхность крышки наливают 5 капель хлороформа. Чашку с посевом помещают на крышку дном кверху. Через 30 мин хлороформ с крышки чашки удаляют, давая ему высохнуть, оставив чашку открытой.

- Поверхность агара заливают 5 мл расплавленного и охлажденного до температуры 48 °С 0,5% агара, к которому добавлено 0,1 мл бульонной индикаторной культуры.

- Чашки инкубируют при температуре 37 °С в течение суток.

Результаты учитывают по образованию зон ингибирования роста вокруг укольчатого посева испытуемой культуры.

4.2.3. Исследование плазмидного профиля бактерий

У многих видов бактерий в бактериальной клетке имеются добавочные генетические элементы, плазмиды, размеры которых составляют 1,5-200 мДа и более

(1500-4000 × 10³ пар оснований). В одной бактериальной клетке может находиться до 10 плазмид с различной молекулярной массой, если эти плазмиды относятся к разным группам совместимости. Несовместимость плазмид связана с их неспособностью сохраняться стабильно в одной клетке совместно. Несовместимость присуща тем плазмидам, которые обладают высоким сходством репликационных, поддержание которых в клетке регулируется одним и тем же механизмом. Именно поэтому явление несовместимости объясняется подавлением репликации ДНК или нарушением распределения реплицированных плазмид между дочерними клетками.

Известно более 80 групп совместимости плазмид. Плазмиды, принадлежащие разным группам совместимости, не мешают друг другу стабильно существовать в одной клетке. Количество плазмид в бактериальной клетке определяет ее плазмидный профиль.

Типирование по плазмидному профилю проводят на основании состава и молекулярной массы плазмид, которые определяют электрофорезом плазмидной ДНК в агарозном геле.

После электрофоретического разделения плазмид в агарозном геле гель окрашивают бромистым этидием и фотографируют в УФ-излучении.

Длина электрофоретического пробега плазмиды находится в обратно пропорциональной зависимости от ее молекулярной массы. Для определения молекулярной массы исследуемой плазмиды электрофорез исследуемой плазмидной ДНК проводят параллельно с электрофорезом ДНК плазмиды с известной молекулярной массой. Плазмиду с известной молекулярной массой называют реперной плазмидой. Молекулярную массу (ММ) плазмиды определяют по формуле:

ММ плазмиды = (длина пробега реперной плазмиды / длина пробега исследуемой плазмиды) × ММ реперной плазмиды.

Плазмидный профиль бактериальных штаммов используют в качестве эпидемиологического маркера. Анализ плазмидного профиля проводят для определения общности происхождения штаммов.

Определение плазмидного профиля по Лиу и Кадо

Материалы и оборудование:

- пробирки «Эппендорф»;
- стеклянные «зубочистки»;
- водяная баня;
- центрифуга;
- оборудование для горизонтального электрофореза.

Реактивы:

- ТЕ-буфер (10 мМ ТРИС, 2 мМ ЭДТА, рН=8,1);
- лизирующий буфер (5 мМ ТРИС, 1% SDS, 0,04N NaOH);
- смесь фенола с хлороформом в соотношении 1:1;
- лидирующий краситель - бромкрезоловый зеленый;
- бромистый этидий.

Ход исследования

• Осадок из центрифугата ночной культуры бактерий (центрифугирование при 5000 об./мин в течение 15 мин) или колонию с плотной питательной среды ресуспендируют в 100 мкл ТЕ-буфера.

- В полученную взвесь добавляют 200 мкл лизирующего буфера.
- Полученную смесь помещают в водяную баню (56-65 °С на 40-30 мин соответственно).
- Добавляют равный объем смеси фенола с хлороформом (1:1).
- Перемешивают на мешалке типа «Vortex» в течение 30 с.
- Центрифугируют (12 000 об./мин в течение 12 мин).
- 50-75 мкл первой фазы смешивают с 5 мкл лидирующего красителя и полученной смесью заполняют ячейку геля для электрофореза.
- Параметры электрофореза выставляют согласно документации по использованию имеющегося оборудования.
- Окрашивают полученный гель в растворе бромистого этидия 1-3 мин.
- Отмывают в дистиллированной воде 10-15 мин.

4.2.4. Рестрикционный анализ (метод «отпечатков пальцев»)

Основу данного метода составляет особенность механизма действия ферментов - рестриктаз.

Рестриктазы - эндонуклеазы, которые расщепляют молекулу ДНК, разрывая фосфатные связи не в произвольных местах, а в определенных последовательностях нуклеотидов. Особое значение в молекулярной биологии имеют рестриктазы, которые узнают последовательности, обладающие центральной симметрией, и считываются одинаково в обе стороны от оси симметрии:

- ГАА ТТЦ;
- ЦТТ ААГ.

Точка разреза ДНК может совпадать с осью симметрии, а может быть сдвинута относительно нее.

В настоящее время из различных бактерий выделено и очищено более 175 различных рестриктаз, для которых известны сайты рестрикции (узнавания), выявлено более 80 типов сайтов, в которых может происходить разрыв двойной спирали ДНК.

В геноме конкретной таксономической единицы находится строго определенное (генетически детерминированное) число участков узнавания для определенной рестриктазы.

Если выделенную из конкретного микроорганизма ДНК обработать определенной рестриктазой, это приведет к образованию строго определенного количества фрагментов ДНК фиксированного размера.

Размер каждого типа фрагментов можно узнать с помощью электрофореза в агарозном геле: мелкие фрагменты перемещаются в геле быстрее более крупных, и длина их пробега больше. Гель окрашивают бромистым этидием и фотографируют в УФ-излучении. Таким образом, получают рестрикционную карту микроорганизма («отпечаток пальца»).

Сопоставляя карты рестрикции, выделенные из различных штаммов, можно определить их генетическое родство, определить принадлежность к определенной таксономической единице, а также выявить участки, подвергнутые мутациями. Этот метод используют также как начальный этап определения последовательности нуклеотидных пар (секвенирование) и метода молекулярной гибридизации.

4.2.5. Риботипирование

Риботипирование применяют для выявления у изучаемых штаммов различий в количестве рибосомальных оперонов, а также рестрикционного полиморфизма их нуклеотидных последовательностей.

Ход исследования

- Исследуемую ДНК подвергают действию рестриктазы.
- Продукты рестрикции разделяют электрофорезом в полиакриламидном геле.
- Разделенные фрагменты наносят на мембраны и обрабатывают ДНК-зондами, кодирующими 16S и 23S РНК.

В результате гибридизации зонда с фрагментами ДНК, содержащими копии рРНК-оперонов (в бактериальной хромосоме имеются многочисленные опероны, содержащие гены 16S и 23S РНК), образуется профиль, содержащий до 10 полос, обладающий видовой и штаммовой специфичностью, который исследуют в автоматическом режиме.

4.2.6. Мультилокусное секвенирование-типирование

Метод генетического типирования основан на определении последовательностей нуклеотидов небольших фрагментов (500 н.п.) ряда генов и последующем сравнении соответствующих последовательностей у разных микроорганизмов. Чаще всего анализу подвергают гены «домашнего хозяйства», которые необходимы для протекания реакций основного метаболизма и, следовательно, присутствуют у всех микроорганизмов. В силу своей исключительной важности они характеризуются низкой скоростью накопления мутаций.

Сравнение нуклеотидных последовательностей таких генов позволяет относительно легко устанавливать степень филогенетического родства между популяциями и систематизировать их. Чаще исследуют 7-8 локусов, что обеспечивает достаточную разрешающую способность метода.

Этапы исследования

- Выделяют ДНК из образца исследуемого микроорганизма.
- Проводят амплификацию определенных локусов ПЦР с использованием подходящих праймеров.
- Проводят анализ амплификации участков с помощью секвенаторов.
- Проводят сравнение полученных результатов секвенирования с помощью специальных программ с результатами, имеющимися в базе данных.

4.3. МЕТОДЫ ОБНАРУЖЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ БЕЗ ВЫДЕЛЕНИЯ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ

4.3.1. Полимеразная цепная реакция

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) позволяет быстро амплифицировать *in vitro* нужную последовательность ДНК из какого-либо выбранного участка генома более чем в миллион раз при условии, что хотя бы часть этой нуклеотидной последовательности известна. Участки данной последовательности, которые ограничивают (фланкируют) выбранную для амплификации область (размером 50-2000 нуклеотидов), используют для создания двух химически синтезированных олигонуклеотидов (праймеров), каждый из которых комплементарен участкам ДНК из противоположных цепей, ограничивающих последовательность ДНК-мишени (рис. 4.2).

Метод ПЦР обладает высокой чувствительностью, позволяющей определить наличие в изучаемой пробе одной молекулы ДНК.

ПЦР применяют также для определения в исследуемом материале РНК, которую переводят в последовательность ДНК с помощью фермента обратной транскриптазы. В этом случае реакцию называют ОТ-ПЦР (ПЦР с обратной транскрипцией).

Для проведения ПЦР необходимы следующие компоненты:

- два синтетических олигонуклеотидных праймера размером около 20 нуклеотидов, которые комплементарны участкам из противоположных цепей, ограничивающих искомую последовательность ДНК-мишени. Их 3'-концы после отжига ДНК должны быть ориентированы друг к другу (см. рис. 4.2);

- ДНК-мишень (исследуемый материал, содержащий предполагаемую ДНК микроорганизма);

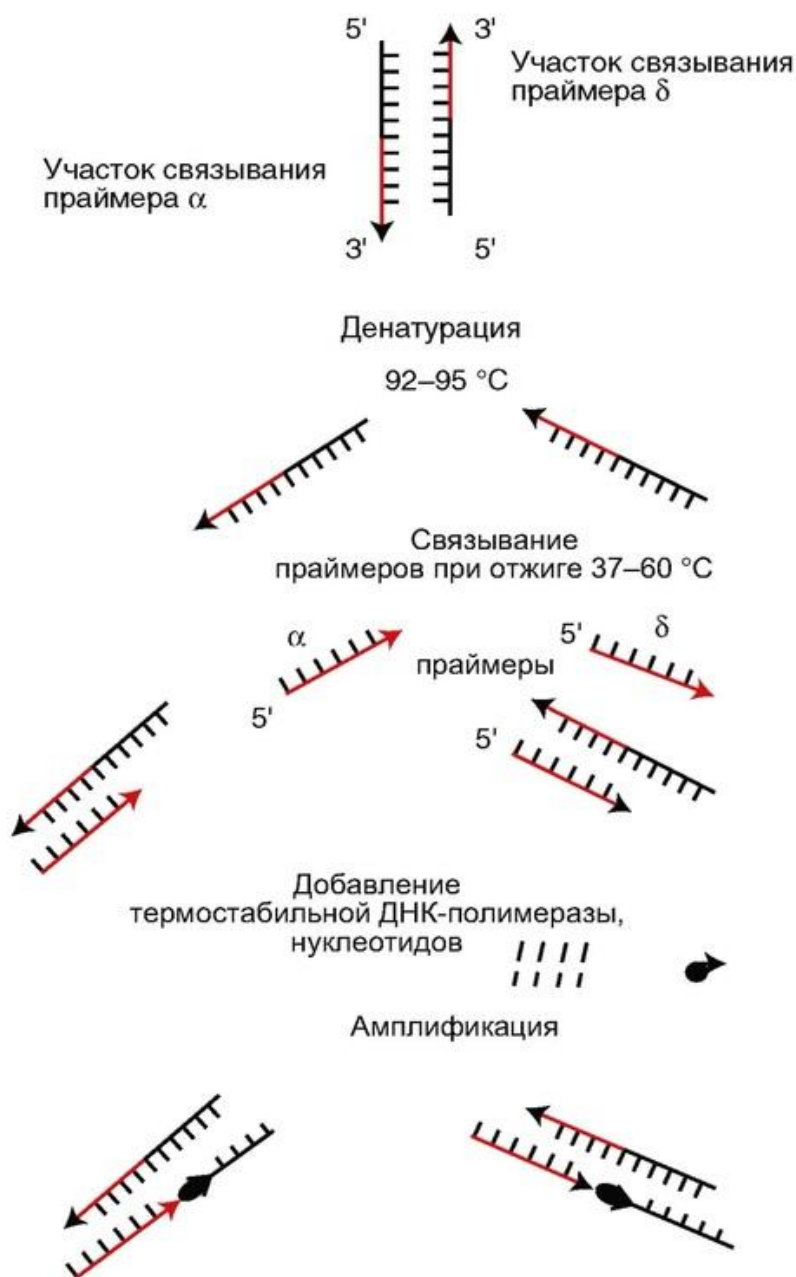


Рис. 4.2. Полимеразная цепная реакция (схема). Эти праймеры служат специфическими затравками при синтезе ДНК, осуществляемом ДНК-полимеразой, и определяют концы получаемого в ходе ПЦР фрагмента ДНК

- термостабильная ДНК-полимераза (Таg-полимераза);
- 4-дезоксирибонуклеотид фосфат.

В каждом цикле ПЦР вначале проводят непродолжительное прогревание ДНК-мишени для разведения двух цепей двойной спирали (т.е. плавление ДНК, или тепловую денатурацию) при температуре 95 °С.

Затем следует медленное охлаждение ДНК до температуры 54-68 °С в присутствии значительного избытка двух праймеров, что приводит к специфической гибридизации этих затравок с комплементарными участками ДНК-мишени с образованием дуплексов (проведение отжига или ренатурации).

После отжига с праймерами реакцию инкубируют с термостабильной Таg-полимеразой и четырьмя дезоксирибонуклеозид-трифосфатами при температуре 72-75 °С.

В результате синтезируются те участки цепей ДНК, которые расположены в 5'-3'-направлении от каждого праймера-затравки. Для эффективной амплификации нужного фрагмента ДНК необходимо проведение 25-30 циклов реакции (каждый цикл занимает 3-5 мин). В каждом последующем цикле количество фрагментов ДНК удваивается.

ПЦР проводят в программированных аппаратах - амплификаторах, где смена температурных режимов и их поддержание с высокой точностью осуществляются автоматически (рис. 4.3).



Рис. 4.3. Амплификатор

Исследуемым материалом для ПЦР могут служить соскобы эпителиальных клеток, кровь, плазма, сыворотка, плевральная и спинномозговая жидкости, моча, мокрота, биоптаты. Забор образцов следует проводить с помощью стерильного (желательно одноразового) инструментария только в одноразовые стерильные пластиковые пробирки.

Собранные образцы могут храниться при комнатной температуре не более 2 ч. При необходимости более длительного хранения пробы помещают в холодильник при температуре 2-8 °С на срок не более суток. Более длительное хранение (до 2 нед) допускается в замороженном виде при температуре -20 °С. Не допускают повторного замораживания-оттаивания проб.

Проведению ПЦР предшествует стадия выделения ДНК из исследуемого материала. В настоящее время используют несколько способов подготовки образца к проведению ПЦР.

Процедура подготовки пробы включает лизис микроорганизма и экстракцию нуклеиновой кислоты. В целях разрушения клетки используют простое кипячение, замораживание-оттаивание в присутствии лизоцима, а также специальные лизирующие буферы, содержащие детергенты и протеиназу.

Для экстракции ДНК используют два основных метода:

- классическую процедуру фенольно-хлороформной экстракции, при которой осуществляется хорошая очистка ДНК от ингибиторов Tag-полимеразы;
- применение сорбентов, в качестве которых могут использоваться покрытые силикагелем магнитные частицы.

Способ выделения ДНК зависит как от вида возбудителя, так и от вида клинического образца. В случае использования осадка мочи и эпителиального соскоба широкую распространенность получил метод твердофазной сорбции, заключающийся в добавлении лизирующего агента, содержащего раствор гуанидина, сорбции ДНК на сорбенте, многократной отмывке и ресорбции ДНК буферным раствором. В случае использования сыворотки, плазмы и цельной крови для экстракции ДНК используют метод фенольной экстракции, который включает депротенинизацию смеси фенола с хлороформом с последующим осаждением ДНК этанолом или изопропанолом. Обработку материала проводят в микроцентрифужных пробирках «Эппендорф» объемом 1,5 мл.

Детально метод выделения ДНК описан в инструкциях по использованию соответствующих наборов реагентов.

Реакцию проводят в пробирках «Эппендорф» объемом 0,2 или 0,5 мл. Образец вносят в пробирку, добавляют амплификационную смесь, состоящую из воды, ПЦР-буфера, раствора праймеров, дезоксирибонуклеотидов и Tag-полимеразы. Обычный объем реакционной смеси составляет 25 мкл. Затем в пробирку добавляют каплю минерального масла для предотвращения испарения реакционной смеси. Пробирку переносят в амплификатор; время проведения - 2-3 ч. Параллельно с опытными пробами ставят контрольные:

- положительный контроль, который содержит все материалы, но вместо клинического образца вносят контрольный препарат ДНК искомого возбудителя;
- отрицательный контроль содержит все компоненты реакции, но вместо образца клинического материала вносят деионизированную воду.

Специфический ПЦР-продукт определяется электрофоретическим разделением реакционной смеси на окрашенном бромистым этидием агарозном или полиакриламидном геле. Бромистый этидий образует с фрагментами ДНК устойчивое соединение, проявляющееся в виде светящихся полос при УФ-облучении геля с длиной волны 290-330 нм. Полосы фиксируют с помощью УФ-подсвечивания в трансиллюминаторе с последующим фотографированием.

4.3.2. Полимеразная цепная реакция в реальном времени

Полимеразная цепная реакция в реальном времени позволяет проводить мониторинг и количественный анализ накопленных продуктов ПЦР, а также регистрировать и интерпретировать полученный результат в автоматическом режиме. Этот метод не требует проведения электрофореза. Для реакции в реакционную смесь вводят дополнительный олигонуклеотидный гибридизационный зонд, который комплементарно соединяется с ДНК на участке амплификации между прямым и обратным праймерами (рис. 4.4).

На разных концах этого зонда расположены флюорофор и тушитель флюоресценции красителя флюорофора. Когда флюорофор и тушитель связаны с олигонуклеотидом, наблюдается лишь незначительная флюоресцентная эмиссия. Во время процесса амплификации за счет 5'-экзонуклеазной активности Tag-полимеразы флюоресцентная метка переходит в раствор, освобождаясь от соседства с тушителем, и генерирует флюоресцентный сигнал, усиливающийся в реальном времени пропорционально накоплению амплификата.

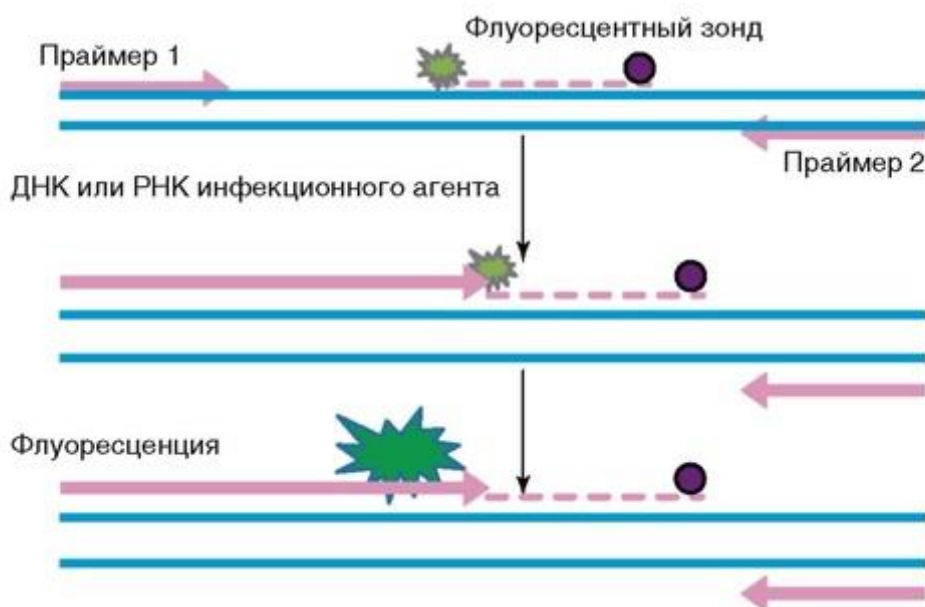


Рис. 4.4. Полимеразная цепная реакция в реальном времени (схема)

4.3.3. Лигазная цепная реакция

Лигазная цепная реакция (ЛЦР) основана на способности фермента ДНК-зависимой ДНК-лигазы сшивать (лигировать) разрывы фосфодиэфирной связи в ДНК в присутствии АТФ и ионов магния. Для этого синтезируют две пары олигонуклеотидов (праймеров), комплементарные нуклеотидной последовательности определенного фрагмента ДНК-мишени. Эти праймеры при гибридизации с нитями ДНК-мишени примыкают друг к другу на каждой цепи и разделены одноцепочечным разрывом (рис. 4.5). При этом 3'-конец одного праймера должен содержать свободную 3'-ОН-группу, а в 5'-положении конца последующего олигонуклеотидного праймера, следующего за ним, должна находиться фосфатная группа.

В первом цикле ЛЦР указанные праймеры отжигаются с исследуемой денатурированной ДНК (как и при ПЦР) в присутствии термостабильной ДНК-лигазы. Реакционную смесь прогревают до температуры, оптимальной для лигирования, после чего между присоединенными праймерами образуется фосфодиэфирная связь. Затем температуру реакционной смеси повышают до температуры плавления ДНК.

Во втором цикле температуру реакционной смеси понижают до температуры отжига. Олигонуклеотидные праймеры, которые находятся в молярном избытке по отношению к освободившемуся продукту реакции, полученному в предыдущем цикле, гибридизируются с анализируемой ДНК. Далее связавшиеся праймеры снова лигируют, и образовавшийся продукт реакции высвобождается из гибрида повышением температуры. При этом содержание продукта реакции удваивается.

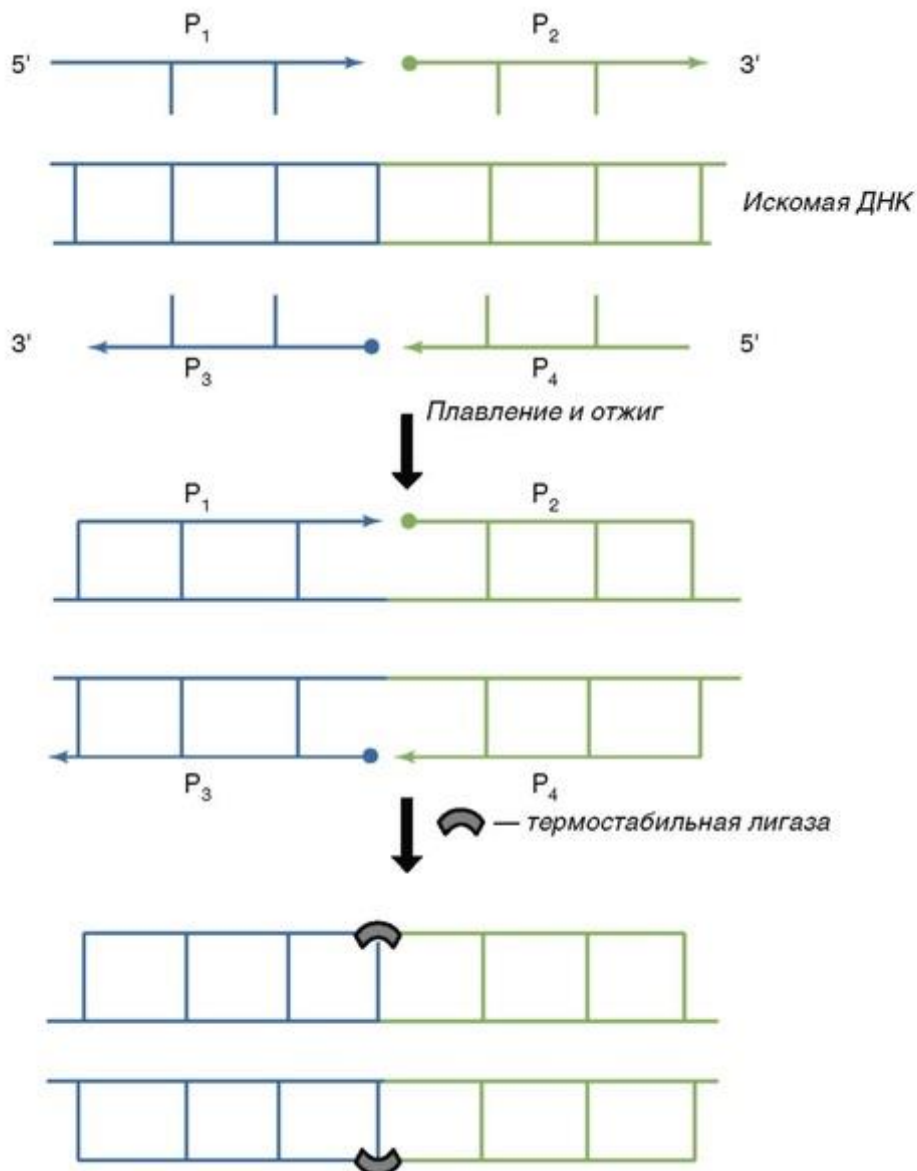


Рис. 4.5. Лигазная цепная реакция (схема)

Определение продукта амплификации ЛЦР осуществляют с помощью реакции «антиген-антитело». Каждый из взносимых двух праймеров метится различными гаптенами. Первый гаптен захватывается антителами, адсорбированными на микрочастицах. После промывания второй гаптен взаимодействует с антителами, мечеными флюоресцентной меткой. Учет проводят измерением флюоресценции на флюориметре.

Вопросы для самоконтроля

1. Фаготипирование используют для ...
2. Размер плазмиды можно установить, проведя ...

Составьте пары «вопрос-ответ».

3. Метод Грация	А. Обнаружение возбудителя без выделения чистой культуры
4. ЛЦР	Б. Титрование бактериофага
5. Мультилокусное секвенирование	В. Метод генетического типирования бактерий
	Г. Определение молекулярной массы плазмиды

МОДУЛЬ 5. МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ, ИНДИКАЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИРУСОВ

Цели модуля

- Знать: методы культивирования, индикации и идентификации вирусов.
- Уметь: проводить заражение куриного эмбриона вирусосодержащим материалом, ставить реакцию вирусной гемагглютинации и реакцию торможения гемагглютинации.
- Владеть: методами оценки результатов действия вирусов на биологические объекты.

5.1. МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВИРУСОВ

Вирусы - облигатные внутриклеточные паразиты, не способные размножаться на искусственных питательных средах, поэтому для культивирования вирусов используют биологические модели:

- чувствительных лабораторных животных;
- куриные эмбрионы;
- культуры клеток (тканей).

Лабораторных животных в настоящее время применяют для культивирования вирусов, не размножающихся в культурах клеток и куриных эмбрионах. Для культивирования в зависимости от тропизма вирусов используют мышей, кроликов, хомячков, а также, если культивирование вирусов затруднено, возможно заражение приматов. Чаще используют молодых животных, а также новорожденных как наиболее восприимчивых. Вирусосодержащий материал обычно вводят интрацеребрально, интраназально, *per os* и другими способами. При этом иногда можно воспроизвести модель инфекционного процесса, наблюдать некоторые клинические симптомы.

В куриных эмбрионах способно культивироваться большое количество разнообразных вирусов. Строение куриного эмбриона показано на рисунке. 5.1. Вирусосодержащий материал вносят на хорион-аллантоисную оболочку, в аллантоисную или амниотическую полость, в желточный мешок 10-12-дневного оплодотворенного эмбриона. Заражение можно проводить открытым и закрытым способами в строго стерильных условиях (в специальном боксе, стерильными инструментами, с соблюдением правил асептики).

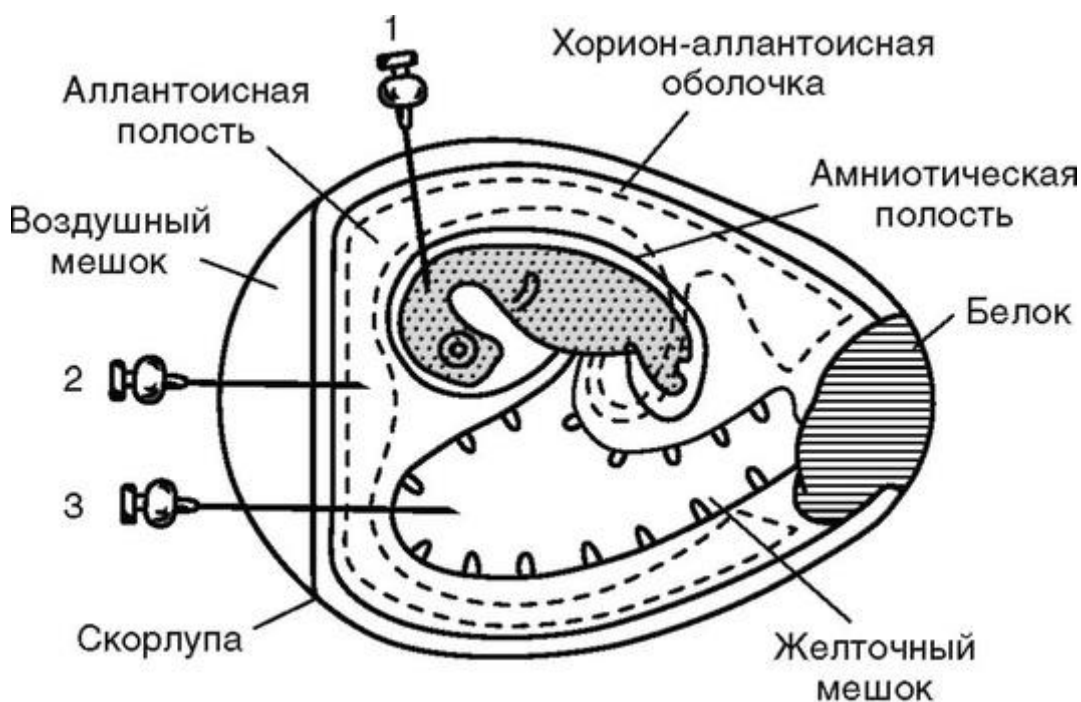


Рис. 5.1. Строение куриного эмбриона и способы его заражения: 1 - заражение в полость амниона; 2 - в аллантоисную полость; 3 - в желточный мешок

Этапы заражения куриного эмбриона

- Перед заражением яйцо просматривают на овоскопе, карандашом отмечают на скорлупе границы воздушного мешка. Затем эмбрион помещают на специальную подставку, скорлупу протирают спиртом и настойкой йода.

- При открытом способе заражения скорлупу аккуратно срезают ножницами чуть выше границы воздушного мешка, затем с помощью шприца или пастеровской пипетки вносят вирусосодержащий материал на хорион-аллантоисную оболочку или в соответствующую полость. После заражения отверстие в скорлупе закрывают стерильным стеклянным колпачком и заливают расплавленным воском для создания герметичных условий.

- При закрытом способе заражения в скорлупе делают небольшое отверстие, через которое в вертикальном направлении на глубину 2 см вводят в аллантоисную полость иглу шприца. Для заражения в амниотическую полость яйцо помещают горизонтально.

- После заражения отверстие в скорлупе заливают парафином.

- Эмбрион помещают в термостат при температуре 37 °С. Затем проводят индикацию и идентификацию вирусов.

Для культивирования вирусов используют также тканевые и клеточные культуры, полученные из эмбриональных и опухолевых клеток, так как они способны к быстрому росту. Для разрушения межклеточных связей в тканях используют трипсин и другие протеолитические ферменты. Культуры клеток могут быть одно- и многослойными.

Культуры клеток разделяют:

- на первичные, размножающиеся только в первых генерациях (выдерживают только 5-10 пассажей);

- перевиваемые (стабильные), способные размножаться в лабораторных условиях длительное время;

- полуперевиваемые, имеющие определенную продолжительность жизни (40-50 пассажей).

Культуры клеток помещают в специальные плоские сосуды - «матрацы» или в пробирки. Для культивирования клеток необходимы питательные среды, содержащие все необходимые элементы для жизнедеятельности и роста клеток (белки, углеводы, липиды, минеральные соли, витамины и др.), а также индикатор для контроля за пригодностью питательной среды и размножения вирусов (цветная проба) - среда 199, среда Игла, раствор Хенкса и др. Зараженные культуры клеток помещают в термостат и инкубируют в течение времени, необходимого для репродукции вирусов.

Для обнаружения размножения вирусов в биологических моделях используют методы индикации вирусов в культуре клеток.

При культивировании в организме лабораторных животных отмечают изменения в состоянии зараженного объекта, возможные симптомы развития инфекционного процесса, а также патологоанатомические изменения. Возможна постановка реакции гемагглютинации. Агглютинация эритроцитов происходит в жидкой среде (например, сыворотке крови животного) под действием гемагглютинаина вирусов.

5.2. МЕТОДЫ ИНДИКАЦИИ ВИРУСОВ

Для индикации вирусов в куриных эмбрионах отмечают видимые изменения в развитии эмбриона: кровоизлияния, образование бляшек на оболочках. С жидкостью, содержащейся в полостях эмбриона, также возможна постановка реакции гемагглютинации.

Реакция гемагглютинации (РГА) основана на способности вирусов вызывать склеивание эритроцитов различных видов животных, птиц и человека. Впервые явление агглютинации эритроцитов вирусами гриппа описал в 1941 г. Г. Херст.

РГА не является серологической, так как склеивание эритроцитов идет без участия иммунной сыворотки. Гемагглютинаины, способные вызывать склеивание эритроцитов, - глико- и липопротеины суперкапсида. У вирусов, не имеющих внешней оболочки, гемагглютинин связан со структурами капсида.

Механизм реакции гемагглютинации включает несколько стадий:

- адсорбцию вируса на эритроците за счет комплементарных рецепторов вируса и эритроцита;
- склеивание - агглютинацию эритроцитов;
- элюцию - разрушение вирусными ферментами рецепторов эритроцитов и отрыв вируса с поверхности клетки.

Для постановки РГА необходимы (табл. 5.1):

- вирусосодержащий материал (аллантоисная жидкость куриного эмбриона, культуральная жидкость, материал, взятый от зараженного животного, и др.);
- 1% взвесь эритроцитов (кур, морской свинки, человека) в изотоническом растворе натрия хлорида;
- изотонический раствор натрия хлорида (электролит).

Таблица 5.1. Схема постановки реакции гемагглютинации

Ингредиенты, мл	Разведение						
							1:128

	:2	:4	:8	:16	:32	:64		онтроль
Изотонический раствор натрия хлорида	,5	,5	,5	,5	,5	,5	0,5	0,5
Вирусосодержащий материал	,5→	,5→	,5→	,5→	,5→	,5→	0,5→ (в дезраствор)	—
1% взвесь эритроцитов	,5	,5	,5	,5	,5	,5	0,5	0,5
Результат								

Реакцию ставят в лунках плексигласового планшета. Вначале во все лунки разливают изотонический раствор натрия хлорида. В первую лунку добавляют 0,5 мл вирусосодержащего материала и тщательно перемешивают. Затем последовательно переносят по 0,5 мл полученного разведения из предыдущей лунки в последующую. Таким образом получают двукратные разведения (в каждой лунке 0,5 мл вирусосодержащего материала, концентрация которого уменьшается в 2 раза в каждой последующей лунке). Из предпоследней лунки 0,5 мл удаляют в дезинфицирующий раствор (контроль - для исключения спонтанной, самопроизвольной гемагглютинации).

После приготовления разведений вирусосодержащего материала во все лунки, включая контрольную, добавляют по 0,5 мл 1% взвеси эритроцитов, выдерживают 30-45 мин при комнатной температуре и регистрируют результаты.

- При положительной реакции гемагглютинации осадок эритроцитов зернистый и располагается по всей поверхности дна лунки в виде зонтика с фестончатыми краями.
- При отсутствии гемагглютинации осадок эритроцитов плотный, маленький, круглой формы в самом центре лунки.
- В контрольной лунке гемагглютинация отсутствует.

С помощью РГА определяют наличие вируса в исследуемом материале и его количество - титр, который выражается в гемагглютинирующих единицах (ГАЕ), - максимальном разведении вирусосодержащего материала, которое полностью агглютинирует стандартную суспензию эритроцитов.

Индикацию вирусов в культуре клеток проводят по следующим признакам.

- *Цитопатическому действию.* При этом могут образовываться гигантские многоядерные клетки и симпласты (слияние цитоплазмы многих клеток), наблюдаются деструкция клеток, вакуолизация цитоплазмы. Возможно образование включений - цитоплазматических и внутриядерных. Внутриклеточные включения - это скопления вирусных частиц или их компонентов, выявляемые под микроскопом.

- *Бляшкообразованию.* Бляшки, или негативные колонии, - ограниченные участки, состоящие из дегенеративных клеток, которые вирусы способны образовывать в монослое клеток под агаровым покрытием, содержащим витальный краситель, окрашивающий только живые клетки. Они видны как светлые пятна на фоне красного слоя клеток, прижизненно окрашенных нейтральным красным витальным красителем. Одна бляшка соответствует потомству одного вириона. Негативные колонии разных вирусов различаются по размеру, форме. Бляшкообразование используют для дифференциации, селекции вирусов, а также для определения их концентрации в исследуемом материале.

- *Цветной пробе*. В 1954 г. Д. Солк разработал так называемую цветную пробу для обнаружения вирусов в исследуемом материале. В основе данной методики лежат следующие особенности. Незараженные вирусом культуры клеток выделяют продукты метаболизма, которые подкисляют питательную среду, используемую для культивирования клеток, и окрашивают добавляемый в среду индикатор феноловый красный в желтый цвет. Если исследуемый материал содержит вирусы, то при добавлении его к культуре клеток вирусы убивают их, нормальный метаболизм клеток нарушается, в результате среда сохраняет свой первоначальный красный цвет.

- *Гемадсорбции* - способности культур клеток, инфицированных вирусами, адсорбировать на своей поверхности эритроциты определенных видов животных и птиц. Гемадсорбция проявляется скоплением в виде гроздей эритроцитов, адсорбированных на инфицированных вирусом клетках.

Индикацию вирусов в культуре клеток проводят также постановкой РГА с культуральной жидкостью. В настоящее время для этой цели используют также ПЦР и иммуноферментный анализ (ИФА).

После обнаружения вируса в исследуемом материале проводят его идентификацию.

Идентификация означает установление вида или типа вируса, ее осуществляют в основном с помощью реакций иммунитета или молекулярно-генетических методов. Широко используют реакцию биологической нейтрализации - метод идентификации вируса, основанный на феномене потери им инфекционности в результате взаимодействия со специфическими антителами. Эту реакцию используют при выделении и индикации вируса на культурах клеток. Для идентификации используют также другие серологические реакции, такие как ИФА, РСК, РТГА и молекулярно-генетические методы (ПЦР).

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА) - серологическая реакция, основанная на способности антител предотвращать агглютинацию эритроцитов гемагглютинирующими вирусами (аденовирусами, вирусами гриппа). Специфические антивирусные антитела взаимодействуют с поверхностными молекулами гемагглютининов вирионов этих вирусов и блокируют их связывание с комплементарными им молекулами мембраны эритроцитов. Реакцию используют для определения титров специфических антител, а также для идентификации вирусов.

Реакцию ставят в полистероловых планшетах с лунками. Постановке реакции предшествует определение активности вирусного антигена, титр которого определяют в реакции вирусной гемагглютинации (РГА). В опыте используют рабочую дозу в количестве 4-8 ГАЕ.

Для постановки реакции необходимы (табл. 5.2):

- вируссодержащий материал (аллантоисная жидкость куриного эмбриона, культуральная жидкость, материал от больного и др.). Вируссодержащий материал титруют в РГА и берут в опыт в рабочей дозе, равной 2, 4 или 8 ГАЕ;

- сыворотка:

- диагностическая (если определяют тип вируса);

- исследуемая (сыворотка больного, вакцинированного, иммунизированного животного);

- эритроциты - 1% взвесь в изотоническом растворе натрия хлорида.

Таблица 5.2. Схема постановки реакции торможения гемагглютинации

Ингредиенты, мл	Разведение							
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	контроль антигена	контроль сыворотки	контроль эритроцитов
Изотонический раствор натрия хлорида	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Сыворотка разведения 1:10	0,25	0,25 →	0,25 →	0,25 →	0,25 → (в дезраствор)	—	0,25	—
Антиген (4 АЕ)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	—	—
20-30 мин при комнатной температуре								
Эритроциты 1%	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
20-30 мин при комнатной температуре								

Реакцию ставят в лунках плексигласового планшета. Во все лунки, кроме первой, наливают по 0,25 мл изотонического раствора натрия хлорида. Затем в первую и вторую лунки вносят по 0,25 мл сыворотки, разведенной в соотношении 1:10, и тщательно перемешивают. Во второй лунке получается объем 0,5 мл, разведение сыворотки - 1:20. Из второй лунки 0,25 мл переносят в третью, из третьей 0,25 мл - в четвертую, из четвертой 0,25 мл - в пятую, из пятой 0,25 мл выливают в дезинфицирующий раствор. К приготовленным разведениям сыворотки добавляют по 0,25 мл антигена (вируссодержащего материала) и оставляют при комнатной температуре на 20-30 мин. Через 20-30 мин во все пробирки доливают по 0,5 мл 1% суспензии эритроцитов. Для достоверности результатов ставят контроли всех компонентов, участвующих в реакции. Через 20-30 мин учитывают результаты.

- Реакцию считают положительной, если образуется плотный, маленький, круглой формы осадок эритроцитов в самом центре лунки, т.е. наблюдается торможение (отсутствие) гемагглютинации.

- Если осадок эритроцитов зернистый и располагается по всей поверхности дна лунки в виде зонтика с фестончатыми краями - реакция отрицательная.

Последнее (наибольшее) разведение сыворотки, способное задержать реакцию гемагглютинации, называют титром сыворотки.

Результаты реакции со специфической и неспецифической сыворотками заносят в таблицу (табл. 5.3).

Таблица 5.3. Форма таблицы с результатами реакции со специфической и неспецифической сыворотками

Тип сыворотки	Специфическая сыворотка					Неспецифическая сыворотка				
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160
Разведение сыворотки										
Результат										

Вопросы для самоконтроля

Составьте пары «вопрос-ответ».

1. РТГА	А. Индикация вируса в культуре клеток
2. РГА	Б. Идентификация вируса, выращенного в курином эмбрионе
3. Реакция гемадсорбции	В. Индикация вируса в органах зараженных лабораторных животных
4. Цветная проба	Г. Идентификация вируса в культуре клеток

МОДУЛЬ 6. ЭКОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ. РАСПРОСТРАНЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ. САНИТАРНО-ПОКАЗАТЕЛЬНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ, ИХ ОБНАРУЖЕНИЕ

Цели модуля

- Знать: определение основных понятий экологической микробиологии, значение и состав нормальной микрофлоры организма человека.
- Уметь: определять общее микробное число (ОМЧ) и санитарно-показательные микроорганизмы воздуха, воды; проводить микробиологическое исследование микрофлоры, интерпретировать полученные результаты и применять адекватную биокоррекцию.
- Владеть: методикой забора материала и методами микробиологических исследований микрофлоры окружающей среды и организма человека.

6.1. САНИТАРНО-БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОДЫ, ПОЧВЫ И ВОЗДУХА

Микроорганизмы распространены повсеместно. Они заселяют воздух, почву и воду, участвуют в круговороте веществ в природе, уничтожая остатки погибших животных и растений, повышая плодородие почвы и поддерживая устойчивое равновесие в биосфере. Вещества растительного и животного происхождения минерализуются микроорганизмами до углерода, азота, серы, фосфора, железа и других элементов. Многие бактерии формируют нормальную микрофлору человека, животных и растений, выполняя полезные функции для своих хозяев.

Экологическая микробиология изучает взаимоотношения между микро- и макроорганизмами совместно с обитателями в определенных биотопах. В зависимости от среды обитания микроорганизмы разделяют на свободноживущие и симбионты:

- свободноживущие микроорганизмы заселяют почву, воду, воздух и различные объекты внешней среды;
- симбионты составляют единую экологическую систему с организмом человека, выполняя важную физиологическую роль.

Основная задача санитарной микробиологии - своевременное обнаружение патогенных микроорганизмов в воде, почве, воздухе, которые могут представлять опасность как факторы передачи возбудителей инфекционных заболеваний. Определение патогенных микроорганизмов в объектах окружающей среды является сложной задачей в связи с тем, что их количество не всегда достаточно и непостоянно в межэпидемические периоды, их трудно выделить при посевах даже на специальные питательные среды, так как рост патогенных микроорганизмов подавляется сопутствующей сапрофитной микробиотой. По этим причинам санитарное состояние объекта оценивают косвенным путем - по содержанию санитарно-показательных микроорганизмов (СПМ),

представителей нормобиоты человека и теплокровных животных. Обнаружение СПМ в воде, почве, воздухе - индикатор загрязнения объектов окружающей среды выделениями человека и животных, с которыми могут попадать и возбудители инфекций.

СПМ условно подразделяют на три группы.

- Индикаторы фекального загрязнения (представители микрофлоры кишечника человека и животных).
- Индикаторы воздушно-капельного загрязнения (комменсалы верхних дыхательных путей).
- Индикаторы процессов самоочищения (обитатели внешней среды).

Санитарно-микробиологический анализ объектов окружающей среды включает определение общего микробного числа (ОМЧ) и наличия СПМ. Исследования проводят в соответствии с нормативными документами - Санитарными правилами и нормами (СанПиН), методическими указаниями (МУ) и др.

6.1.1. Санитарно-микробиологический анализ воды

Задача санитарно-микробиологического анализа воды - оценка ее пригодности для использования в качестве питьевой и для других хозяйственно-бытовых целей с точки зрения инфекционной безопасности для здоровья человека.

Для оценки состояния воды применяют следующие параметры.

- Общее микробное число воды (ОМЧ) - количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (МА-ФАМ) в 1 мл воды. Согласно требованиям СанПиН, ОМЧ питьевой воды должно быть не более 50 клеток/мл.

- Помимо анализа на ОМЧ, проводят исследование воды на содержание СПМ (колиформных бактерий - общих и термотолерантных, колифагов, спор сульфитредуцирующих клостридий и цист лямблий).

— *Колиформные бактерии* должны отсутствовать в 100 мл воды.

◇ К общим колиформным бактериям относят грамотрицательные, не образующие спор палочки родов *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, не обладающие цитохромоксидазной активностью, ферментирующие лактозу с образованием альдегида, кислоты и газа при температуре 37 °С в течение 24 ч.

◇ Термотолерантные колиформные бактерии обладают всеми признаками общих колиформных бактерий и способны ферментировать лактозу до кислоты и газа при температуре 44 °С в течение 24 ч. Их присутствие в воде свидетельствует о свежем фекальном загрязнении. Колиформные бактерии образуют на дифференциально-диагностических средах с лактозой (среде Эндо и др.) типичные малиновые или темно-красные колонии. Эти бактерии могут попадать в воду вместе с фекалиями человека и животных, и их обнаружение свидетельствует о возможности присутствия в воде возбудителей кишечных инфекций.

◇ *Сульфитредуцирующие клостридии*, к которым относят преимущественно *Clostridium perfringens*, - спорообразующие анаэробные палочковидные бактерии, редуцирующие сульфит натрия в железо-сульфитной среде при температуре 44 °С в течение 16-18 ч. Обнаружение в среде черных колоний свидетельствует о давнем фекальном загрязнении воды спорами этих бактерий. Согласно требованиям СанПиН, споры кишечных клостридий не должны обнаруживаться в 20 мл отобранных проб воды.

◇ *Колифаги* - бактериальные вирусы, способные лизировать клетки *E. coli*; их считают индикаторами загрязнения питьевой воды сточными водами. Они присутствуют там, где много клеток кишечных бактерий, в которых может проходить их репродукция. Кроме того, колифаги выделяют из сточных вод с той же частотой, что и многие

кишечные вирусы, например, возбудители гепатита А, полиомиелита, ротавирусной инфекции. О присутствии бактериофагов в воде судят по формированию зон лизиса (бляшек) на плотной питательной среде, засеянной специальным эталонным штаммом кишечной палочки. Колифаги должны отсутствовать в 100 мл взятой для анализа питьевой воды.

◇ При контроле питьевой воды проводят также определение *цист лямблий*. Цисты *Giardia lamblia* достаточно долго сохраняются в воде и могут быть причиной заражения людей и развития лямблиоза. Цисты лямблий должны отсутствовать в 50 л исследуемой воды.

6.1.2. Санитарно-микробиологический анализ почвы

Санитарно-микробиологический анализ почвы проводят в целях оценки ее эпидемической опасности. СПМ для почвы - общие колиформные бактерии и *Enterococcus faecalis*. При высокой биологической нагрузке на почву, например в крупных городах с большой плотностью населения, определяют колифаги и *Clostridium perfringens*. Наличие СПМ в почве - индикатор ее загрязнения фекалиями. Их количественное содержание оценивают по индексу - количеству СПМ в 1 г почвы. Почву оценивают как чистую и безопасную при индексе СПМ до 10 клеток/г. При индексе СПМ более 100 клеток/г почву оценивают как опасную, и она может быть фактором передачи возбудителей инфекционных заболеваний.

6.1.3. Санитарно-микробиологический анализ воздуха

Содержание микроорганизмов в воздухе закрытых помещений и атмосферном существенно различается.

Санитарно-микробиологическому контролю подлежит воздух закрытых помещений. Исследование воздуха в ЛПУ проводится:

- 1 раз в квартал при текущем санитарном надзоре центром Государственного санитарно-эпидемиологического надзора;
- 1 раз в месяц бактериологическими лабораториями больниц;
- по эпидемиологическим показаниям.

В лечебных учреждениях определяют ОМЧ - количество клеток бактерий и грибов в 1 м³ воздуха и содержание *Staphylococcus aureus* в 1 м³ в качестве СПМ. Обнаружение золотистого стафилококка, а также гемолитических стрептококков - индикатор биологической контаминации воздуха микробиотой носоглотки и кожных покровов человека, а также патогенными микроорганизмами, поступающими в воздух теми же путями. Золотистый стафилококк, выделяемый больными и носителями, может вызывать инфекционные заболевания кожи и дыхательных путей.

Микроорганизмы в воздухе находятся в адсорбированном состоянии на частицах пылевых и капельных аэрозолей. Для санитарно-микробиологического исследования воздуха используют два метода отбора проб - седиментационный и аспирационный.

• Седиментационный метод - простой и доступный, но неточный и дает возможность только ориентировочного учета микроорганизмов в воздухе. Метод основан на определении микроорганизмов, оседающих вместе с частицами воздушного аэрозоля на открытую поверхность питательной среды и последующем учете образующихся колоний. При использовании данного метода можно определить только часть микроорганизмов воздуха, осевших на поверхность питательной среды в составе грубодисперсных фракций аэрозоля.

- Более совершенный и точный по сравнению с седиментационным - аспирационный метод, основанный на принудительном осаждении всех фракций воздушного аэрозоля вместе с микроорганизмами на поверхность питательной среды.

В целях определения ОМЧ воздуха используют отдельные питательные среды - для бактерий и для грибов. Для обнаружения *Staphylococcus aureus* и гемолитических стрептококков применяют кровяной и специальный желточно-солевой агары.

Максимально допустимое ОМЧ воздуха в чистых помещениях - 500 клеток/м³.

6.2. МЕТОДЫ САНИТАРНО-БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ВОДЫ И ВОЗДУХА

6.2.1. Санитарно-бактериологический анализ воды

При санитарно-бактериологическом анализе воды определяют микробное число и содержание санитарно-показательных микроорганизмов.

Микробное число воды - общее количество микроорганизмов в 1 мл воды. Пробы воды отбирают с соблюдением правил асептики. Если пробы берут из водопроводной сети водоразборов, краны предварительно обжигают и воду спускают в течение 10 мин. Отбирают пробу в объеме 0,5 л. Перед посевом из отобранной пробы готовят серийные разведения. Для этого 1 мл воды из отобранной пробы вносят в 9 мл стерильной воды, делая таким образом разведение 1:10. Из пробирки с разведением исследуемой воды 1:10 отбирают 1 мл и переносят в 9 мл стерильной воды, делая таким образом разведение 1:100. Таким же образом можно продолжить разведения до 1:1000 и далее. При посеве 1 мл исходной пробы воды и по 1 мл из каждого разведения вносят в стерильные чашки Петри, куда потом заливают 10-15 мл расплавленного питательного агара. После застывания посеvy инкубируют при температуре 37 °С в течение 24 ч. Количество выросших колоний подсчитывают, результаты вносят в таблицу (табл. 6.1).

Таблица 6.1. Определение микробного числа воды

Этап исследования				
Разведение воды	исходная проба	1:10	1:100	1:1000
Засеваемый объем	1 мл	1 мл	1 мл	1 мл
Питательный агар	10 мл	10 мл	10 мл	10 мл
Число колоний				
Заключение				

Для определения степени фекальной загрязненности воды используют определение коли-индекса - количества колиформных бактерий в 1 л воды, который определяют с помощью мембранных фильтров. Для этого 300-500 мл воды пропускают через мембранный фильтр. По окончании фильтрации фильтр помещают на поверхность среды Эндо. После инкубации подсчитывают количество выросших колоний. Их пересевают на среду Эндо, отмечая рост лактозоположительных красных колоний с металлическим блеском. Из них готовят мазок, окрашивают по Граму. В случае обнаружения грамотрицательных палочек ставят тест на оксидазу. Грамотрицательные оксидазонегативные, лактозоположительные бактерии относят к колиформным бактериям. Коли-индекс водопроводной воды должен быть не более 3.

6.2.2. Санитарно-бактериологический анализ воздуха

Санитарно-бактериологический анализ воздуха включает определение ОМЧ воздуха и санитарно-показательных микроорганизмов. Методы микробиологического исследования воздуха подразделяют на седиментационный и аспирационный.

Седиментационный метод Коха

Стерильные чашки Петри с питательной средой оставляют открытыми в местах отбора проб на 5-10 мин, после чего их закрывают и помещают в термостат на 24 ч при температуре 37 °С. Микробное число воздуха определяют, пользуясь правилом Омелянского, в соответствии с которым считают, что на поверхность питательной среды площадью 100 см² оседает за 5-10 мин столько бактерий, сколько их находится в 10 л воздуха. Каждая микробная клетка дает начало одной колонии. Зная количество выросших колоний, вычисляют микробное число.

Исходя из диаметра чашки Петри, равного 10 см, ее площадь составляет 78,4 см². Таким образом, если на поверхности питательной среды в чашке Петри выросло N колоний, составляют математическую пропорцию и определяют, сколько колоний может вырасти на площади 100 см², т.е. сколько бактерий находится в 10 л воздуха:

$$78,4 \text{ см}^2 - N; 100 \text{ см}^2 - X;$$

$$X = 100 \times N / 78,4 \text{ (1 м}^3 \text{ воздуха = 1000 л)}.$$

Аспирационный метод

Это более точный метод, его проводят с помощью специальных приборов-воздухоотборников, через которые засасывается определенный объем воздуха. Для определения микробного числа воздуха засасывают 100 л воздуха. Для определения количества СПМ (золотистого стафилококка и грибов) засасывают 250 л воздуха, проводя посевы на кровяной агар для выделения стафилококков и агар Сабуру - для выделения грибов.

Результаты исследований вносят в таблицу (табл. 6.2).

Таблица 6.2. Определение микробного числа воздуха

Метод исследования	Количество колоний, выросших на чашке Петри	Микробное число воздуха
Седиментационный метод Коха		
Аспирационный метод		

6.3. МИКРОФЛОРА ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА

С современных позиций нормальную микрофлору следует рассматривать как совокупность множества микробиоценозов, характеризующихся определенным видовым составом и занимающих определенный биотоп в организме. К нормальной микрофлоре человека относят микробные ассоциации, сформировавшиеся в процессе эволюции, в результате селекции наиболее адаптированных штаммов микроорганизмов.

Организм человека и его микрофлора находятся в состоянии динамического равновесия (эубиоза) и являются единой экологической системой.

Ткани и органы, не сообщающиеся с внешней средой, могут быть свободными от микроорганизмов, т.е. стерильными. Сюда относят лимфу, головной и спинной мозг, спинномозговую жидкость, альвеолы легких, внутреннее и среднее ухо, кровь, матку,

почки, мочеточники, мочу. Функции микрофлоры тела человека представлены на рисунке 6.1.



Рис. 6.1. Функции нормальной микрофлоры

Дисбактериоз - клинико-лабораторный синдром, который характеризуется изменением качественного и количественного состава нормофлоры определенного биотопа, а также транслокацией определенных ее представителей в несвойственные биотопы с последующими метаболическими и иммунными нарушениями.

Коррекция дисбактериоза включает применение пробиотиков, пребиотиков и синбиотиков.

- *Пробиотики* - живые микроорганизмы (молочнокислые бактерии, иногда дрожжи), которые относят к обитателям кишечника здорового человека, оказывают положительное воздействие на физиологические, биохимические и иммунные реакции организма через оптимизацию микрофлоры хозяина.

- *Пребиотики* - препараты немикробного происхождения, стимулирующие рост и метаболическую активность нормальной микрофлоры кишечника. Вещества, составляющие основу пребиотика, - низкомолекулярные углеводы (олигосахариды, фруктоолигосахариды), содержащиеся в грудном молоке и некоторых пищевых продуктах.

- *Синбиотики* - комбинация пробиотиков и пребиотиков. Эти вещества избирательно стимулируют рост и метаболическую активность индигенной микрофлоры. Например, препарат биовестин-лакто* содержит бифидогенные факторы и биомассу *B. bifidum*, *L. adolescentis*, *L. plantarum*.

Препараты, содержащие пробиотики, представлены в таблице 6.3.

Таблица 6.3. Препараты, содержащие пробиотики

Препарат	Состав	Особенности применения
<i>Лактосодержащие</i>		
Лактобактерин*	<i>L. plantarum</i>	Можно применять детям с 3 лет

Лактобактерии ацидофильные (ацилакт [▲])	<i>L. acidophilus</i>	Оказывает корректирующее действие при нарушениях микрофлоры ротовой полости, кишечного и урогенитального трактов. Возможно совмещение с антибиотикотерапией. Можно применять детям с первых дней жизни
Биобактон [▲]	<i>L. acidophilus</i> , штамм 126	Можно применять на фоне антибиотикотерапии. Можно применять детям с первых дней жизни

Продолжение табл. 6.3

Препарат	Состав	Особенности применения
Гастрофарм [▲]	<i>L. bulgaricus</i> LB-51	Используют при лечении гастритов, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки. Можно применять детям с 3 лет
Аципол [▲]	<i>L. acidophilus</i> и полисахарид кефирных грибков	Эффективен после проводимой антибиотикотерапии. Можно применять детям с первых лет жизни
Линекс [▲]	<i>L. acidophilus</i> , <i>B. Infanti</i> , <i>E. faecium</i>	Создает кислую среду, неблагоприятную для размножения патогенных и условно-патогенных микроорганизмов
<i>Бифидосодержащие</i>		
Бифидобактерии бифидум (бифидумбактерин [▲])	<i>B. bifidum</i>	Можно применять детям грудного возраста при переводе на искусственное питание. Применяют при острых и хронических заболеваниях ЖКТ, в гинекологии
Бифидобактерии бифидум (бифидумбактерин форте [▲])	<i>B. bifidum</i> , адсорбированный на активированном угле	Более эффективно заселяет слизистую оболочку кишечника. Резистентен к кислой среде желудка. Можно применять детям с 1 года
Бифидобактерии	<i>B. bifidum</i> , адсорбированный на активированном угле +	Можно применять детям с 1 года

бифидум (пробифор [▲])	лактоза	
Бифилиз [▲]	<i>B. bifidum</i> + лизоцим	Используют при гнойно-септических заболеваниях, на фоне антибиотикотерапии, при применении цитостатиков. Можно применять детям с первых дней жизни и недоношенным
Бифиформ [▲]	<i>B. longum, E. faecium</i>	Нормализует микрофлору кишечника. Можно применять детям с 2 лет
Бифидобактерии бифидум + кишечные палочки (бификол [▲])	<i>B. bifidum, E. coli</i> М-17	Можно применять детям с 6 мес

Окончание табл. 6.3

Препарат	Состав	Особенности применения
<i>Колисодержащие</i>		
Кишечные палочки (колибактерин сухой [▲])	<i>E. coli</i> М-17	Применяют для коррекции микрофлоры
Биофлор [▲]	Экстракт из сои, прополиса, овощей, сквашенный <i>E. coli</i> М-17	Применяют при лечении хронических заболеваний ЖКТ, онкологических заболеваниях и проведении лучевой и химиотерапии

Изучение состояния микрофлоры тела человека и определение состояния дисбактериоза проводят при определении качественного и количественно состава микрофлоры, в частности, при исследовании микрофлоры кишечника или верхних дыхательных путей, в некоторых случаях при исследовании микрофлоры влагалища или при приготовлении мазка, его окраске и микроскопии (исследования микробного состава зубного налета, диагностика бактериального вагиноза).

6.4. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРОФЛОРЫ ТЕЛА ЧЕЛОВЕКА

6.4.1. Исследование микрофлоры зубного налета

Полость рта взрослого человека - один из наиболее заселенных биотопов, где обнаруживают около 300 видов микроорганизмов различных морфологических форм: кокки, палочки, извитые формы, а также простейшие, грибы, вирусы. Высокой обсемененности полости рта способствуют ее анатомические особенности: наличие десневых карманов, складок слизистой оболочки, межзубных промежутков, обилие питательных веществ, слабощелочная реакция среды, аэробные или анаэробные условия. Расстройства слюноотделения, жевания и глотания всегда приводят к нарастанию

количества микроорганизмов в полости рта. Соотношение анаэробов к аэробным видам составляет 10-100:1. В карманах десен и зубных бляшках обнаруживают микроорганизмы родов *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*.

В зубном налете и на деснах здоровых людей присутствуют стрептококки и стафилококки. *Staphylococcus epidermidis*, обладая значительной ферментативной активностью, принимают участие в расщеплении остатков пищи в полости рта.

Стрептококки - основные обитатели полости. Стрептококки, вегетирующие в ротовой полости, составляют особую экологическую группу и названы оральными. К ним относят следующие виды: *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. sanguis*, *S. mitis*, *S. oralis* и др. Обладая значительной ферментативной активностью, стрептококки сбраживают углеводы с образованием молочной кислоты, вызывая молочнокислое брожение и подавляя рост ряда гнилостных микроорганизмов. В полости рта здоровых людей вейлонеллы присутствуют постоянно в больших количествах (в 1 мл слюны - до 10^8). За счет катаболизма образованной зелеными стрептококками молочной кислоты вейлонеллы могут оказывать противокариозное действие. Количество их возрастает при воспалительных процессах, одонтогенных абсцессах полости рта. Лактобактерии (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermenti*, *Lactobacillus brevis*) вызывают молочнокислое брожение, образуют молочную, уксусную кислоты, спирт, углекислоту. Количество лактобацилл в полости рта при кариесе возрастает и зависит от величины кариозных поражений.

Забор зубного налета проводят натошак, до утренней чистки зубов. До взятия пробы полость рта дважды тщательно прополаскивают стерильной дистиллированной водой. Для предупреждения контаминации зубы изолируют от слюны стерильными ватными валиками, поверхность зубов высушивают стерильными ватными тампонами.

Зубной налет смешивают с 1-3 каплями изотонического раствора натрия хлорида, высушивают, фиксируют и окрашивают по Граму. Микроскопируют с использованием иммерсионной системы. Состав микрофлоры зубного налета показан на рисунке 6.2.

6.4.2. Исследование микрофлоры зева и носа

Микрофлора верхних дыхательных путей представлена бактероидами, коринеформными бактериями, гемофильными палочками, лактобактериями, стафилококками, стрептококками, нейссериями, пептококками, пептострептококками. Исследование микрофлоры дыхательных путей проводят в целях обнаружения носительства золотистого стафилококка. Забор материала из зева проводят стерильным ватным тампоном и высевают на кровяной МПА. После инкубации при температуре 37 °С в течение 24 ч изучают культуральные свойства выросших колоний, отмечают наличие или отсутствие зоны гемолиза, готовят микропрепараты и окрашивают по Граму. При идентификации пользуются таблицей (табл. 13.3). Забор материала из нижних носовых ходов проводят стерильным ватным тампоном и засевают на желточно-солевой агар (ЖСА). После инкубации при температуре 37 °С в течение 24 ч изучают культуральные свойства выросших колоний, отмечают наличие или отсутствие лецитиназной активности, готовят микропрепараты и окрашивают по Граму.

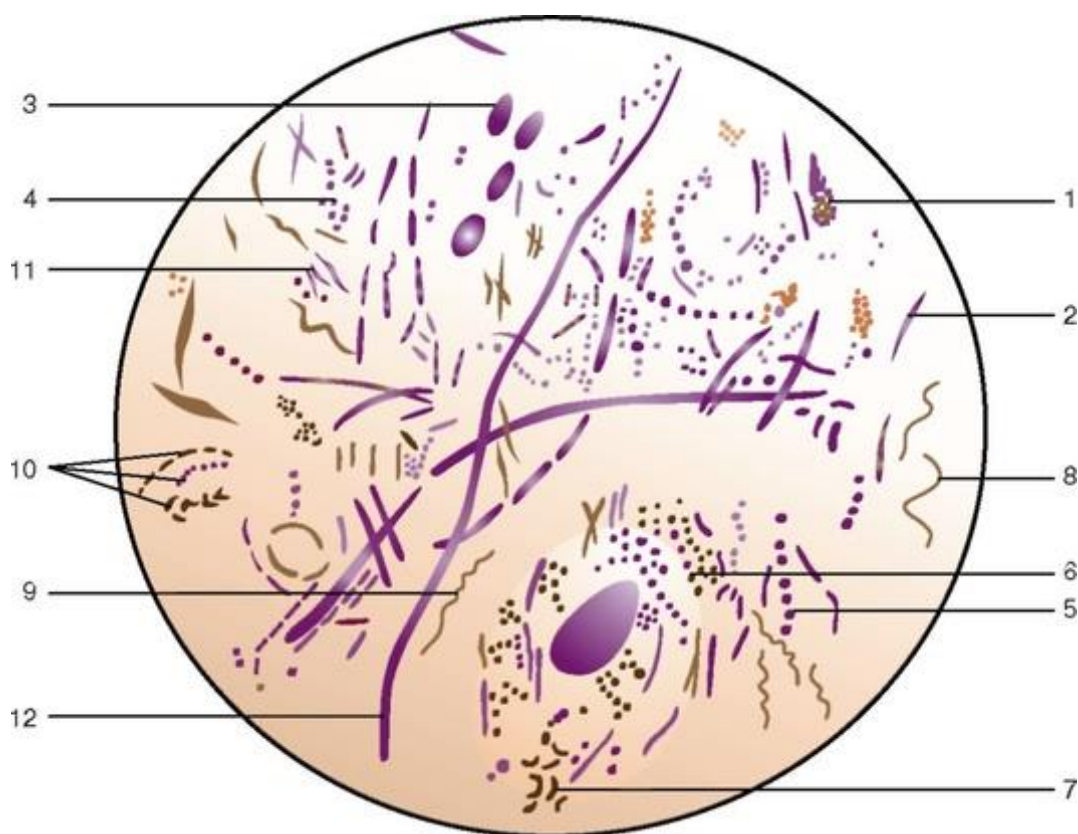


Рис. 6.2. Мазок из зубного налета: 1 - вейлонеллы; 2 - фузиформные бактерии; 3 - грибы *Candida*; 4 - микококки; 5 - стрептококки; 6 - стафилококки; 7 - вибрионы; 8 - спириллы; 9 - спирохеты; 10 - лактобактерии; 11 - бактероиды; 12 - лептотрихи

6.4.3. Исследование микрофлоры кишечника

Биомасса микроорганизмов, заселяющих пищеварительный тракт взрослого человека, составляет 2,5-3 кг и включает до 450-500 различных видов бактерий. Помимо защитной функции, микроорганизмы кишечника участвуют в обмене веществ макроорганизма. В проксимальных отделах тонкой кишки у здоровых взрослых людей обычно содержится небольшое количество микроорганизмов - в пределах 10^3 - 10^5 КОЕ/мл кишечного содержимого. Преобладают лактобактерии и стрептококки. Перистальтика в тонкой кишке предотвращает чрезмерный рост микроорганизмов.

По мере продвижения к дистальной части подвздошной кишки уровень микроорганизмов достигает 10^7 - 10^8 КОЕ/мл, а качественный состав становится сходным с таковым микрофлоры толстой кишки. Соотношение анаэробных бактерий к аэробным составляет 100:1. Облигатная микрофлора толстой кишки представлена бифидобактериями, лактобактериями, бактероидами, фузобактериями, пропионобактериями, пептострептококками, пептококками, клостридиями, вейлонеллами. Все они высокочувствительны к действию кислорода. Аэробные и факультативно-анаэробные бактерии представлены энтеробактериями, энтерококками и стафилококками. В пищеварительном тракте микроорганизмы локализируются на поверхности эпителиальных клеток, в глубоком слое мукозного геля крипт, в толще мукозного геля, покрывающего кишечный эпителий, в просвете кишечника и бактериальной биопленке.

Этапы исследования микрофлоры кишечника

Правильный забор и транспортировка материала определяют успех бактериологического исследования.

- Материал забирают из последней порции фекалий стерильным шпателем и помещают в стерильный контейнер. Учитывая, что строго анаэробные

неспорообразующие бактерии должны быть защищены от летального действия кислорода, рекомендуют использовать пробирки с хорошо притертыми резиновыми пробками, заполненные инертной газовой смесью, или осуществлять транспорт материала, используя *Gas Pak*. От момента взятия материала до начала посева должно проходить не более 2 ч.

- Подготовка материала к посеву. Навеску в 1 г фекалий переносят в стерильную ступу и добавляют 9 мл стерильного свежерегенерированного кипячением в течение 20 мин тиогликолевого буфера (см. приложение), который способствует лучшему сохранению анаэробных бактерий. Материал тщательно растирают пестиком до образования гомогенной массы, которую переносят в стерильную пробирку (разведение 1:10). Далее производят серийные стократные разведения гомогената в тиогликолевом буфере (10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9}), перенося из предыдущей в последующую пробирку, содержащую 9,9 мл тиогликолевого буфера.

- Посев исследуемого материала и определение количественного и качественного состава микрофлоры

- Определение общего числа аэробных бактерий и их гемолизирующих свойств осуществляют путем посева капли объемом 0,05 мл из разведений 10^{-5} и 10^{-7} на два сектора 5% кровяного агара. Через 24 ч инкубации при температуре 37 °С проводят подсчет и микроскопию окрашенных по Граму мазков из различных типов колоний. Определяют общее количество аэробных бактерий, а также процентное соотношение гемолизирующих культур среди колоний одного типа.

- Количество стафилококков учитывают на ЖСА, на который осуществляют посев на два сектора каплями объемом 0,05 мл из разведений 10^{-3} и 10^{-5} . После инкубации в течение 48 ч при температуре 37 °С подсчитывают количество всех выросших колоний, определяют наличие у них лецитовителлазной активности (наличие радужного венчика). Колонии, различные по культуральным свойствам, пересевают секторами на МПА и 5% кровяной агар. Через сутки инкубации при температуре 37 °С определяют их плазмокоагулазную активность (со стерильной кроличьей плазмой, разведенной в соотношении 1:5 через 30 мин и 4 ч в термостате), а также ферментацию маннита и мальтозы в анаэробных условиях.

- Дрожжеподобные грибы выделяют на среде Сабуро с полимиксином (200 мг/мл), для чего проводят посев каплями объемом 0,05 мл из разведений 10^{-3} и 10^{-5} . Посевы инкубируют 72 ч при температуре 240 °С. После инкубации подсчитывают количество бело-матовых выпуклых колоний, делают из них мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют. При необходимости для определения видовой принадлежности необходимо провести биохимическую идентификацию с помощью специальных тест-систем. Для определения вида *C. albicans* колонии, крупные при окраске по Граму, почкующиеся грампозитивные бактерии удлиненной формы пересевают на рисовый агар. На рисовом агаре через 48-72 ч наблюдается наличие хламидоспор, что является признаком *C. albicans*.

- Определение общего количества бактерий семейства *Enterobacteriaceae*. Делают посев каплями объемом 0,05 мл из разведений 10^{-3} , 10^{-5} и 10^{-7} на 3 сектора чашки со средой Эндо или Левина. Кроме того, проводят посев шпателем материала из разведения 10^{-3} объемом 0,1 мл на среду Плоскирева (Эндо) и из разведения 10^{-5} объемом 0,1 мл на среду Эндо. После 24-часовой инкубации при температуре 37 °С подсчитывают количество различных типов колоний, которые потом идентифицируют по биохимическим тестам (с помощью сред Клиггера, энтеротеста, АРІ-системы).

◇ Следует учитывать, что на средах Эндо, Левина, Мак-Конки могут расти в виде лактозонегативных колоний оксидазопозитивные бактерии, такие как представители рода *Pseudomonas*, поэтому перед биохимической идентификацией необходимо провести тестирование лактозонегативной колонии на оксидазную активность.

◇ После биохимической идентификации подсчитывают общее количество энтеробактерий, *E. coli*, а также различных представителей семейства *Enterobacteriaceae*. Среди общего количества *E. coli* определяют количество лактозопозитивных, лактозонегативных, гемолитических кишечных палочек.

◇ Для целенаправленного выделения патогенных энтеробактерий (сальмонелл, шигелл) из исходного разведения 1:10 делают посев в селенитовый бульон с последующим выделением возбудителей на средах Плоскирева, висмут-сульфитном и гектоеновом агаре.

◇ Молочнокислые палочки (лактобактерии) выделяют на среде МРС, делая высеив из разведений 10⁻⁵ и 10⁻⁷ каплями объемом 0,05 мл. Поскольку лактобактерии являются аэротолерантными бактериями, их культивируют в СО₂-инкубаторе или в *Gas Pak*. После инкубации подсчитывают все виды выросших колоний, делают мазки из различных типов колоний. Лактобактерии - грамположительные палочки, расположенные частоколом. Подтверждение принадлежности бактерий к роду - морфология, отсутствие оксидазы и каталазы.

◇ Для выделения бифидобактерий используют полужидкую свежерегенерированную кипячением в течение 30 мин среду Блаурокка. Посев материала проводят из разведений 10⁻⁵, 10⁻⁷ и 10⁻⁹ в объеме 1 мл в 9 мл среды. Посевы выдерживают 48 ч при температуре 37 °С. Далее проводят микроскопию мазков из выросших колоний, для чего пастеровской пипеткой отбирают колонии в виде гвоздиков, комет, дисков. В мазках бифидобактерии имеют вид разветвленных палочек (X, Y) с утолщением на концах.

◇ Спорообразующие бактерии (кlostридии) выделяют путем посева 1 мл материала из разведений 10⁻³, 10⁻⁵ и 10⁻⁷ в растопленный столбик среды Вильсона-Блера. После инкубации подсчитывают количество выросших колоний черного цвета в глубине агара. Следует учитывать, что кlostридии растут очень быстро и часто из-за образования газа происходят разрывы среды, поэтому пробирки следует инкубировать в течение ночи при температуре 24 °С, а затем несколько часов при температуре 37 °С.

Количество микроорганизмов в 1 г фекалий определяют по числу колоний, выросших на соответствующей среде, с учетом посевного материала и степени его разведения.

Количество микроорганизмов в 1 г фекалий рассчитывают по формуле:

$$\text{КОЕ/г} = n \times a \times v,$$

где КОЕ - колониобразующие единицы; n - число колоний, выросших на питательной среде; a - коэффициент посевной дозы (a=10 при посеве 0,1 мл; a=20 при посеве 0,05 мл); v - степень разведения посевного материала.

6.4.4. Микробиологическая диагностика бактериального вагиноза

Основные представители микрофлоры влагалища у женщин репродуктивного возраста - лактобактерии, их количество достигает 10⁷-10⁸ в 1 мл вагинального отделяемого. Колонизация влагалища лактобактериями обусловлена высоким уровнем эстрогенов у женщин детородного возраста. Нормальная микрофлора влагалища включает бифидобактерии, пептострептококки, пропионибактерии, превотеллы, бактероиды, порфиромонасы, коринеформные бактерии, коагулазоотрицательные стафилококки.

Преобладающие микроорганизмы - анаэробные бактерии, соотношение анаэробы/ аэробы составляет 10:1 (табл. 6.4).

Таблица 6.4. Состав микрофлоры влагалища

Микрофлора	
резистентная к O ₂ , 100 млн/мл	чувствительная к O ₂ , 1 млрд/мл
<i>Lactobacterium</i>	<i>Propionibacterium</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>Eubacterium</i>
Бета-гемолитические стрептококки группы В	<i>Bifidobacterium</i>
<i>E. coli</i>	<i>Peptostreptococcus</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>Peptococcus</i>
<i>Proteus</i>	<i>Bacteroides</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>Fusobacterium.</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Veilonella</i>
<i>Gardnerella</i>	<i>Mobiluncus</i>
<i>M. hominis</i>	

На состав микрофлоры влагалища оказывают влияние беременность, роды, возраст. Во время беременности количество лактобактерий повышается и достигает максимума в III триместре беременности. Доминирование лактобактерий у беременных снижает риск патологической колонизации при прохождении ребенка через родовые пути. Роды приводят к резким изменениям в составе микрофлоры влагалища, снижается количество лактобактерий и существенно увеличивается количество бактериоидов, эшерихий. Данные нарушения микробиоценоза транзиторны, и к 6-й неделе после родов состав микрофлоры возвращается к норме.

После наступления менопаузы в половых путях снижаются уровни эстрогенов и гликогена, уменьшается количество лактобактерий, преобладают анаэробные бактерии, рН приобретает нейтральное значение. Полость матки в норме стерильна.

Дисбиотический процесс влагалища с избыточным ростом *Gardnerella vaginalis* в ассоциации с облигатными анаэробами называют бактериальным вагинозом. Механизм развития вагиноза заключается в нарушении баланса «макроорганизм-микроорганизм» и развитии дисбиотического процесса влагалища, который проявляется резким снижением количества лактобацилл, а в ряде случаев - их полным исчезновением и одновременным избыточным ростом *G. vaginalis* (до 10¹⁰-10¹² КОЕ/мл), обычно в ассоциации с другими неспорообразующими анаэробами (*Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Peptostreptococcus*, *Mobiluncus*), *Atopobium vaginae* и *Mycoplasma hominis*. В нормальном биоценозе влагалища соотношение факультативных анаэробов и строгих анаэробов составляет 1:10, при вагинозе этот показатель возрастает до 1:1000 и выше. *G. vaginalis* - представитель микрофлоры влагалища и мочевыводящих путей. Распространенность их у здоровых женщин составляет 12-53%, у мужчин - менее 10%. Широкое распространение *G. vaginalis* в половых путях здоровых женщин разного возраста позволяет рассматривать эти микроорганизмы как комменсалы, которые только при определенных условиях проявляют патогенные свойства. Заболевание проявляется обильными, часто пенящимися выделениями из влагалища серовато-белого цвета, гомогенными, без комков, с резким, неприятным рыбным запахом, обусловленным образованием летучих аминов. Часто наблюдаются зуд, жжение в области наружных половых органов, неприятные ощущения при половом акте, боли в области влагалища и

промежности. Вагиноз может приводить к преждевременным родам, снижению массы тела новорожденных, воспалительным заболеваниям органов малого таза. К предрасполагающим факторам развития данного заболевания относят:

- сахарный диабет;
- применение антибиотиков, гормональных средств, иммунодепрессантов;
- воспалительные заболевания внутренних половых органов;
- нарушения менструального цикла;
- беременность;
- менопаузу;
- ослабление местного иммунитета;
- стрессы;
- нарушения биоценоза кишечника и др.

Диагностика бактериального вагиноза

Материалы для исследования: отделяемое цервикального канала, сводов и стенок влагалища; отделяемое уретры, взятое после массажа, моча. Материал берут ложкой Фолькмана или желобковым зондом, отделяемое канала шейки матки забирают пинцетом.

Диагноз обычно ставят бактериоскопически по обнаружению ключевых клеток (более 20%). Ключевые клетки - клетки влагалищного эпителия, сплошь или частично покрытые грамвариабельной, но чаще грамтрицательной микрофлорой (рис. 6.3). Лактобациллы практически отсутствуют и замещаются другими бактериями - кокками, палочками, диплобациллами разной величины с преобладанием мелких форм, что придает поверхности клетки зернистый вид и неясность очертаний. При идентификации ключевых клеток наиболее результативно изучение клеточного края: на ключевой клетке находится большое количество прикрепленных бактерий, расположенных в основном хаотично (как на клеточных элементах, так и вне их).

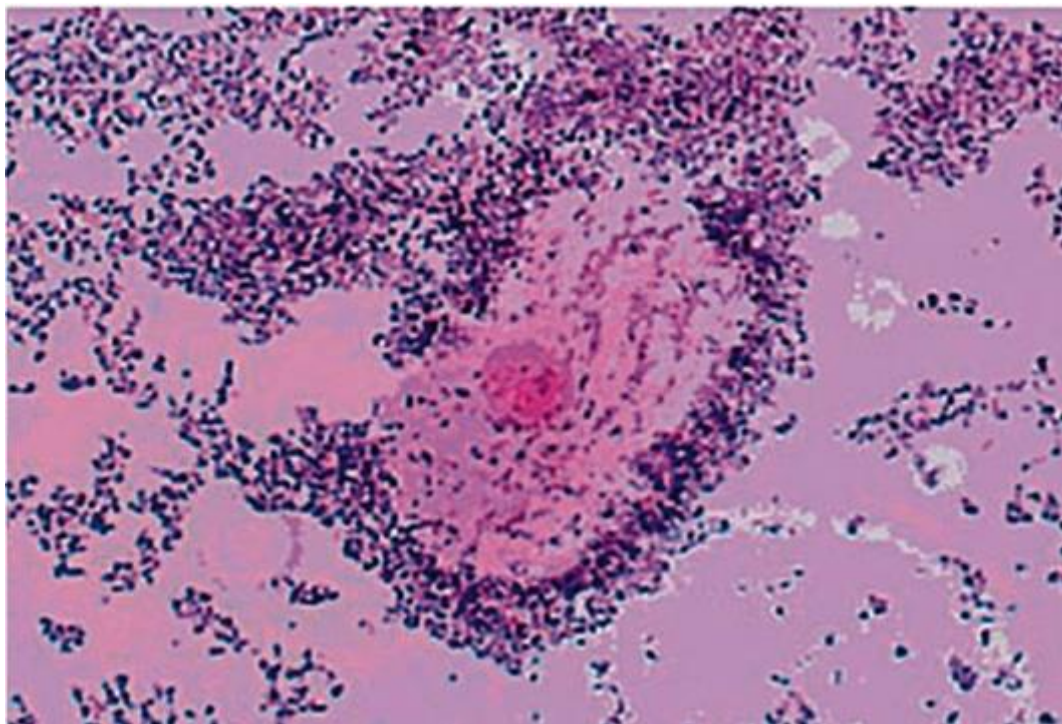


Рис. 6.3. Ключевая клетка

Характерные признаки вагиноза:

- отсутствие лейкоцитоза влагалищных выделений (лейкоцитов - 1-2 в поле зрения);
- pH >4,5;
- положительный аминовый тест (усиление рыбного запаха при добавлении к выделениям 10% раствора КОН).

Вопросы для самоконтроля

1. Санитарно-показательные микроорганизмы - индикаторы ...
2. Степень загрязнения воздуха оценивают по величине ...
3. Седиментационный метод Коха используют для ...
4. Основные микроорганизмы - представители влагалища: .
5. Микроскопическое определение ключевых клеток используют для диагностики .
6. Для диагностики дисбактериоза кишечника проводят ...

МОДУЛЬ 7. ДЕЙСТВИЕ НА МИКРООРГАНИЗМЫ ФИЗИЧЕСКИХ И ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ. АНТИБИОТИКИ

Цели модуля

- Знать: механизмы действия на микроорганизмы факторов окружающей среды и антибактериальных средств.
- Уметь: определять степень чувствительности бактерий к антибиотикам методом диффузии антибиотика в агар (методом бумажных дисков), проводить санитарно-бактериологическое исследование поверхности предметов и рук.
- Владеть: навыками условий применения методов стерилизации и дезинфекции по отношению к определенному объекту.

Жизнь микроорганизмов находится в тесной взаимосвязи с окружающей средой. Факторы внешней среды могут способствовать жизнедеятельности микроорганизмов и оказывать на них губительное действие, подавляя размножение и рост бактериальных клеток.

Из физических факторов наибольшее влияние на микроорганизмы оказывают температура, влажность, pH среды, а также излучение.

Температура. Жизнедеятельность каждого микроорганизма ограничена определенными температурными границами. К действию низких температур микроорганизмы, как правило, весьма устойчивы. При температуре 0 °С и ниже замедляются процессы жизнедеятельности и прекращается размножение. Микроорганизмы сохраняют жизнеспособность при высушивании в вакууме при температуре -180 °С (лиофилизация) и при помещении в благоприятные условия способны размножаться.

При действии высоких температур происходят денатурация белков и повреждение структур клеток.

- Вегетативные формы бактерий погибают при температуре 60 °С в течение 30-60 мин, при 80-100 °С - через 1-2 мин.
- Споры бактерий гораздо более устойчивы к высоким температурам, выдерживая кипячение от 30 мин (возбудители сибирской язвы) до 6 ч (возбудители ботулизма). Для уничтожения спор необходима температура 120-180 °С.

Большинство вирусов быстро погибают под действием высоких температур. Однако вирус гепатита В выдерживает кипячение до 20 мин.

Влажность. Для нормальной жизнедеятельности микроорганизмов необходима вода. При недостатке влаги происходит обезвоживание цитоплазмы и цитоплазматической мембраны, что приводит к прекращению размножения большинства микроорганизмов. Однако при помещении микроорганизмов во влажную среду они возобновляют свою жизнедеятельность. Особой устойчивостью к высушиванию обладают споры.

Влияние pH среды. Большинство бактерий обитает при реакции среды, близкой к 7,0. Вместе с тем существуют микроорганизмы, предпочитающие щелочную (возбудитель холеры) или кислую (ацидофильные бактерии) среду. При низких (<3,0) или высоких (>9,0) значениях pH микроорганизмы прекращают размножение и погибают. Отрицательное воздействие кислой и щелочной среды используют при применении дезинфицирующих и антисептических средств.

Излучение. Излучение оказывает повреждающее действие на микроорганизмы.

- *Ионизирующее излучение* (γ -лучи и энергия ускоренных электронов) разрушает нуклеиновые кислоты, белки и липиды и приводит к гибели бактериальных клетки. Наиболее чувствительны к этому виду излучений вегетативные формы. Возможно применение ионизирующего излучения для стерилизации инструментария, лабораторной посуды и др.

- *Неионизирующее излучение* - инфракрасное и ультрафиолетовое. Ультрафиолетовые лучи вызывают повреждения нуклеиновых кислот, а также инактивируют клеточные ферменты, что делает бактериальные клетки нежизнеспособными. Ультрафиолетовое облучение используют главным образом для обеззараживания помещений, воздуха, а также воды (бактерицидные лампы).

Химические факторы на микроорганизмы действуют неспецифически. Мишени, на которые воздействуют химические вещества, аналогичны тем, что находятся в клетках человека. В связи с этим химические вещества можно применять вне макроорганизма, их используют для уничтожения болезнетворных микроорганизмов во внешней среде (дезинфектанты). Химиотерапевтические препараты используют для лечения, поскольку они обладают избирательностью действия.

7.1. ПОНЯТИЕ О СТЕРИЛИЗАЦИИ И ДЕЗИНФЕКЦИИ

7.1.1. Стерилизация

Стерилизация (от лат. *sterilis* - «бесплодный») - полное освобождение объектов от микроорганизмов и их спор. Существуют физические, химические и механические способы стерилизации. В лабораторной практике обычно применяют физические способы стерилизации. Выбор метода стерилизации зависит от свойств стерилизуемого объекта, эффективности воздействия на микроорганизмы, возможности образования токсических продуктов в процессе стерилизации. Различают стерилизацию с использованием высоких температур и холодную стерилизацию.

Виды стерилизации

Стерилизация паром под давлением в автоклавах. Этот метод стерилизации основан на воздействии на стерилизуемые объекты насыщенного водяного пара при давлении выше атмосферного, при этом повышается температура кипения воды, а следовательно, и пара. Автоклав - герметически закрывающаяся стерилизационная камера, в которую помещают стерилизуемые объекты. В эту камеру поступает водяной пар из другой камеры, в которой кипит вода. Для определения давления, создающегося в

стерилизационной камере, служит манометр. Стерилизацию в автоклаве проводят в следующих режимах:

- 0,5 атм - 110 °С;
- 1,0 атм - 120 °С;
- 1,5 атм - 127 °С;
- 2,0 атм - 132 °С.

Время воздействия - 15-30 мин. В автоклавах стерилизуют лабораторную посуду, питательные среды (не теряющие своих свойств при высокой температуре), операционное белье и перевязочный материал, инъекционные растворы, некоторые виды медицинского инструментария. Дробная стерилизация текучим паром. Этот способ применяют в тех случаях, когда стерилизуемый объект изменяется при температуре выше 110 °С. Нагревание до температуры 100 °С проводят 3 раза с интервалом 24 ч, в течение которого споры, не погибающие при температуре 100 °С, переходят в вегетативные формы, которые уничтожаются при последующей обработке паром. Дробную стерилизацию при нагревании до температуры 60 °С в течение 5-6 дней называют *тиндализацией*.

Стерилизация горячим воздухом (сухожаровая стерилизация). В сухожаровых шкафах (печах Пастера) при температуре 160-180 °С стерилизуют лабораторную посуду, металлический инструментарий, другие термостойкие вещества.

Стерилизация ионизирующим излучением. Гамма-лучами и энергией ускоренных электронов стерилизуют объекты, разрушающиеся под действием высоких температур, - изделия из полимерных материалов (одноразовые шприцы, катетеры, системы для внутривенных вливаний), некоторые лекарственные средства (ЛС).

Стерилизация прокаливанием. На огне спиртовки при температуре до 400 °С стерилизуют бактериологические петли, иглы.

Химическую стерилизацию проводят с помощью токсичных газов - окиси этилена, формальдегида, глутарового альдегида. Эти вещества разрушают нуклеиновые кислоты и ферментные системы микроорганизмов и приводят их к гибели. Данный вид стерилизации применяют для обработки изделий из термолабильных материалов. Недостаток этого метода стерилизации заключается в том, что частицы токсических химических веществ остаются на обрабатываемых объектах.

Фильтрацию (механический способ стерилизации) применяют для обработки жидкостей, совершенно не выдерживающих нагревания (питательные среды, ЛС), а также для очистки бактериальных токсинов, бактериофагов от бактерий. Для этого используют мембранные фильтры, диаметр пор которых меньше размера бактериальных клеток.

Лучевая, химическая стерилизация и фильтрование - методы холодной стерилизации.

7.1.2. Дезинфекция

Дезинфекция (от лат. *des* - «отрицание», *infectio* - «инфекция») - комплекс мероприятий, направленных на уничтожение во внешней среде не всех микроорганизмов, а только определенных возбудителей инфекционных заболеваний.

Виды дезинфекции

Различают механические, физические и химические способы дезинфекции.

Механическая дезинфекция приводит к значительному уменьшению числа патогенных микроорганизмов, однако не позволяет достигнуть полного обеззараживания обрабатываемых объектов. Механическую дезинфекцию осуществляют путем встряхивания, влажной уборки, вентиляции помещений и др.

Физическую дезинфекцию осуществляют с помощью высокой температуры, ультрафиолетовых лучей.

Кипячением при температуре 100 °С дезинфицируют хирургические инструменты, иглы.

Пастеризация - уничтожение бесспорных форм микроорганизмов нагреванием до температуры 65-70 °С в течение 15-30 мин. Пастеризуют пищевые продукты (молоко, вино и др.) в целях освобождения от патогенных бесспорных форм микроорганизмов и микроорганизмов, вызывающих порчу продукта.

Ультрафиолетовое излучение применяют для обеззараживания воздуха в операционных, перевязочных, микробиологических лабораториях.

Химическая дезинфекция - применение сильнодействующих химических веществ, называемых дезинфектантами, которые действуют неизбирательно. С их помощью обеззараживают выделения больного (гной, кал, мокроту и др.), лабораторную посуду перед дальнейшей обработкой, рабочее место после окончания работы с заразным материалом, т.е. вне живого организма.

Различают дезинфекцию:

- *текущую* (в течение рабочего дня, всего времени пребывания больного в помещении);
- *заключительную* (проводимую по окончании работы, после удаления больного из данного помещения).

7.2. ПОНЯТИЕ ОБ АСЕПТИКЕ И АНТИСЕПТИКЕ. МЕТОДЫ АСЕПТИКИ И АНТИСЕПТИКИ

Асептика - система профилактических мероприятий, направленных на предупреждение попадания микроорганизмов и их спор в рану, ткани больного при хирургических операциях, перевязках, эндоскопических манипуляциях и др.

Асептика включает:

- стерилизацию инструментов, материалов, соприкасающихся с раной;
- специальную обработку рук медицинского персонала;
- соблюдение специальных правил и приемов работы при проведении операций и др.;
- осуществление специальных санитарно-гигиенических мероприятий в лечебных учреждениях.

Антисептика - комплекс мероприятий, направленных на уничтожение микроорганизмов в ране, а также на предупреждение или ликвидацию инфекционного процесса. Для антисептических мероприятий применяют, как правило, химические антибактериальные средства неспецифического действия. Различают механическую, физическую, химическую и биологическую антисептику.

• *Механическая антисептика* - механическое удаление инфицированных и нежизнеспособных тканей, хирургическая обработка ран.

• *К физическим методам антисептики* относят применение гигроскопических повязок, дренажей.

• *Биологическая антисептика* - применение антибиотиков, бактериофагов, протеолитических ферментов.

- *Химическую антисептику* проводят с помощью специальных антисептических средств, обладающих микробоцидным или микростатическим действием. Эти средства наносят на кожу, слизистые оболочки, раневую поверхность для предупреждения развития местных инфекционных поражений, а также применяют для обработки инструментов, оборудования, помещений и др. Антисептики действуют на микроорганизмы неизбирательно, их применяют на поверхности живых тканей, так как из-за токсичности их нельзя применять системно (внутрь, парентерально).

- *Микробоцидные* антисептики вызывают гибель бактерий (бактерицидные), грибов (фунгицидные) и других форм микроорганизмов.

- *Микростатические* антисептики полностью или частично приостанавливают рост бактериальных клеток.

Антисептические препараты должны обладать высокой антибактериальной активностью, быть нетоксичными для макроорганизма, удобны в применении, растворимы в воде.

По химической структуре выделяют следующие группы антисептиков.

- *Поверхностно-активные вещества* (ПАВ) - мыла, катионные (дегмин), анионные (сульфанол) ПАВ, гуанидины (хлоргексидин). ПАВ вызывают необратимые повреждения клеточной стенки микроорганизмов, изменение проницаемости мембран. Используют для обработки помещений, а также рук персонала.

- *Спирты* - 70% этиловый[▲], 70% изопропиловый - вызывают коагуляцию белков бактериальной клетки. Применяют для обработки рук, инструментария.

- *Окислители* - пероксид водорода, перманганат калия - выделяют атомарный кислород, вызывающий нарушения ферментативных процессов в клетках.

- *Хлорсодержащие соединения* - хлорамин, гипохлорит натрия - выделяют атомарный хлор, вызывающий повреждения белков.

- *Йодосодержащие препараты* - 3-5% спиртовой раствор йода, йодофоры (йодиол[▲], йодонат[▲]) - вызывают коагуляцию белков бактериальной клетки, применяют для обработки операционного поля, мелких травм, лечения поверхностных повреждений кожи и слизистых оболочек.

- *Препараты серебра* - протаргол[▲], колларгол[▲] - также вызывают коагуляцию клеточных белков и применяют для обработки слизистых оболочек, раневых поверхностей.

- *Альдегиды* (формалин[▲]), *фенолы* (лизол) действуют на ферментные системы бактериальной клетки и вызывают денатурацию белков, весьма токсичны, применяют в настоящее время редко.

7.3. САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СМЫВОВ С РУК ПЕРСОНАЛА И ПОВЕРХНОСТЕЙ ПРЕДМЕТОВ

Основа санитарно-микробиологического метода исследования смывов с рук персонала и поверхности предметов - обнаружение бактерий группы кишечной палочки, показателей фекального загрязнения. Также определяют общее количество микроорганизмов (бактериальную обсемененность) в 1 см² исследуемой площади.

При взятии смыва пользуются стерильным ватным тампоном, смоченным в стерильном изотоническом растворе натрия хлорида. Смывы с поверхностей предметов делают с помощью трафаретов из проволоки, имеющих площадь 25 см². Обычно смыв берут с площади 100 см², накладывая трафарет на четыре различных участка исследуемой поверхности.

При исследовании смыва с рук тщательно протирают тампоном тыл кисти, ладонную поверхность, межпальцевые промежутки и подногтевые пространства сначала с левой, а затем с правой руки.

7.3.1. Определение общего количества микроорганизмов

Проводят смыв тампоном с поверхности площадью 25 см². Тампон опускают с пробирку с 2 мл стерильного изотонического раствора натрия хлорида и тщательно ополаскивают. Добавляют 8 мл стерильного изотонического раствора натрия хлорида, в итоге получая разведение 1:10, из которого готовят разведения 1:100 и 1:1000. Затем по 1 мл каждого разведения вносят на стерильную чашку Петри и заливают 10 мл расплавленного и охлажденного до температуры 45 °С агара. Общее количество бактерий в 1 см² поверхности предмета определяют по формуле:

$$n \times 10 / s,$$

где n - количество бактерий в 1 мл исходного смыва; 10 - количество изотонического раствора натрия хлорида, используемого для сорбции микроорганизмов с тампона, мл; s - площадь, с которой был сделан смыв.

7.3.2. Определение количества бактерий группы кишечной палочки

Количество бактерий группы кишечной палочки определяют трехэтапным бродильным методом путем посева смыва в среду Кесслера, подрачивая в течение суток при температуре 37 °С. При брожении в среде Кесслера или появлении мути делают пересев на среду Эндо. Подозрительные колонии, выросшие на среде Эндо, подвергают идентификации.

7.3.3. Определение эффективности дезинфекции

На исследуемую поверхность накладывают трафарет площадью 100 см². Проводят смыв с поверхности и посев. Затем трафарет накладывают на поверхность рядом с местом проведения смыва и обрабатывают дезинфицирующим веществом. Дезинфектанту дают высохнуть, после чего проводят смыв с обработанного дезинфектантом участка и высевают (как указано в разделе 7.3.1). Посевы инкубируют при температуре 37 °С. По окончании инкубации подсчитывают количество колоний, выросших на необработанном и обработанных дезинфектантами участках поверхности. Результаты вносят в таблицу (табл. 7.1).

Таблица 7.1. Форма таблицы для внесения результатов определения эффективности дезинфекции

Количество бактерий до обработки дезинфектантом	Количество бактерий после обработки дезинфектантом
---	--

7.4. АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ ХИМИОПРЕПАРАТЫ

7.4.1. Химиотерапия инфекционных заболеваний

Химиотерапия инфекционных заболеваний - лечение бактериальных, вирусных, грибковых, протозойных инфекций с помощью химиотерапевтических препаратов, которые избирательно подавляют жизнедеятельность соответствующих инфекционных агентов в организме человека.

Избирательность действия химиотерапевтических препаратов заключается в губительном воздействии только на микроорганизмы, не затрагивая (или затрагивая минимально) клетки макроорганизма.

Антибактериальные химиотерапевтические препараты разделяют на:

- антибиотики, которые получены на основе продуктов метаболизма микроорганизмов и избирательно подавляют жизнедеятельность других микроорганизмов, а также некоторых опухолей;

- синтетические антибактериальные препараты разного химического строения, не встречающиеся в живой природе, сходные с антибиотиками по антибактериальной активности.

Химиопрепараты могут оказывать на микроорганизмы микробицидное и микростатическое действие:

- микробицидные препараты вызывают гибель бактериальных клеток;
- микростатические препараты подавляют или задерживают их рост или размножение бактериальных клеток.

Для каждого препарата характерен спектр действия. По спектру действия различают антибактериальные, противогрибковые, противопротозойные, противовирусные препараты, а также противоопухолевые антибиотики. Среди них выделяют препараты:

- узкого спектра - действуют на небольшое количество разновидностей только грамположительных или грамотрицательных бактерий;
- широкого спектра - активны в отношении различных групп микроорганизмов.

Механизмы действия химиотерапевтических препаратов

Избирательность действия антибактериальных препаратов объясняется тем, что в макроорганизме отсутствуют мишени, на которые воздействуют эти ЛС. Таким образом, сохраняется жизнеспособность клеток человека, и антибактериальный препарат действует не на все, а на определенные микроорганизмы. При этом ингибируются жизненно важные структуры и процессы в бактериальной клетке. По механизму действия различают следующие группы химиотерапевтических препаратов.

- Ингибиторы синтеза клеточной стенки бактерий - β -лактамы, гликопептиды, липопептиды.

- Ингибиторы синтеза белка на рибосомах бактерий. Рибосомы бактериальных клеток отличаются от рибосом человека, что обеспечивает избирательность действия этой группы препаратов. К ним относят аминогликозиды, макролиды, тетрациклины, оксалидиноны, левомицетин[▲].

- Ингибиторы синтеза и функций цитоплазматической мембраны - полиены, полипептиды, липопептиды.

- Ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот - рифамицины, аминохинолины.

Синтетические химиотерапевтические препараты

Среди синтетических химиотерапевтических препаратов выделяют следующие группы.

- Сульфаниламиды - сульфадиметоксин, сульфадимидин и другие, а также комбинированные с триметопримом [ко-тримоксазол (бисептол[▲])] - препараты широкого спектра действия. По механизму действия эти ЛС - антиметаболиты, т.е. вещества, имеющие сходную с нормальными метаболитами структуру. Антиметаболиты могут ошибочно включаться в структуру микроорганизмов, в различные метаболические процессы, что приводит к угнетению роста и гибели клетки. Под действием сульфаниламидов нарушается ДНК, что приводит к подавлению роста и размножения бактериальной клетки.

- Нитрофураны - фурацилин[▲], фуразолидон - препараты широкого спектра действия. Механизм действия этих препаратов - нарушение энергетических процессов, а также повреждение ДНК бактериальной клетки.

- Оксихинолины - нитроксолин (5-НОК[▲]) и другие - препараты широкого антибактериального и антипротозойного спектра действия. Механизм действия - нарушение процессов клеточного дыхания.

- Аминохинолины - хлорохин и другие - антипротозойные препараты. Механизм действия - нарушение процессов синтеза ДНК.

- Хинолоны - налидиксиновая кислота (невиграмон[▲]), цiproфлоксацин, левофлоксацин и другие - большая группа, включающая препараты, действующие на грамотрицательные бактерии, а также препараты широкого спектра действия (только антибактериальные). Механизм антибактериального действия хинолонов - нарушение действия фермента ДНК-гиразы, формирующей суперспираль нитей ДНК, что приводит к гибели бактериальных клеток.

- Производные азолов

- *Нитроимидазолы* - метронидазол (трихопол[▲]) и другие - препараты, обладающие антипротозойным действием, а также активностью в отношении анаэробных бактерий. Механизм действия - нарушение метаболизма клеток и структуры ДНК.

- *Производные имидазола* (клотримазол и др.) и *триазола* (флуконазол) - противогрибковые препараты. Механизм действия - нарушение клеточной мембраны, что приводит к гибели грибковой клетки.

- Аллиламины. Ламизил[▲] - противогрибковый препарат. Механизм действия - нарушение синтеза клеточной мембраны грибов.

- Оксазалидиноны. Линезолид - препарат широкого спектра действия. Механизм действия - нарушение синтеза белков на рибосомах.

По химической структуре антибиотики подразделяют на следующие группы.

- β-Лактамные, в химической структуре которых имеется β-лактамное кольцо. К ним относят пенициллины, цефалоспорины, монобактамы, карбапенемы. Эти группы химиотерапевтических препаратов действуют на синтез клеточной стенки бактерий.

- Тетрациклины, в химической структуре которых есть четыре бензольных кольца (тетрациклин, доксициклин). Механизм действия связан с нарушением синтеза белка на рибосомах бактерий.

- Макролиды и азолиды (эритромицин, азитромицин). Эти препараты ингибируют синтез белка на рибосомах.

- Аминогликозиды (стрептомицин, гентамицин) - ингибиторы синтеза белка на рибосомах.

- Хлорамфеникол (левомицетин[▲]) - нарушает синтез белка на рибосомах.

- Полиены (нистатин, амфотерицин В) - повреждают клеточные мембраны.

- Пептидные - нарушают функции цитоплазматической мембраны микроорганизмов:

- *полипептиды* (полимиксин);

- *гликопептиды* (ванкомицин);

- *липопептиды* (даптомицин).

- Рифамицины (рифампицин). Механизм действия связан с блокированием синтеза нуклеиновых кислот.

- Линкозамиды (клиндамицин) - нарушают синтез нуклеиновых кислот бактериальной клетки.

Противогрибковые препараты

Противогрибковые препараты (антимикотики) - достаточно обширный класс разнообразных химических соединений природного и синтетического происхождения, обладающих специфической активностью в отношении патогенных грибов. По химическому строению эти препараты включают следующие группы:

- полиены (нистатин, амфотерицин В);
- азолы (флуконазол);
- аллиламины (тербинафин);
- препараты разных групп.

Механизм действия этих препаратов связан с нарушением синтеза особого вещества грибковой мембраны - эргостерола, что ведет к гибели клетки, а также нарушением синтеза ДНК (гризеофульвин). Антимикотики - высокотоксичные ЛС, поэтому многие из них рекомендуют только для наружного применения.

Противопротозойные препараты

Противопротозойные препараты - различные по химической структуре соединения, применяемые при инфекциях, вызванных простейшими: малярийными плазмодиями, ламблиями, амебами и др. Эти ЛС (хлорохин, хинин, сульфадоксин и др.) блокируют синтез нуклеиновых кислот, а также нарушают синтез фолиевой кислоты плазмодия, что ведет к гибели возбудителей.

Препараты, применяемые при других протозойных инфекциях (паромицин, меглюмин и др.), нарушают синтез белка на рибосомах.

Противовирусные препараты

Для лечения вирусных инфекций применяют противовирусные препараты различных групп, которые подавляют репродукцию вирусов на различных этапах; при этом не должны повреждаться клетки макроорганизма. Противовирусные препараты различаются по химической природе и механизму воздействия на вирусы:

- препараты, ингибирующие проникновение вируса в клетки и его депротенизацию [римантадин (ремантадин[♦])];
- препараты, ингибирующие репликацию вирусных нуклеиновых кислот (ацикловир, зидовудин);
- препараты, ингибирующие процессы формирования и выход из клетки новых вирионов (метисазон, тамифлю[♦]);
- препараты, действующие на внеклеточные формы вирусов (оксолин[♦]).

Кроме того, в противовирусной фармакотерапии широко применяют интерфероны, которые блокируют в клетке репродукцию вируса. Также нашли применение индукторы интерферона - группа высоко- и низкомолекулярных природных и синтетических соединений, стимулирующих продукцию эндогенных интерферонов (амиксин[♦]).

7.4.2. Методы определения чувствительности бактерий к антибиотикам

Современные методы определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (АБП) разделяют на методы серийных разведений и диффузионные методы.

- Методы серийных разведений основаны на определении основного количественного показателя, характеризующего биологическую активность АБП,

величины его минимальной подавляющей концентрации (МПК), т.е. минимальной концентрации, подавляющей рост исследуемого микроорганизма. Для этого определенные концентрации АБП вносят в питательную среду, в которую затем засевают исследуемый микроорганизм. После инкубации оценивают наличие или отсутствие видимого роста. В зависимости от типа используемой питательной среды различают методы серийных разведений в агаре или бульоне.

- Диффузионные методы определения чувствительности основаны на диффузии АБП в плотную питательную среду и подавлении роста исследуемой культуры в той зоне, где концентрация АБП превосходит МПК. В настоящее время существуют две основные модификации диффузионного метода: диско-диффузионный и E-тест.

— В *диско-диффузионном методе* в качестве носителя АБП используют бумажный диск, пропитанный антибиотиком. Образование зоны подавления роста происходит в результате диффузии АБП из носителя в питательную среду. Величина диаметра зоны подавления роста обратно пропорциональна МПК. Однако диско-диффузионный метод позволяет лишь косвенно судить о величине МПК, в результате микроорганизм относят к одной из категорий чувствительности: чувствительный, промежуточный или резистентный.

— *E-тест* представляет собой узкую полимерную полоску, на которую нанесен градиент АБП (от минимальных до максимальных) (рис. 7.1). Подавление роста микроорганизмов вокруг полоски E-теста происходит в той зоне, где концентрация АБП, диффундирующего из полоски, выше МПК, при этом образуется каплевидная зона ингибиции. Величину МПК учитывают в том месте, где граница зоны подавления роста плотно подходит к полоске, на которой нанесены концентрации АБП.

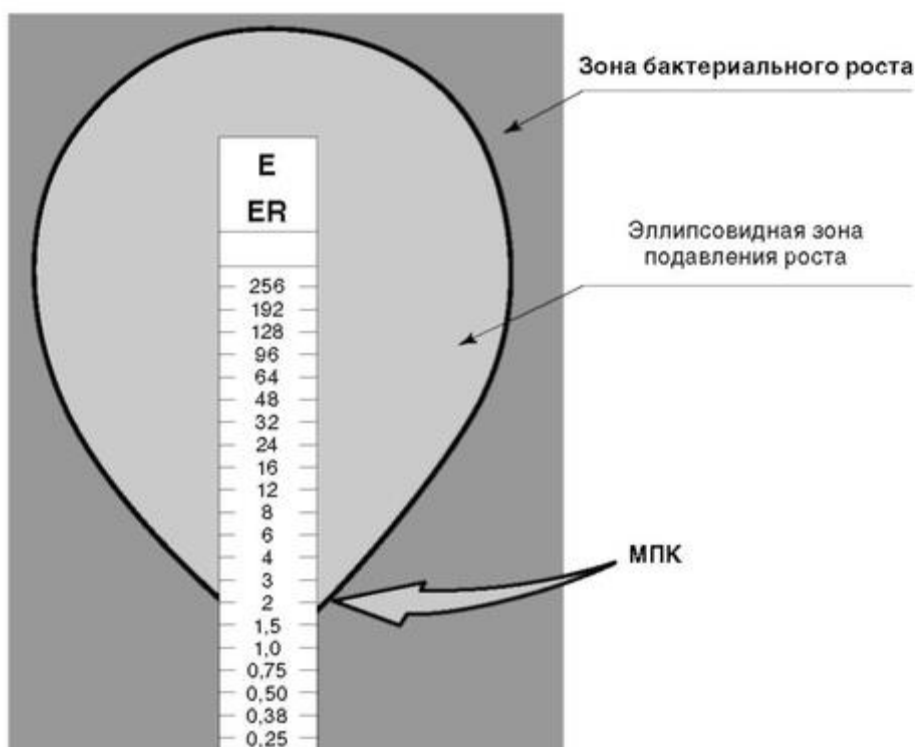


Рис. 7.1. E-тест

Постановка диско-диффузионного метода. Для оценки чувствительности необходимо использовать только специально предназначенные для этой цели среды (агар Мюллера-Хинтон).

- Перед разливом расплавленного агара чашки Петри помещают на горизонтальную поверхность, выверенную по уровню. Расплавленный агар разливают в

чашки в таком количестве, чтобы величина его слоя в чашке составляла 4-5 мм (на чашку диаметром 10 см требуется 25 мл агара). Перед посевом чашки подсушивают в термостате.

- Посевной материал должен представлять бактериальную суспензию с концентрацией бактерий, равной $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл, оптическая плотность данной концентрации соответствует стандарту мутности 0,5 по стандарту Мак-Фарланда. Для приготовления такой суспензии отбирают несколько однотипных, четко изолированных колоний исследуемой культуры, выращенной на неселективной питательной среде. Петлей переносят незначительное количество материала с верхушки колонии в пробирку со стерильным физиологическим раствором, доводя плотность суспензии до 0,5 по стандарту Мак-Фарланда. Приготовленную суспензию можно использовать в течение 15 мин после приготовления.

- Наиболее удобный способ посева - использование стерильных ватных тампонов. Тампон погружают в приготовленную суспензию исследуемого микроорганизма, избыток суспензии удаляют, отжимая тампон о стенку пробирки. Посев проводят штриховыми движениями в трех направлениях, поворачивая чашку Петри на 60° .

- Не позднее 15 мин после посева на поверхность питательной среды наносят с помощью стерильного пинцета диски с АБП. Расстояние диска от края чашки и между дисками должно составлять 15-20 мм. На одну чашку помещают не более 6 дисков.

- После аппликации дисков чашку Петри помещают в термостат дном вверх. Инкубацию проводят при температуре 35°C в течение 18-24 ч.

- По окончании инкубации измеряют диаметр зоны ингибиции роста, выражая его в миллиметрах.

- Интерпретация результатов оценки антибиотикочувствительности заключается в отнесении исследуемого микроорганизма к одной из трех категорий: чувствительный, промежуточный, устойчивый.

- Для интерпретации результатов на основании сопоставления результатов исследования (диаметра зоны ингибиции роста) с пограничными значениями этого параметра, отделяющего чувствительные штаммы от промежуточных и промежуточные от устойчивых, используют специальные таблицы (табл. 7.2).

Таблица 7.2. Оценка степени чувствительности бактериальной культуры к антибиотикам

Антибактериальные препараты в диске	Диаметр зон для культур, мм		
	устойчивых (R)	промежуточных (I)	чувствительных (S)
Ампициллин	≤ 9	10-13	≥ 14
Карбенициллин 25 мкг	≤ 14	15-18	≥ 19
Цефазолин	≤ 14	15-18	≥ 19
Цефалотин	≤ 14	15-18	≥ 19
Цефуроксим	≤ 14	15-18	≥ 19
Цефотаксим	≤ 14	15-20	≥ 21

Цефтриаксон	≤14	15-20	≥21
Цефтазидим	≤14	15-17	≥18
Цефалексин	≤14	15-18	≥19
Тетрациклин	≤16	17-21	≥22
Хлорамфеникол (левомицетин [▲])	≤15	16-18	≥19
Канамицин	≤14	15-18	≥19
Гентамицин	≤15	—	≥16
Амикацин	≤14	15-16	≥17
Нетилмицин	≤12	13-14	≥15
Стрептомицин	≤16	17-19	≥20
Полимиксин	≤11	12-14	≥15
Нитрофурантоин (фурадонин [▲])	≤15	16-18	≥19
Офлоксацин	≤12	13-16	≥17
Ципрофлоксацин	≤15	16-20	≥21

Результаты проведенной работы по определению степени чувствительности к антибиотикам выделенной чистой культуры заносят в таблицу (табл. 7.3).

Таблица 7.3. Форма таблицы для внесения результатов чувствительности выделенной чистой культуры бактерий к антибиотикам

Антибиотик	Диаметр зоны ингибиции роста	Степень чувствительности
------------	------------------------------	--------------------------

Вопросы для самоконтроля

1. Полуколичественный метод определения степени чувствительности бактерий к антибиотикам - ...

2. Оценку степени чувствительности бактерий к антибиотикам методом бумажных дисков проводят по .

3. Среду Кесслера используют для определения .

4. Пастеризация - тепловой метод .

5. Для стерилизации питательных сред, содержащих компоненты, разрушающиеся при температуре выше 110 °С, используют ...

Модуль 8. УЧЕНИЕ ОБ ИНФЕКЦИИ. ИНФЕКЦИОННЫЙ ПРОЦЕСС. СВОЙСТВА ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ. БИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ

Цели модуля

- Знать: определение понятий «инфекция», «инфекционный процесс»; формы инфекций; свойства патогенных микроорганизмов.
- Уметь: определять факторы патогенности микроорганизмов и оценивать результаты экспериментов.
- Владеть: методами заражения лабораторных животных, техникой приготовления мазков-отпечатков.

8.1. ПОНЯТИЕ ОБ ИНФЕКЦИОННОМ ПРОЦЕССЕ И ИНФЕКЦИОННОМ ЗАБОЛЕВАНИИ. ФОРМЫ ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА

Инфекционный процесс - процесс взаимодействия патогенного микроорганизма и восприимчивого макроорганизма в конкретных условиях окружающей среды.

Формы инфекционного процесса представлены в таблице 8.1.

Таблица 8.1. Формы инфекций

Признак	Форма инфекции
Природа возбудителя (этиология)	<ul style="list-style-type: none"> • Бактериальная. • Вирусная. • Грибковая. • Протозойная. • Прионная

Окончание табл. 8.1

Признак	Форма инфекции
Происхождение	<ul style="list-style-type: none"> • Экзогенная. • Эндогенная
Локализация возбудителя в организме хозяина	<ul style="list-style-type: none"> • Местная (очаговая). • Общая (генерализованная): <ul style="list-style-type: none"> - бактериемия; - сепсис; - септикопиемия; - токсико-септический шок
Количество видов возбудителей	<ul style="list-style-type: none"> • Моноинфекция. • Смешанная инфекция
Источники инфекции	<ul style="list-style-type: none"> • Человек (антропонозная). • Животное (зоонозная). • Внешняя среда (сапронозная)

Продолжительность	<ul style="list-style-type: none"> • Острая. • Хроническая. • Носительство
Повторные проявления заболевания	<ul style="list-style-type: none"> • Вторичная инфекция. • Реинфекция. • Суперинфекция. • Рецидив

Крайняя степень этого взаимодействия - инфекционная болезнь, характеризующаяся образованием патологического очага и проявлением специфических клинических симптомов.

Динамика развития инфекционной болезни

- Первый период - инкубационный - время от момента заражения до возникновения первых признаков болезни; длится от нескольких часов до нескольких лет. Микроорганизмы попадают в макроорганизм, адгезируются на чувствительных клетках в месте входных ворот и начинают размножаться. Клинические симптомы отсутствуют. В окружающую среду возбудитель не выделяется. Длительность периода составляет от нескольких часов (грипп), дней (дифтерия) до нескольких лет (СПИД).

- Второй период - продромальный - характеризуется общими симптомами: слабостью, головной болью, повышением температуры. Длится от нескольких часов до нескольких дней. Происходят колонизация и распространение микроорганизмов в организме хозяина.

- Третий период - развитие болезни - включает три стадии:
 - возникновение;
 - нарастание;
 - угасание клинических симптомов.

Симптомы специфичны для каждого заболевания. Микроорганизмы размножаются, выделяют токсины. В этот период больной заразен, возбудитель выделяется в окружающую среду.

- Четвертый период - разрешение - при выздоровлении прекращается размножение микроорганизмов, выделение их в окружающую среду. В организме происходит восстановление функций. При формировании носительства происходит пребывание возбудителя в макроорганизме. Возможен летальный исход.

Возбудители инфекции - микроорганизмы, которые обладают способностью проникать и прикрепляться к клеткам определенных органов, размножаться и колонизировать эти участки, вызывая инфекционную болезнь. Для развития инфекционной болезни необходима инфицирующая доза возбудителя - минимальное количество бактериальных клеток, способных вызвать инфекционный процесс.

8.2. ПОНЯТИЕ О ПАТОГЕННОСТИ И ВИРУЛЕНТНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ

- Патогенность - способность микроорганизмов вызывать инфекционный процесс у чувствительных к нему организмов. Это видовой признак, определяется группой генов.

- Вирулентность - степень патогенности, связана с живой клеткой возбудителя. Это индивидуальный, фенотипический признак. Вирулентность возбудителя зависит от химического состава и метаболизма клетки, условий окружающей среды. Вирулентность выражается в следующих единицах.

- DCL - абсолютная смертельная доза: наименьшее количество микроорганизмов, которые при определенном способе заражения вызывают гибель 100% восприимчивых животных определенного пола, возраста, массы тела.

- DIM - минимальная смертельная доза: наименьшее количество микроорганизмов, которые при определенном способе заражения вызывают гибель 95% восприимчивых животных определенного пола, возраста, массы тела.

- LD₅₀- полуметальная доза: наименьшее количество микроорганизмов, которые при определенном способе заражения вызывают гибель 50% восприимчивых животных определенного пола, возраста, массы тела.

8.2.1. Определение степени вирулентности бактерий (LD₅₀)

Культуры бактерий в различных разведениях вводят группам лабораторных животных. Через определенное время регистрируют гибель животных, отмечают число погибших в каждой группе и рассчитывают LD₅₀ по формуле:

$$\lg LD_{50} = \lg DN - a(\Sigma h - 0,5),$$

где DN - наибольшая из испытанных доз или разведений; a - логарифм отношения каждой последующей дозы к предыдущей (при десятикратном интервале эта величина равна 1); h - отношение числа погибших от данной дозы животных к общему количеству животных, которым была введена эта доза; Σh - сумма всех значений h для всех испытанных доз.

8.2.2. Факторы патогенности

Вирулентность микроорганизма обеспечивается факторами патогенности, к которым относятся следующие.

- *Колонизация* - способность микроорганизмов размножаться в тканях или органах, что обеспечивает накопление бактериальных клеток.

- *Адгезия* - прикрепление микроорганизмов к клеткам макроорганизма. Данный процесс включает взаимодействие бактериальных клеток и рецепторов чувствительных клеток макроорганизма. Это физико-химический процесс, связанный с гидрофобностью бактериальной клетки и наличием у них адгезинов. Адгезия специфична для каждого микроорганизма с учетом его тропности к клеткам и тканям. У грамотрицательных бактерий адгезинами являются пили и белки наружной мембраны, у грамположительных - поверхностные белки и тейхоевые кислоты.

- *Пенетрация* - способность возбудителя проникать внутрь эпителиальных клеток, лейкоцитов, лимфоцитов, нарушая их целостность.

- *Инвазия* - способность микроорганизмов проникать через слизистые и соединительнотканые барьеры, что ведет к распространению микроорганизма в макроорганизме. Инвазины осуществляют проникновение патогена в клетку хозяина.

8.2.3. Определение факторов патогенности микроорганизмов

Обнаружение гемолизина

Испытуемую культуру микроорганизма засевают методом бляшек на кровяной МПА, инкубируют в термостате при температуре 37 °С в течение 24 ч. При положительном результате вокруг колоний наблюдают зоны гемолиза:

- альфа-гемолиз (неполный) проявляется в виде мутного зеленоватого просветления среды вокруг колоний микроорганизма;
- бета-гемолиз (полный) проявляется в виде прозрачной светлой зоны вокруг колоний микроорганизма.

Обнаружение плазмокоагулазы

Плазмокоагулаза - фермент, который коагулирует плазму крови с образованием сгустка. Испытуемую культуру вносят в пробирку с разведенной (1:3) кроличьей плазмой, инкубируют в термостате при температуре 37 °С в течение ночи. При положительном результате образуется сгусток плазмы.

Обнаружение гиалуронидазы

Гиалуронидаза - фермент, разрушающий гиалуроновую кислоту, которая входит в состав соединительной ткани. Раствор гиалуроната, дающий в присутствии 2N уксусной кислоты типичный сгусток, разливают по 0,5 мл в стерильные пробирки. Добавляют 0,5 мл суточной культуры микроорганизма в пептонной воде. Контролями служат гиалуронат + дистиллированная вода и гиалуронат + незажаренная среда. Смеси встряхивают и выдерживают при температуре 37 °С в течение 15-20 мин. Затем в каждую пробирку добавляют по две капли 2N раствора уксусной кислоты и встряхивают. В контролях должен образоваться слизистый комочек. В опыте при наличии гиалуронидазы он отсутствует, что свидетельствует о деструкции гиалуроновой кислоты бактериальным ферментом.

Для определения гиалуронидазы биологическим методом используют кератоконъюнктивальную пробу Шереня. Эмульсию исследуемого микроорганизма капают под нижнее веко кролику. Через 3-4 дня наблюдают явления кератоконъюнктивита в виде нагноения и помутнения роговицы.

Токсигенность

Токсигенность - способность микроорганизмов выделять ядовитые продукты - токсины, повреждающие клетки и органы макроорганизма. Бактерии вырабатывают как эндо-, так и экзотоксины, сравнительная характеристика которых представлена в таблице 8.2.

Таблица 8.2. Сравнительная характеристика бактериальных токсинов

Экзотоксины	Эндотоксины
Образуют грамположительные и грамотрицательные бактерии	Образуют грамотрицательные бактерии
Выделяются в окружающую среду	Находятся внутри клетки и выделяются при ее разрушении
Белки	Гликополисахариды
Высокотоксичны	Слаботоксичны
Характеризуются избирательностью, органо- и цитотропны, определяют клиническую картину заболевания	Избирательным действием не обладают, неспецифичны
Термолабильны*	Термостабильны
Антигенные свойства высокие	Слабые антигены

Обезвреживаются формалином и нагреванием температурой, сохраняя антигенную специфичность и иммуногенность (анатоксины)	Обезвреживаются трудно
Продукция экзотоксина обусловлена конвертирующими бактериофагами	Образование эндотоксина обусловлено хромосомными генами
Представители: <i>C. tetani</i> , <i>C. diphtheria</i> , <i>V. cholerae</i>	Представители: <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i>

*Энтеротоксины стафилококков - термостабильные экзотоксины

Для обнаружения эндотоксина используют ЛАЛ-тест (*Limulus Amebocyte Lysate*). В основе этого теста лежит способность лизата амёбоцитов (клеток крови) мечехвоста вида *Limulus polyphemus* специфически реагировать с эндотоксинами грамотрицательных бактерий. В результате реакции эндотоксина и лизата происходит помутнение реакционной смеси или образование твердого геля, что и служит индикатором присутствия эндотоксина. Природа реакции заключается в последовательной активации эндотоксином каскада ферментов (сериновых протеаз, находящихся в лизате амёбоцитов), в результате чего происходят ферментативное разрушение растворимого белка-коагулогена и превращение его в нерастворимый коагулин-гель. При этом в реакционной смеси происходит вначале помутнение, а затем образуется плотный гель.

Для обнаружения эндотоксина исследуемые материалы смешивают ЛАЛ-реактивом, проводят инкубацию при температуре 37 °С в течение 60 мин, оценивая происходящие изменения. Метод широко используют при проверке ЛС и растворов парентерального применения на пирогенность.

Определение продукции экзотоксинов изложено в модуле 9.

8.3. БИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ

Биологический метод исследования заключается в воспроизведении модели инфекции на лабораторных животных. Метод используют для изучения патогенности и вирулентности микроорганизмов с последующим выделением чистой культуры возбудителя. Лабораторных животных (белых мышей, крыс, кроликов) взвешивают, маркируют. Исследуемым материалом заражают накожно, внутрикожно, внутримышечно, внутривенно, внутрибрюшинно, интраназально.

Наблюдают за клиническими проявлениями инфекционного процесса. После гибели животного производят вскрытие и патологоанатомическое изучение внутренних органов, соблюдая правила асептики. Осматривают кожу, подкожную клетчатку, состояние лимфатических узлов. Определяют локализацию патогена в организме. Для посева крови из сердца его поверхность прижигают раскаленным пинцетом и в полость сердца вводят стерильный капилляр. Каплю крови засевают на поверхность питательной среды или используют для приготовления микропрепарата. Брюшную полость вскрывают продольным разрезом, не задевая кишечник. Осматривают органы брюшной полости (наличие экссудата, размеры, цвет, поверхность, консистенцию). Используя стерильные ножницы и пинцет, отрезают кусочки органов и прикасаются поверхностью разреза к предметному стеклу. Мазки-отпечатки фиксируют и окрашивают. Учитывают присутствие возбудителя в различных органах и тканях. При необходимости проводят посев на питательные среды для дальнейшей идентификации возбудителя. Труп животного подлежит уничтожению. Весь ход исследования протоколируют.

Вопросы для самоконтроля

1. Период инфекционного заболевания, характериземый появлением неспецифических симптомов, называют ...
2. Вирулентность измеряют в ...
3. ЛАЛ-тест используют для определения ...
4. На кровяном агаре определяют .

МОДУЛЬ 9. СЕРОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ В ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Цели модуля

- Знать: механизм серологических реакций.
- Уметь: ставить РА на стекле, РПГА, РСК, ИФА, РИФ, РТГА.
- Владеть: методами оценки результатов серологических реакций.

9.1. РЕАКЦИИ ИММУНИТЕТА

Реакциями иммунитета называют феномены, которые можно наблюдать при взаимодействии антигена с антителом. Все реакции иммунитета характеризуются большой чувствительностью и специфичностью, что позволяет их использовать при лабораторной диагностике инфекционных заболеваний.

Иммунологические реакции могут быть использованы:

- для определения антигенов возбудителя, выделенного от больного или из внешней среды;
- обнаружения антител в сыворотке больного или реконвалесцента.

В первом случае неизвестный антиген определяют по известному антителу (диагностическая сыворотка). Для обнаружения антител в сыворотке человека используют известный антиген (диагностикум).

Реакции иммунитета протекают в две фазы:

- первая - специфическое взаимодействие антигена с антителом, в результате чего образуется иммунный комплекс («антиген-антитело»);
- вторая - вызывает изменения, видимые для глаза, позволяющие зафиксировать результат (агглютинацию - образование хлопьев, преципитацию - помутнение и др.).

Большое значение имеют иммунные методы выявления антигенов возбудителей. Их можно обнаружить уже на самых ранних этапах инфекционного процесса, что делает возможной экспресс-диагностику, а количественное определение антигенов в динамике заболевания служит критерием эффективности проводимого лечения.

Антигены микроорганизмов специфичны. Вместе с тем бактериальные антигены могут быть общими для отдельных систематических категорий. Так, существуют антигены, характерные для целых семейств, родов и видов. Внутри видов могут быть выделены серологические группы (серогруппы), варианты (серовары) или типы (серотипы).

При использовании иммунологических методов возможны ложноположительные результаты, во всех случаях они связаны с неспецифическим связыванием антител с антигенами или перекрестным реагированием антигенов с антителами. Ложноотрицательные результаты возникают из-за недостаточного количества

специфических антител или антигенов в пробе и недостаточной чувствительности методов определения.

Для выявления количества антител определяют титр реакции - наибольшее разведение сыворотки, при котором наблюдается положительная реакция, а также нарастание титра, для чего исследуют парные сыворотки. Первую сыворотку берут у больного в острый период, в начале болезни, хранят при температуре 4-8 °С, а вторую - через 10-14 дней. Сыворотки исследуют одновременно. О болезни свидетельствует сероконверсия, т.е. нарастание титра антител во второй сыворотке по отношению к первой в 4 раза и выше. В связи с тем что при таком исследовании результат становится известен только через 2 нед, его применяют в основном для ретроспективной диагностики. При некоторых заболеваниях (в основном при тех, после которых не формируется длительный, напряженный иммунитет: сифилисе, хламидиозе, ВИЧ-инфекции, бруцеллезе) достаточно однократного обнаружения высоких титров специфических антител.

Определение принадлежности антител к определенным классам иммуноглобулинов (IgM, IgG, IgA и др.) позволяет дифференцировать инфекционную болезнь от иммунизации, первичное заболевание от повторного, уточнить фазу инфекционного процесса.

- При острой инфекции в сыворотке крови пациента выявляют IgM и другие ранние антитела (IgG к предранним белкам вирусов, низкоавидные IgG).

- При вторичном инфицировании, хронической инфекции и носительстве в сыворотке обнаруживают IgG и IgA.

- Если болезнь перенесена давно или человек был вакцинирован, регистрируют стабильно низкие титры IgG.

В случае выраженной иммуносупрессии синтез антител может быть подавлен, что существенно затрудняет постановку диагноза.

Для выявления неизвестных антигенов необходимы диагностические иммунные сыворотки. Существует два основных способа получения диагностических сывороток.

Первый способ получения диагностических сывороток

При этом способе используют иммунизацию животных (кроликов, лошадей) известными антигенами. При введении антигена животному начинается синтез антител против данного антигена. Далее у животного забирают кровь и получают из нее сыворотку. Приготовленную подобным образом нативную сыворотку называют неадсорбированной. Нативная сыворотка содержит антитела ко всем антигенам микроорганизма, который использовали для иммунизации. Такая сыворотка в низких разведениях может давать положительную реакцию агглютинации с родственными видами микроорганизмов за счет наличия групповых антигенов.

Для получения антител против отдельных антигенов сыворотку адсорбируют по методу Кастеллани.

Пример. При иммунизации кролика микроорганизмом I с определенной антигенной структурой (например, а, в, с) в его сыворотке образуются соответствующие антитела (А, В, С). При взаимодействии полученной сыворотки с микроорганизмом II (антигенное строение - с, б, е) происходит адсорбция антител С на антигене с; в сыворотке остаются только антитела А и В. Для дальнейшего истощения сыворотки можно провести взаимодействие с микроорганизмом III (а, г, д) - антитела А адсорбируются на антигене, а в сыворотке остаются лишь антитела В - полученную сыворотку называют адсорбированной. Адсорбированные сыворотки могут быть:

- *монорецепторными* (моновалентными), т.е. содержащими антитела к одному антигенному рецептору;

- *поливалентными*, содержащими антитела к нескольким антигенам.

Таким образом, различают диагностические агглютинирующие сыворотки:

- нативные, или неадсорбированные;

- адсорбированные (монорецепторные и поливалентные).

Помимо агглютинирующих диагностических сывороток, существуют преципитирующие, лизирующие, меченые и др.

Полученные от иммунизированных животных сыворотки титруют, добавляют консервант и в стерильных условиях разливают в ампулы. Сыворотки выпускают в жидком и сухом виде.

Второй способ получения диагностических сывороток

При этом способе используют гибридомы, полученные генно-инженерным путем. Гибридомы - гибриды иммунных В-лимфоцитов и миеломных (опухолевых) клеток, которые синтезируют строго специфичные моноклональные антитела.

Для выявления антител у больного используют диагностикумы (известные антигены), которые представляют собой взвесь убитых (спиртом, формалином, нагреванием и др.) микроорганизмов определенного вида. Например, брюшнотифозный диагностикум - взвесь убитых брюшнотифозных бактерий. Кроме того, в последнее время появились другие варианты диагностикумов:

- лизатные - использующие смесь нативных антигенов (лизированный или обработанный ультразвуком возбудитель инфекции, полученный в культуре);

- рекомбинантные - использующие полученные генно-инженерным способом белки - аналоги определенных белковых антигенов возбудителя;

- пептидные - использующие химически синтезированные фрагменты белков.

9.2. РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ

Реакция агглютинации (РА) - иммунная реакция взаимодействия антител с корпускулярными антигенами (бактерий, частиц латекса с адсорбированными антигенами, эритроцитов) в изотоническом растворе натрия хлорида. В случае если антитела комплиментарны антигенам, антигены склеиваются посредством антител (агглютинируются) с образованием макромолекулярного иммунного комплекса, что проявляется образованием хлопьевидного осадка. Образовавшийся осадок называют агглютинатом. Образование хлопьев происходит за счет того, что антитела имеют два активных центра, а антигены поливалентны, т.е. имеют несколько антигенных детерминант. В случае если антитела и антигены не комплиментарны, хлопья отсутствуют (рис. 9.1).

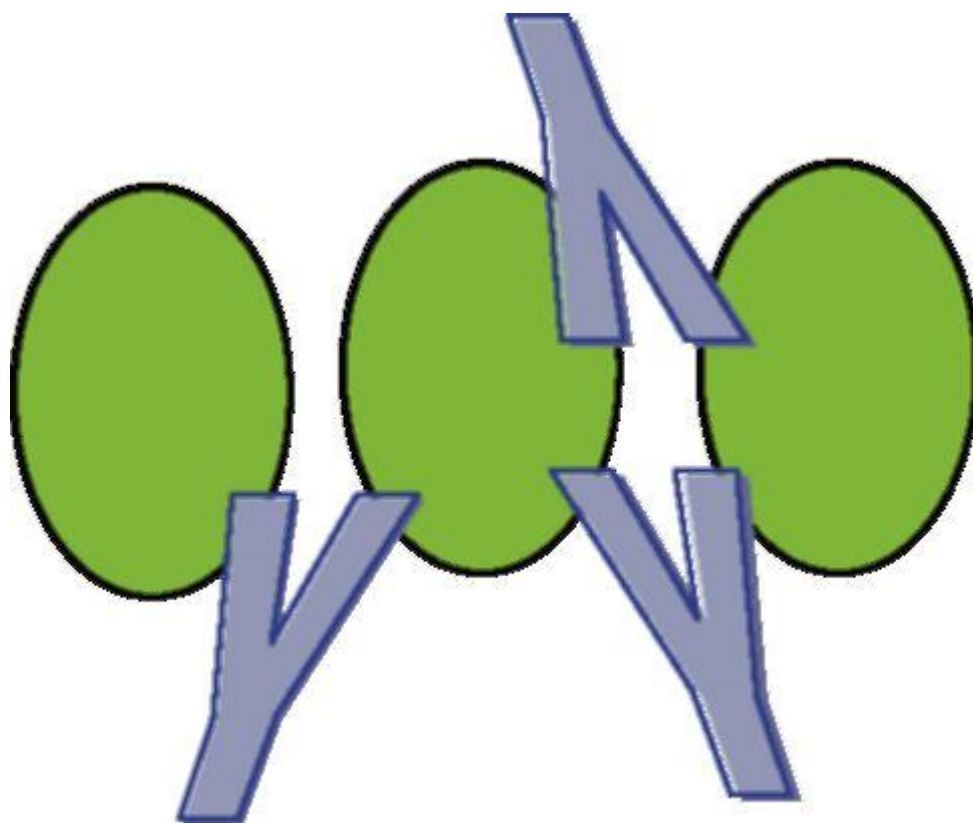


Рис. 9.1. Реакция агглютинации

Данную реакцию можно использовать как для поиска антигенов, так и для поиска антител в сыворотке больного, при этом неизвестный компонент определяют по известному:

- для обнаружения антигенов используют агглютинирующие диагностические сыворотки, содержащие известные антитела;
- для обнаружения антител в сыворотке больного используют диагностикумы (известные антигены).

В зависимости от антигенных свойств бактерий существует два вида агглютинации.

- О-агглютинация - бактерии агглютинируются посредством соматического О-антигена непосредственно своими телами, при этом образуются мелкие, компактные зерна.
- Н-агглютинация - бактерий склеиваются друг с другом через жгутики (Н-антиген), при этом образуются рыхлые хлопья.

Методы постановки реакции. Существуют два основных метода постановки реакции агглютинации: развернутая агглютинация в пробирках и агглютинация на предметном стекле.

9.2.1. Развернутая агглютинация в пробирках

Методика постановки реакции развернутой агглютинации для определения титра антител в сыворотке больного (табл. 9.1).

- Сыворотку получают из крови, взятой стерильно из локтевой вены или из пальца в количестве 1-2 мл.
- Перед постановкой реакции готовят исходное разведение испытуемой сыворотки 1:25, которую прогревают 30 мин при температуре 56 °С в водяной бане или аппарате АИС.

- Диагностикум (антигены известных бактерий) перед постановкой реакции тщательно размешивают встряхиванием и разводят в 10 раз (до 10^9 КОЕ/мл) 0,85% раствором натрия хлорида.

- Далее готовят серийные разведения сыворотки больного. Для этого берут семь пробирок. В пять пробирок вносят по 0,5 мл 0,85% раствора натрия хлорида. Затем в первую пробирку вносят 0,5 мл сыворотки в рабочем разведении (1:25). Изотонический раствор натрия хлорида и сыворотку тщательно перемешивают, набирая смесь в пипетку и выливая в пробирку (в результате в первой пробирке получается разведение 1:50). Смесь из первой пробирки в количестве 0,5 мл переносят во вторую пробирку, из второй - в третью и т.д. Из пятой пробирки 0,5 мл смеси выливают (во всех пробирках должен быть равный объем). Таким образом получают последовательные двукратные серийные разведения сыворотки - 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 (титр агглютининов в сыворотке больного обычно не превышает 1:800, поэтому дальнейшее разведение сыворотки не имеет смысла).

- В первые пять пробирок вносят по 0,5 мл 10^9 КОЕ/мл суспензии диагностикума. В предпоследнюю пробирку (контроль сыворотки) вносят только сыворотку (1:25). В последнюю пробирку помещают контроль антигенов: к 0,5 мл 0,85% раствора натрия хлорида добавляют 0,5 мл 10^9 КОЕ/мл суспензии диагностикума. Содержимое пробирок перемешивают путем встряхивания.

- Реакция протекает в условиях термостата при температуре 37 ± 1 °С в течение 2 ч, затем при комнатной температуре в течение 16-18 ч.

Таблица 9.1. Реакция агглютинации с сывороткой больного

Ингредиенты	Номер пробирки					Контроль	
						сыв оротки	а нтигена
0,85% раствор натрия хлорида, мл	,5	,5	,5	,5	,5	—	0,
Сыворотка больного (1:25), мл	,5					0,5	—
Полученные разведения	:50	:100	:200	:400	:800	5	1:2
Диагностикум, мл	,5	,5	,5	,5	,5	—	3
Результат							
Заключение. В сыворотке больного обнаружены антитела в титре ...							

Учет результатов. Учет результатов проводят начиная с контрольных пробирок: сыворотка должна быть абсолютно прозрачной, без хлопьев, в контроле антигена - равномерное помутнение (некоторые бактериальные культуры могут давать спонтанную агглютинацию, в этом случае реакция не может быть учтена). При положительном результате реакции на дне пробирки образуется осадок из склеившихся бактерий, жидкость в пробирке в большей или меньшей степени просветляется; при осторожном встряхивании пробирки осадок превращается в хлопья. При постановке РА в пробирке учет результатов проводят с помощью агглютиноскопа по 4-крестовой системе:

- 4+ - полное просветление жидкости с хорошо выраженными хлопьями;
- 3+ - почти полное просветление жидкости с хорошо выраженными хлопьями;
- 2+ - агглютинат неотчетливо выражен на фоне мутной жидкости;
- 1+ - незначительное количество агглютината на фоне мутной жидкости.

Отсутствие агглютината соответствует отрицательному результату.

РА считают положительной при оценке не менее чем на 3+ при отсутствии спонтанной агглютинации в контролях сыворотки и диагностикума.

Определяют титр реакции - наибольшее разведение сыворотки, при котором наблюдается положительная реакция.

Данный метод используют чаще для обнаружения антител в сыворотке обследуемого (например, при бруцеллезе - реакция Райта, при брюшном тифе - реакция Видаля).

Возможно применение развернутой реакции агглютинации для определения вида (или серовара) микроорганизма.

9.2.2. Агглютинация на предметном стекле

Методика постановки реакции (рис. 9.2). На дно чашки Петри или предметное стекло пастеровской пипеткой отдельно друг от друга наносят две капли: диагностическую сыворотку и 0,85% раствор натрия хлорида (контроль). В каплю сыворотки бактериологической петлей или стеклянной палочкой вносят исследуемую культуру бактерий и равномерно перемешивают до получения гомогенной взвеси. При положительной реакции через несколько минут в капле с сывороткой появляются хлопья; процесс ускорится, если стекло слегка покачивать. Контрольная капля остается равномерно мутной.

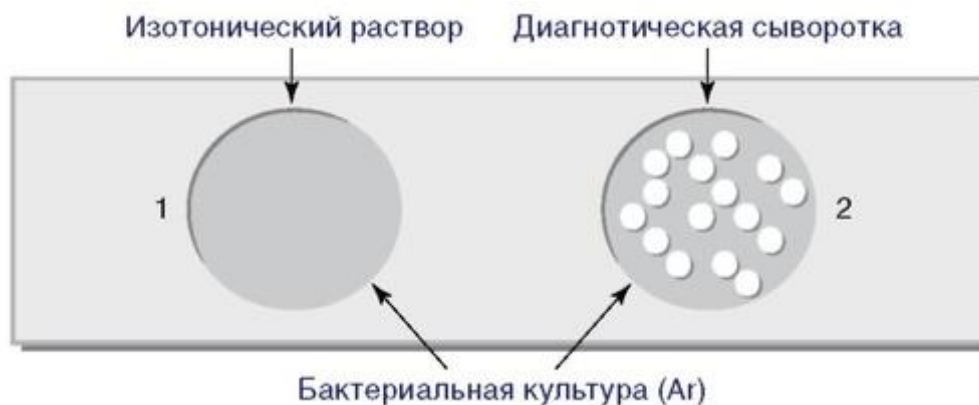


Рис. 9.2. Реакция агглютинации на стекле: 1 - контроль; 2 - агглютинат (хлопья) - положительная реакция

Учет результатов. Положительная реакция агглютинации характеризуется появлением агглютината (хлопьев) не менее чем на 3+ в течение 3 мин, особенно заметного на темном фоне при косом освещении. В контроле не должно быть спонтанной агглютинации микробной суспензии, допускается слабая (+) зернистость. Учет результатов проводят при косом освещении на темном фоне без или с помощью лупы 5-7-кратного увеличения по 4-крестовой системе.

Реакцию агглютинации на стекле чаще всего используют для определения вида (или серовара) микроорганизма, выделенного в чистой культуре. При применении агглютинирующихнеадсорбированных сывороток реакция является ориентировочной.

9.3. РЕАКЦИЯ КУМБСА

В некоторых случаях в организме человека образуются неполные антитела, которые могут связываться с антигенами (эритроцитов, бактерий), но при этом их не агглютинировать. Для выявления таких антител используют реакцию Кумбса (рис. 9.3), которая протекает в два этапа:

- на первом этапе неполные антитела связываются с корпускулярным антигеном (микробная взвесь, эритроциты);
- на втором этапе добавляют антитела против иммуноглобулинов человека (антиглобулиновую сыворотку), которые соединяются с неполными антителами образовавшегося иммунного комплекса и вызывают видимую агглютинацию (хлопья).

Реакцию Кумбса используют для выявления неполных антител к форменным элементам крови (при определении резус-фактора) и обнаружения неполных антибактериальных антител в сыворотках больных.

9.4. РЕАКЦИЯ ПАССИВНОЙ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ

Реакция пассивной гемагглютинации (РПГА) - разновидность реакции агглютинации. Для поиска антител в сыворотке больного используют *эритроцитарный диагностикум* (эритроциты человека, кур, барана или других видов животных с адсорбированными на их поверхности известными антигенами бактерий, вирусов, грибов и др.).

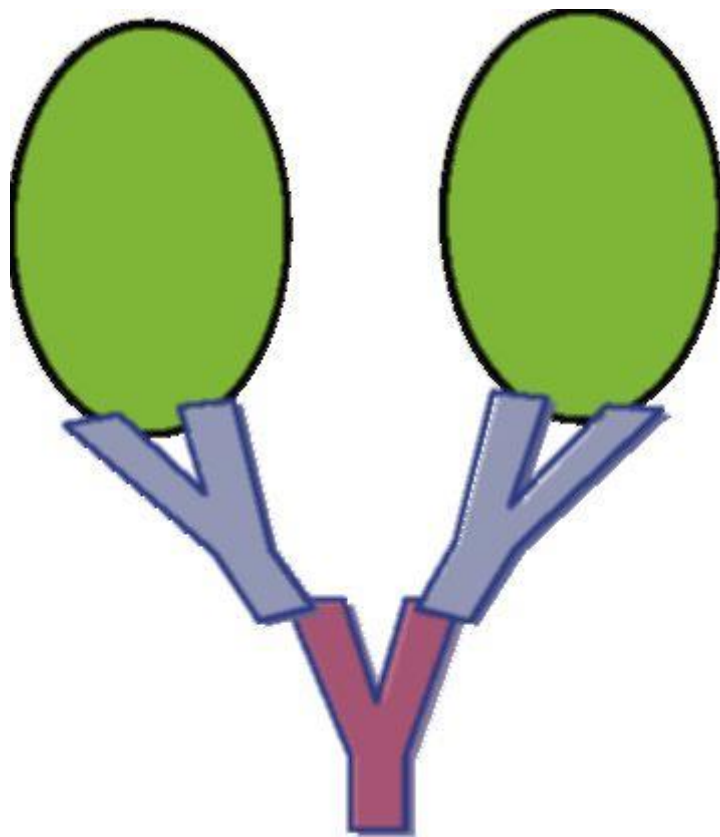


Рис. 9.3. Схема реакции Кумбса

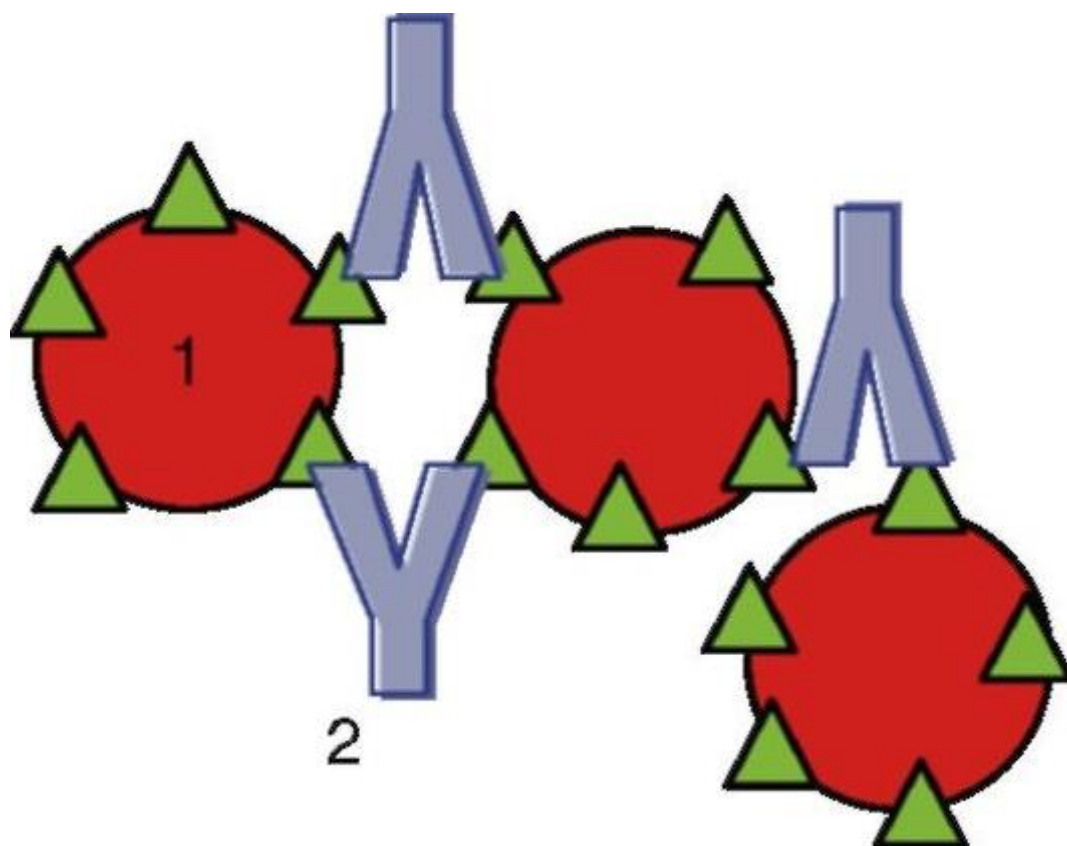


Рис. 9.4. Схема реакции пассивной гемагглютинации для поиска антител: 1 - эритроциты с адсорбированными на их поверхности известными антигенами; 2 - антитела из сыворотки больного

В U- или V-образных лунках полистиролового планшета смешивают сыворотку больного и эритроцитарный диагностикум. При наличии в сыворотке больного антител к антигенам на поверхности эритроцитов они связываются, эритроциты агглютинируются и выпадают в осадок тонким слоем с неровными краями в виде зонтика (рис. 9.4).

При отсутствии у больного антител к данным антигенам агглютинация отсутствует и эритроциты скапливаются в центре лунки, образуя компактную пуговку с резко очерченными краями (рис. 9.5).

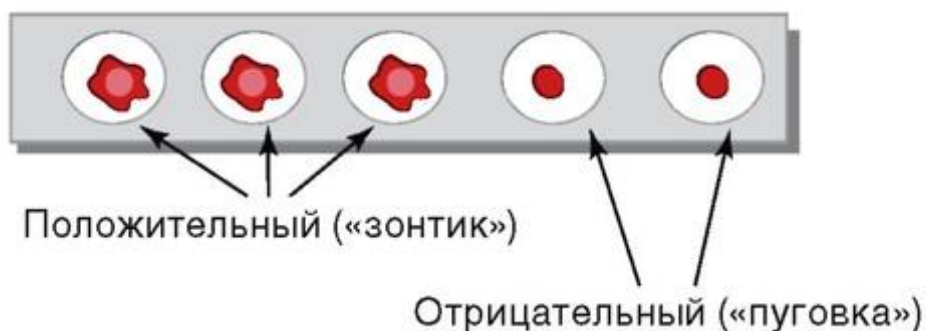


Рис. 9.5. Реакция пассивной гемагглютинации

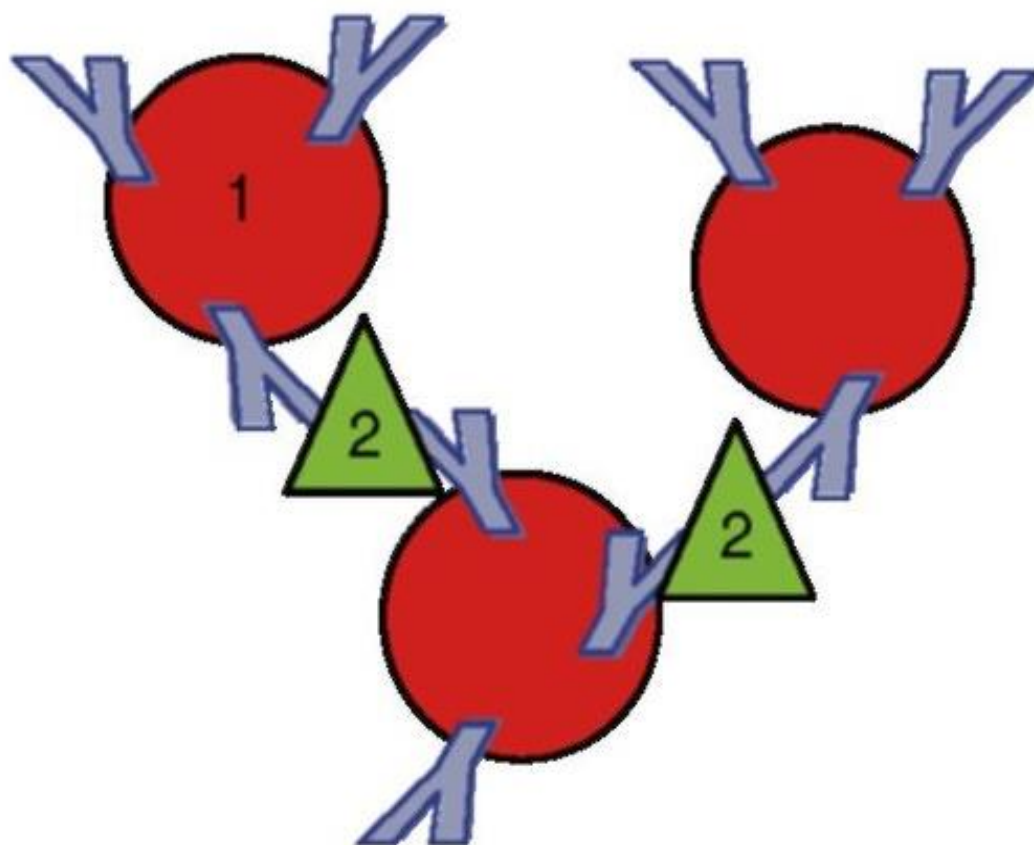


Рис. 9.6. Схема реакции пассивной гемагглютинации для поиска антигенов: 1 - эритроциты с адсорбированными на их поверхности известными антителами; 2 - искомые антигены

Для поиска антигенов используют эритроцитарную диагностическую сыворотку (эритроциты с адсорбированными известными антителами). В лунках полистиролового планшета смешивают материал от больного и эритроцитарную диагностическую сыворотку. При наличии у больного антигенов они связываются с антителами на поверхности эритроцитов, при этом наблюдают осадок в виде зонтика. При отсутствии антигенов эритроциты не агглютинируются - наблюдают осадок в виде пуговки (рис. 9.6).

Постановка РПГА (табл. 9.2)

- В лунках полистироловых планшетов готовят ряд последовательных двукратных разведений сыворотки больного. Для этого в первые пять лунок помещают по 0,5 мл физиологического буферного раствора.

- В первую пробирку добавляют 0,5 мл исследуемой сыворотки, разведенной 1:25, и перемешивают (получают разведение 1:50); далее 0,5 мл смеси переносят из первой пробирки во вторую лунку, из второй - в третью и т.д. (получают разведения 1:100, 1:200 и т.д.); 0,5 мл смеси из пятой лунки выливают.

- В следующем ряду лунок аналогичным образом готовят серийные разведения заведомо положительной сыворотки (положительный контроль). Контролем качества диагностикума служат 4 лунки контрольного ряда, в которые вносят только физиологический буферный раствор. В этих лунках не должно быть спонтанной агглютинации.

- Во все лунки добавляют по 0,1 мл эритроцитарного диагностикума.

Таблица 9.2. Реакция пассивной гемагглютинации

Ингредиенты	Номер пробирки				
<i>1-й ряд лунок - опыт</i>					
Физиологический буферный раствор, мл	,5	,5	,5	,5	,5
Сыворотка больного (1:25), мл	.5				
Полученные разведения сыворотки	:50	:100	:200	:400	:800
Эритроцитарный диагностикум, мл	,1	,1	,1	,1	,1
Результат					
<i>2-й ряд лунок - положительный контроль</i>					
Реакцию ставят аналогичным образом. Для разведений используют контрольную положительную сыворотку. Результат					
<i>3-й ряд лунок - контроль качества диагностикума</i>					
В 4 лунки вносят буферный раствор (по 0,5 мл) и эритроцитарный диагностикум (по 0,1 мл). Результат					
Заключение					

Учет реакции проводят через 2 ч инкубации при температуре 37 °С.

Положительная реакция характеризуется образованием осадка с неровными краями, покрывающим почти все дно лунки (в виде зонтика), отрицательная - компактным осадком с ровными краями (в виде пуговки). Учет результатов проводят по условной шкале четырех крестов:

- +++++ (4+) - эритроциты образуют на дне лунки зонтик, края его опадают;
- +++ (3+) - эритроциты образуют на дне лунки зонтик, края его ровные;
- ++ (2+) - эритроциты образуют на дне лунки тонкое кольцо;
- + (1+) - эритроциты образуют на дне лунки плотное кольцо или диск;
- (-) - эритроциты образуют на дне лунки точку (пуговку).

Положительным результатом считают гемагглютинацию не менее чем на 3(+++) креста.

9.5. РЕАКЦИЯ ПРЕЦИПИТАЦИИ

Реакция преципитации (РП) - иммунная реакция взаимодействия антител с антигенами в физиологическом растворе, причем антиген находится в растворимом состоянии. При преципитации происходит образование макромолекулярного иммунного комплекса, что проявляется переходом прозрачного коллоидного раствора в непрозрачную суспензию, или преципитат. Образование видимого преципитата наблюдается при смешивании обоих реагентов в эквимольных соотношениях. Избыток одного из них снижает количество нерастворимых макромолекулярных иммунных комплексов. Другая особенность РП заключается в том, что ее можно ставить как с полноценными антигенами - веществами белковой природы, так и с неполноценными антигенами - гаптенами. РП характеризуется чрезвычайно высокой чувствительностью и позволяет обнаружить ничтожно малые количества белка-антигена (до разведения 1:100 000 и выше), благодаря чему она широко применяется в судебной медицине, химии и др.

В микробиологической практике РП используют как для определения вида микроорганизма в различных объектах с помощью диагностических преципитирующих сывороток, так и для выяснения природы и количества антител в сыворотке больного.

Компоненты реакции. Для получения растворимого антигена (преципитиногена) применяют различные методы дезинтеграции бактериальных клеток. Наиболее простой метод - растирание бактериальных клеток в ступке. К нарушению целостности бактериальных клеток приводят неоднократно повторенные замораживание и оттаивание клеток, воздействие на них звуковых колебаний, электрического тока, ультразвука. Для извлечения полисахаридных фракций некоторых видов микроорганизмов взвесь бактерий подвергают длительному кипячению (1-2 ч).

Помимо перечисленных физических методов дезинтеграции клеток, используют также химические и биологические методы: разрушение бактериальных клеток ферментами (трипсином, лизоцимом), обработку эфиром, хлороформом, ацетоном и др.

Диагностические преципитирующие сыворотки получают путем парентеральной гипериммунизации животных соответствующим антигеном.

Титр преципитирующей сыворотки определяют максимальным разведением антигена, который преципитируется данной сывороткой. Так, сыворотка с титром преципитинов 1:10 000 дает положительную реакцию с антигеном, взятым в разведении 1:10 000.

Существуют различные способы постановки реакции преципитации.

Реакция кольцепреципитации

При постановке реакции кольцепреципитации в пробирку с малым диаметром наливают 0,2 мл преципитирующей сыворотки, затем с помощью пастеровской пипетки осторожно наслаивают на сыворотку 0,2 мл растворенного антигена. Пробирку при этом следует держать в наклонном положении, а наслаивание антигена проводить осторожным спусканием жидкости по стенке пробирки так, чтобы он не смешивался с сывороткой, а образовывал над ней верхний слой. После добавления антигена пробирку осторожно переводят в вертикальное положение и ставят в штатив. При положительном результате на границе двух растворов сразу или через 5-10 мин образуется мутное кольцо непрозрачного преципитата (рис. 9.7). Эквимольность антигена и антител достигается за счет теплового движения молекул.

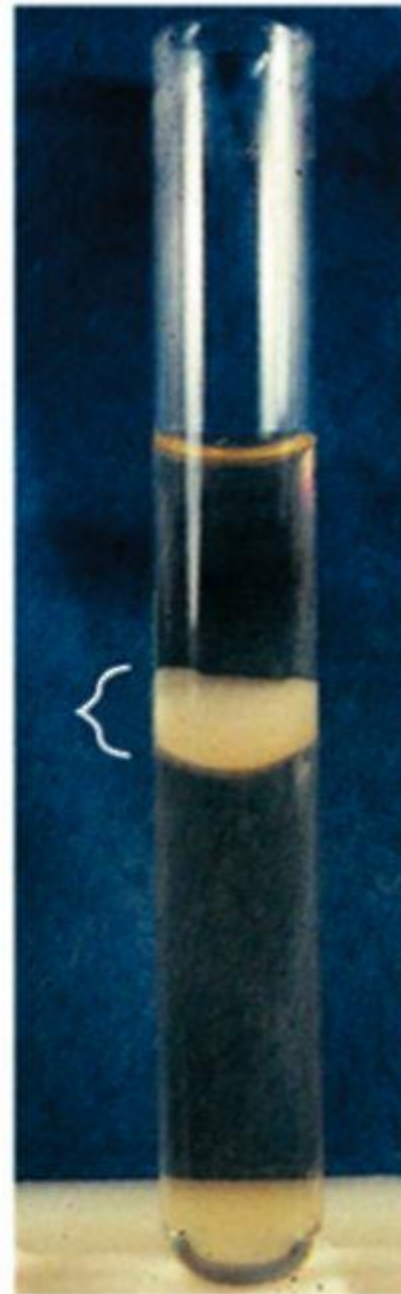
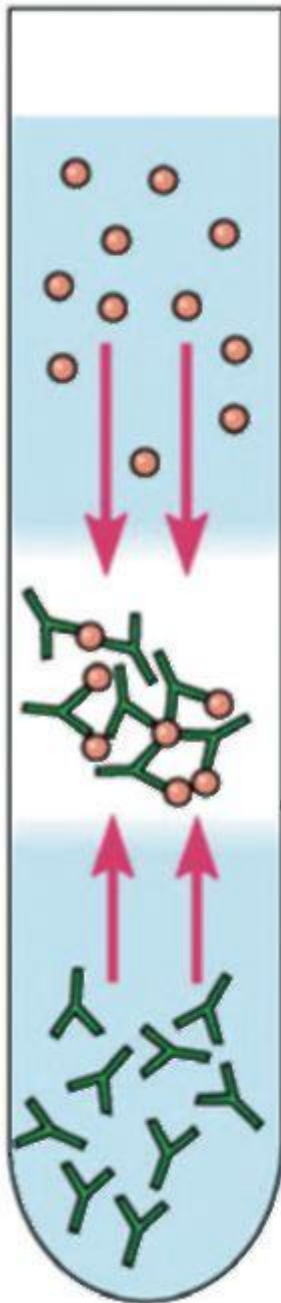


Рис. 9.7. Реакция кольце-преципитации

Реакция микропреципитации

Эту реакцию в настоящее время широко используют для диагностики сифилиса. Нативную плазму или инактивированную сыворотку пипеткой или пипеточным дозатором переносят в лунки планшета для иммунологических реакций по 3 капли (60 мкл). Добавляют эмульсию антигена по 1 капле (20 мкл) и перемешивают, осторожно покачивая планшет в руках, в течение 5 мин. Далее в каждую лунку добавляют по 3 капли (60 мкл) 0,9% раствора натрия хлорида и оставляют при температуре 25 ± 3 °C на 5 мин. Результаты реакции учитывают визуально при освещении не ниже 300 люкс на темном фоне. При положительной реакции (наличии в исследуемой сыворотке антител к антигену) наблюдают выпадение хлопьев разной величины, а при отрицательной реакции - опалесценцию. Реакцию сопровождают контролем с инактивированной контрольной отрицательной сывороткой. Результаты реакции учитывают, если в контроле отсутствует спонтанная преципитация.

Реакция флоккуляции по Рамону

Это разновидность реакции преципитации, которую используют для определения количества анатоксина в единицах начальной флоккуляции (максимальной концентрации исследуемого вещества, дающей положительный результат). Реакцию ставят в пробирках. В пробирке, где анатоксин и анитоксическая сыворотка находятся в эквивалентном соотношении, наблюдают помутнение. Таким образом, зная концентрацию анитоксической сыворотки, можно рассчитать концентрацию анатоксина.

Титрование анатоксинов в реакции флоккуляции (по методу Рамона) (табл. 9.3). Эта реакция позволяет произвести количественное определение анатоксина. Для постановки реакции берут 5 пробирок и помещают в них по 2 мл исследуемого анатоксина. Затем в пробирки вносят различное количество стандартной флоккулирующей анитоксической сыворотки, в которой известно количество международных анитоксических единиц (МЕ) в 1 мл. Флоккуляция происходит при строгом количественном соответствии антигена и антитела. Зная количество антител в стандартной анитоксической сыворотке, можно рассчитать количество антигена (анатоксина). Для этого определяют начальную (инициальную) флоккуляцию - минимальную концентрацию антител (максимальную концентрацию анатоксина), дающую положительный результат (помутнение). Установив инициальную флоккуляцию, рассчитывают количество Lf в 1 мл препарата (по простой формуле: количество антигена равно количеству антител).

Пример расчета. Инициальная флоккуляция произошла во второй пробирке, содержащей 0,18 мл сыворотки (1 мл - 400 МЕ, следовательно, 0,18 мл - 72 МЕ). Таким образом, 2 мл анатоксина содержат 72 Lf, а 1 мл - 36 Lf (титр анатоксина).

Таблица 9.3. Титрование анатоксина в реакции флоккуляции (по методу Рамона)

Ингредиенты, мл	Номер пробирки				
	1	2	3	4	5
Дифтерийный анатоксин	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Противодифтерийная анитоксическая сыворотка (400 МЕ/мл)	0,16	0,18	0,20	0,22	0,24
Водяная баня, 40 °С					
Результаты (инициальная флоккуляция)					
Расчет:					
Выводы					
Реакция флоккуляции: положительная/отрицательная.					
Титр дифтерийного токсина: ... Lf/мл					

Реакции преципитации в геле

Если поместить на одну сторону геля антиген, а на другую - антитела, они начнут диффундировать друг к другу. На месте их встречи образуются беловатые полосы преципитата, которые называют «усами» преципитации. В результате разных размеров молекул антигенов и антител, а следовательно, неодинаковой скорости их диффузии молекулы антигена и антитела за определенный промежуток времени проходят в агаре неодинаковые расстояния. Если в агаре происходит движение не одной, а нескольких

систем «антиген-антитело», они ведут себя независимо друг от друга и образуют соответствующее количество линий преципитации.

Таким образом, с помощью преципитации в геле возможно разделение отдельных систем «антиген-антитело» в тех случаях, когда они находятся в смеси.

Различают два метода диффузионной преципитации в агаре:

- *метод простой диффузии*, когда одно реагирующее вещество диффундирует в агар, содержащий постоянную концентрацию другого реагирующего вещества;
- *метод двойной диффузии* (Оухтерлони), когда оба реагента движутся навстречу друг другу в нейтральном слое агара.

Реакцию преципитации в геле ставят в чашках Петри и на предметных стеклах (микропреципитация в агаре). В качестве геля используют агар-агар, желатину и др.

Реакция двойной иммунодиффузии по Оухтерлони. Эту реакцию проводят в агаровом геле. В слое геля равномерной толщины на определенном расстоянии друг от друга вырезают лунки и заполняют их антигеном и сывороткой, содержащей антитела к этому антигену. После этого антигены и антитела начинают диффундировать друг к другу. На месте их встречи образуются беловатые полосы преципитата, которые называют «усы» преципитации (рис. 9.8).

Данную реакцию можно использовать для поиска дифтерийного токсина. Для этого на питательный агар засевают возбудителя дифтерии и на небольшом расстоянии помещают фильтровальную бумагу, пропитанную антителами против дифтерийного токсина. Токсин и антитела диффундируют друг к другу и образуют «усы». Если бактерия не синтезирует токсин, «усы» отсутствуют.

Реакция радиальной иммунодиффузии по Манчини. В расплавленный агаровый гель добавляют антитела и наносят гель равномерным слоем на стекло. В геле вырезают лунки и вносят в них стандартный объем различных по концентрации растворов антигена. Во время инкубации антигены радиально диффундируют из лунки и, встретившись с антителами, образуют кольцо преципитации. Диаметр кольца преципитации соответствует концентрации искомого вещества (рис. 9.9). Этот метод используют для определения антигенов или антител в исследуемом растворе (например, для определения концентрации иммуноглобулинов различных классов в сыворотке крови).

Иммуноэлектрофорез. Принцип метода заключается в предварительном электрофоретическом разделении смеси антигенов, затем в канавку, идущую вдоль направления движения белковых антигенов, вносят сыворотку. Антигены и антитела диффундируют в гель навстречу друг другу; взаимодействуя, они образуют дугообразные линии преципитации.

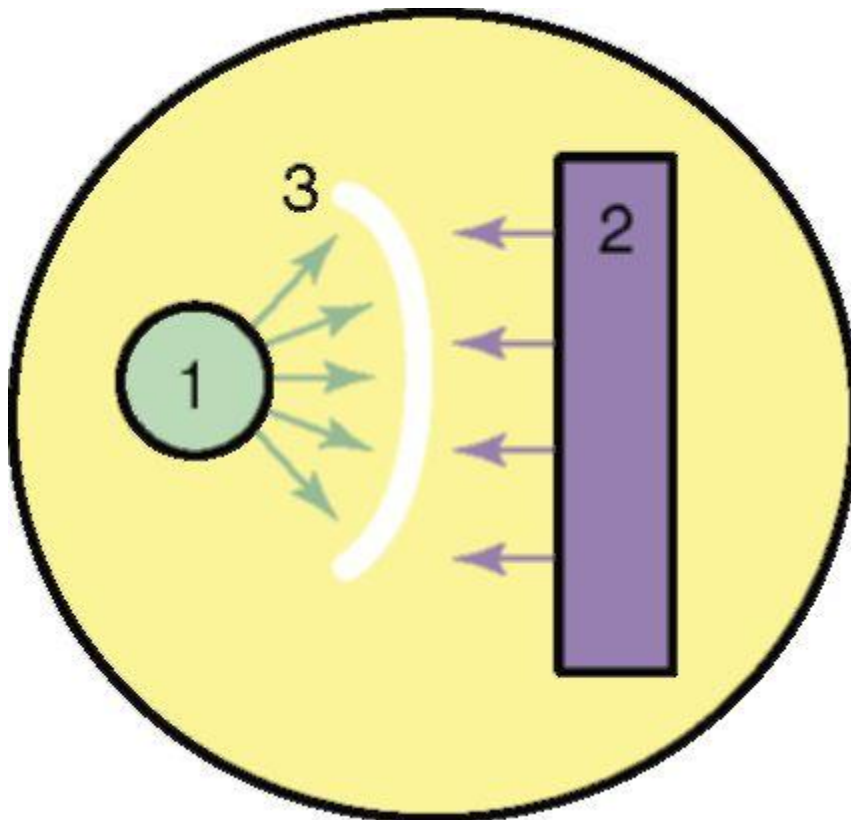


Рис. 9.8. Реакция двойной иммунодиффузии по Оухтерлони (определение дифтерийного экзотоксина): 1 - колония токсигенной корине-бактерии; 2 - противодифтерийная антитоксическая сыворотка; 3 - преципитат («усы» преципитации)

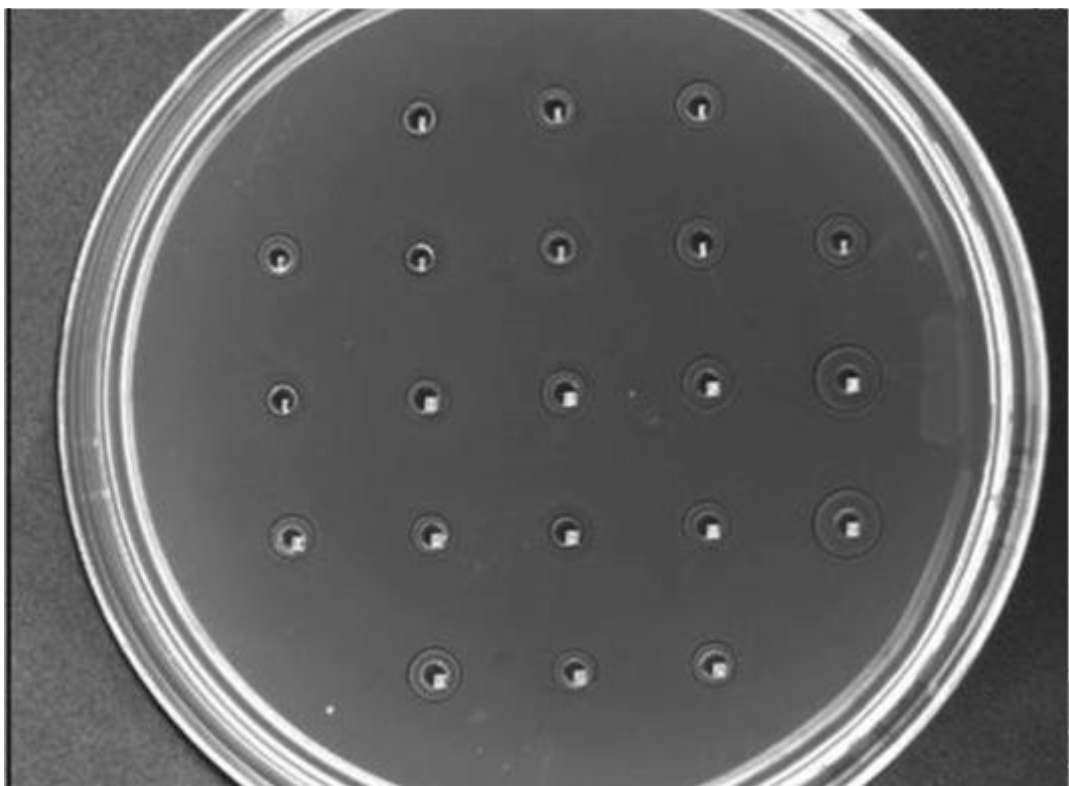


Рис. 9.9. Реакция радиальной иммунодиффузии по Манчини

9.6. РЕАКЦИЯ ЛИЗИСА

Реакция лизиса происходит при участии трех компонентов: клетки (антигена), специфических антител и комплемента. Иммунная сыворотка совместно с комплементом

обладает специфической способностью лизировать микроорганизмы или другие клетки. В зависимости от антигена реакцию лизиса называют бактериолизом, спирохетолизом, гемолизом и др.

При постановке реакций лизиса используют инактивированные иммунные сыворотки. Инактивацию сыворотки проводят нагреванием при температуре 56 °С в течение 30 мин (для разрушения сывороточного комплемента). Комплемент (свежая сыворотка нормальной морской свинки) вводят в реакцию в строго определенном количестве (в рабочей дозе).

Реакция гемолиза. При взаимодействии эритроцитов, антител к ним и комплемента наблюдается гемолиз (разрушение эритроцитов). Реакцию гемолиза используют в качестве индикатора связывания комплемента при постановке реакции связывания комплемента (РСК). Для этого используют:

- эритроциты барана;
- антитела против эритроцитов барана - гемолитическую сыворотку, полученную иммунизацией кролика эритроцитами барана;
- комплемент - свежую сыворотку морской свинки.

При *положительной реакции* эритроциты разрушаются, наблюдают гемолиз («лаковую кровь» - прозрачную красную жидкость, сквозь которую можно прочесть текст). При *отрицательной реакции* наблюдают взвесь эритроцитов (мутную красную жидкость, сквозь которую нельзя прочесть текст) или осадок из эритроцитов в виде пуговки.

9.7. РЕАКЦИЯ СВЯЗЫВАНИЯ КОМПЛЕМЕНТА

В реакции связывания комплемента (РСК) в качестве индикатора связывания антигена и антитела используют реакцию гемолиза. РСК проходит в три этапа.

- Первый. В пробирку помещают антигены и антитела. В случае их комплементарности (положительная реакция) образуется иммунный комплекс «антиген-антитело».
- Второй. Добавляют комплемент. Весь комплемент связывается с иммунным комплексом «антиген-антитело» (важно взять минимальное количество комплемента, для этого его предварительно титруют и находят рабочую дозу).
- Третий. Добавляют гемолитическую систему (эритроциты барана и антитела к ним).

В связи с тем что весь комплемент уже связался с иммунным комплексом, гемолиз отсутствует (нет комплемента для разрушения эритроцитов барана). В случае если антиген и антитело некомплементарны (отрицательная реакция), комплемент остается свободным и разрушает эритроциты барана - наблюдается гемолиз (рис. 9.10).

С помощью данной реакции можно искать антитела в сыворотке больного, для этого используют диагностикум (известные антигены). Можно искать неизвестные антигены, для этого используют диагностическую сыворотку (известные антитела).

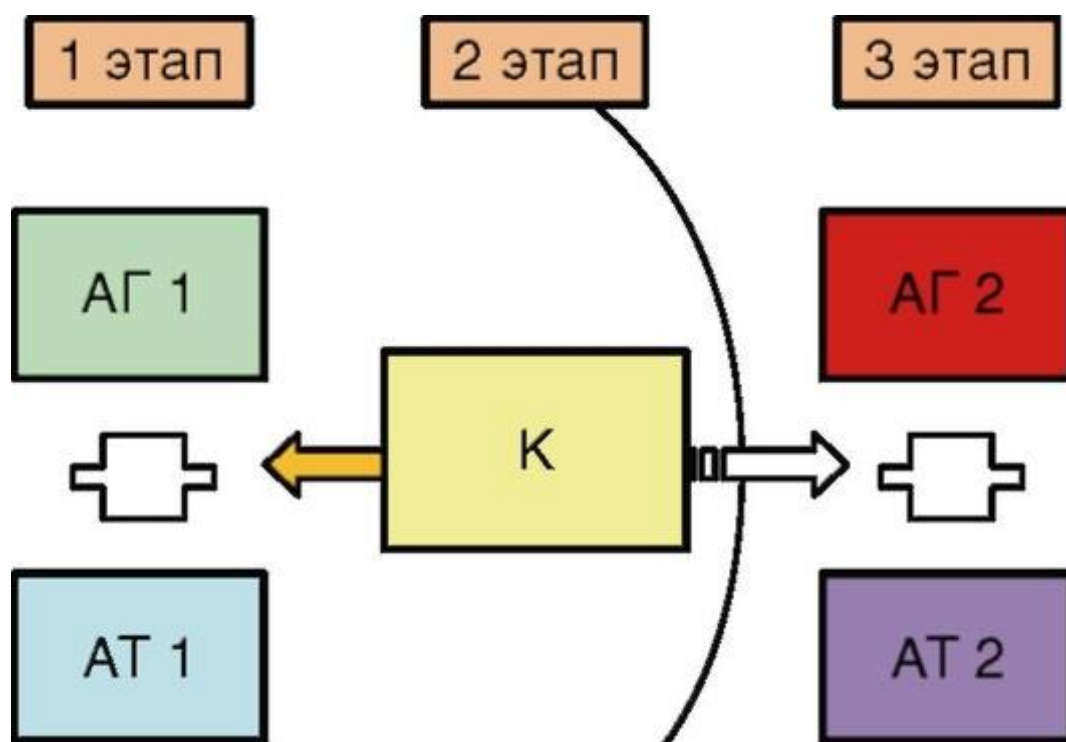


Рис. 9.10. Схема реакции связывания комплемента: АГ 1 - диагностикум; АТ 1 - искомые антитела; К - комплемент; АГ 2 - эритроциты барана; АТ 2 - антитела против эритроцитов барана (гемолитическая сыворотка); 1-й этап - антиген связывается с антителом; 2-й этап - комплемент связывается с иммунным комплексом АГ+АТ; 3-й этап - добавляют эритроциты барана и антитела против них; гемолиз отсутствует, так как комплемент связался

Для РСК определяют минимальное количество комплемента, вызывающее полный гемолиз (титр комплемента). Рабочая доза комплемента превышает его титр на 20-25% (следующая пробирка с гемолизом). Увеличение дозы комплемента необходимо для подавления антикомплементарного действия других компонентов реакции.

Если для РСК взять концентрацию комплемента больше рабочей дозы, после связывания комплемента с иммунным комплексом часть комплемента останется не связанной и вызовет гемолиз (ложноотрицательную реакцию). Если взять концентрацию комплемента ниже рабочей дозы, гемолиза не будет даже в случае отрицательной реакции (ложноположительная реакция) (табл. 9.4-9.6).

Таблица 9.4. Титрование комплемента

Ингредиенты, мл	Номер пробирки								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Комплемент (в разведении 1:10)	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5	0,5	—
Изотонический раствор натрия хлорида	1,3	1,25	1,2	1,15	1,1	1,05	1,0	1,5	1,5
Гемолитическая система	1	1	1	1	1	1	1	—	1
Эритроциты, 3% взвесь								0,5	

Термостат при температуре 37 °С в течение 30 мин									
Результат									
Заключение	Титр комплемента: ...								
	Рабочая доза комплемента:								

Таблица 9.5. Реакции иммунного гемолиза

Ингредиенты, мл	Номер пробирки					
	1	2	3	4	5	6
Гемолитическая сыворотка (антитела к неизвестным эритроцитам)	0,5	0,5	—	0,5	—	—

Окончание табл. 9.5

Суспензия эритроцитов барана	0,5	—	0,5	0,5	0,5	—
Суспензия эритроцитов собаки	—	0,5	—	—	—	0,5
Комплемент (в разведении 1:10)	0,5	—	0,5	0,5	—	—
Изотонический раствор NaCl	—	0,5	0,5	—	1,0	1,0
Результат						
Заклучение. Гемолитическая сыворотка содержит антитела к эритроцитам ... (собаки/барана)						

Таблица 9.6. Реакция связывания комплемента

Ингредиенты, мл	Номер пробирки	
	1	2
Сыворотка больного	0,5	—
Сыворотка здорового	—	0,5
Диагностикум (антиген)	0,5	0,5
Комплемент	0,5	0,5
Термостат при температуре 37 °С в течение 1 ч		
Гемолитическая система	1	1
Термостат при температуре 37 °С в течение 1 ч		
Результат		
Заклучение		

9.8. РЕАКЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕЧЕНЫХ АНТИТЕЛ ИЛИ АНТИГЕНОВ

Для этих реакций используют специальные антитела, конъюгированные («сшитые») с меткой (конъюгат).

Используемые метки. В качестве меток антител можно использовать различные частицы.

- Флюоресцентные, фосфоресцентные и биолюминесцентные метки, ковалентно связанные с частицами латекса. Наиболее распространены флюоресцентные метки. Эти метки используют только в приборных вариантах, когда результат регистрируют с использованием люминесцентного микроскопа или специального ридера.

- Ферментные метки. Ферментативную реакцию регистрируют с помощью добавления субстрата и хромогена. Субстрат расщепляется ферментом, что приводит к изменению цвета. Результат анализа регистрируют визуально или считывают с помощью ридера (фотометра, фотоколориметра).

- Красящие вещества (наночастицы коллоидного золота или углерода, частицы окрашенного латекса). В этом случае используют визуальную детекцию результата или приборное колориметрическое определение (сканирование). Использование разноцветных красящих меток, присоединенных к частицам латекса, позволяет проводить мультианализ, в котором разные цвета соответствуют различным анализам. Наиболее часто используемая метка - наночастицы коллоидного золота.

- Парамагнитные метки (также закрепленные на частицах латекса). Данный вид меток используют с применением приборов, регистрирующих силу магнитного поля.

- Радиоактивные метки регистрируют в соответствующем счетчике (β - или γ -излучения).

- Липосомы с различного рода метками (красящими, флюоресцентными, ферментативными, электроактивными и др.).

9.8.1. Реакция иммунофлюоресценции

Иммунофлюоресцентный метод (метод Кунса). Реакцию иммунофлюоресценции (РИФ) используют в качестве метода экспресс-диагностики. Сущность метода заключается в том, что антиген связывается с антителами, мечеными флюоресцирующими красителями, и светится в ультрафиолетовых лучах люминесцентного микроскопа.

РИФ - универсальный диагностический метод, его можно использовать для выявления и идентификации антигенов различных клеток, тканей и органов, он находит применение в судебной медицине, патологической анатомии и других областях медицины. В микробиологической практике его используют для обнаружения бактериальных, грибковых и вирусных антигенов, находящихся как в виде корпускул, так и в виде раствора, а также для обнаружения антител.

Варианты метода

- Прямой метод РИФ. На предметное стекло помещают исследуемый материал, содержащий антиген, и обрабатывают антителами, мечеными флюорохромами - веществами, светящимися при облучении ультрафиолетом. Результаты оценивают с помощью люминесцентного микроскопа. При положительной реакции меченые антитела связываются с антигенами (бактерий, вирусов, простейших и др.) и не смываются при промывании водой. В результате при просмотре такого препарата в люминесцентном микроскопе видны светящиеся объекты (рис. 9.11). В случае если меченые антитела не комплементарны исследуемым антигенам, они не фиксируются и смываются водой, и под микроскопом виден темный препарат (рис. 9.12).

- Непрямой метод РИФ проводят в два этапа. На первом этапе антигены, нанесенные на предметное стекло, связываются с комплементарными немечеными антителами. На втором этапе добавляют антииммуноглобулиновую сыворотку, меченную флюорохромами, которая связывается с антителами иммунного комплекса. Таким образом, флюорохром фиксируется к антигену и светится в ультрафиолетовых лучах люминесцентного микроскопа. Непрямой вариант РИФ можно использовать как для обнаружения антигенов, так и антител. В последнем случае на предметном стекле фиксируют известный антиген, а в качестве немеченых антител используют сыворотку больного (рис. 9.13).

Постановка опыта (прямой метод). Из исследуемого материала на тщательно обезжиренных предметных стеклах готовят мазки обычным способом. Мазки-отпечатки из органов животных делают, прикладывая предметное стекло к поверхности свежего среза исследуемого органа. Мазки из крови готовят, нанося каплю крови на край предметного стекла и распределяя ее равномерно по поверхности шлифованным стеклом.

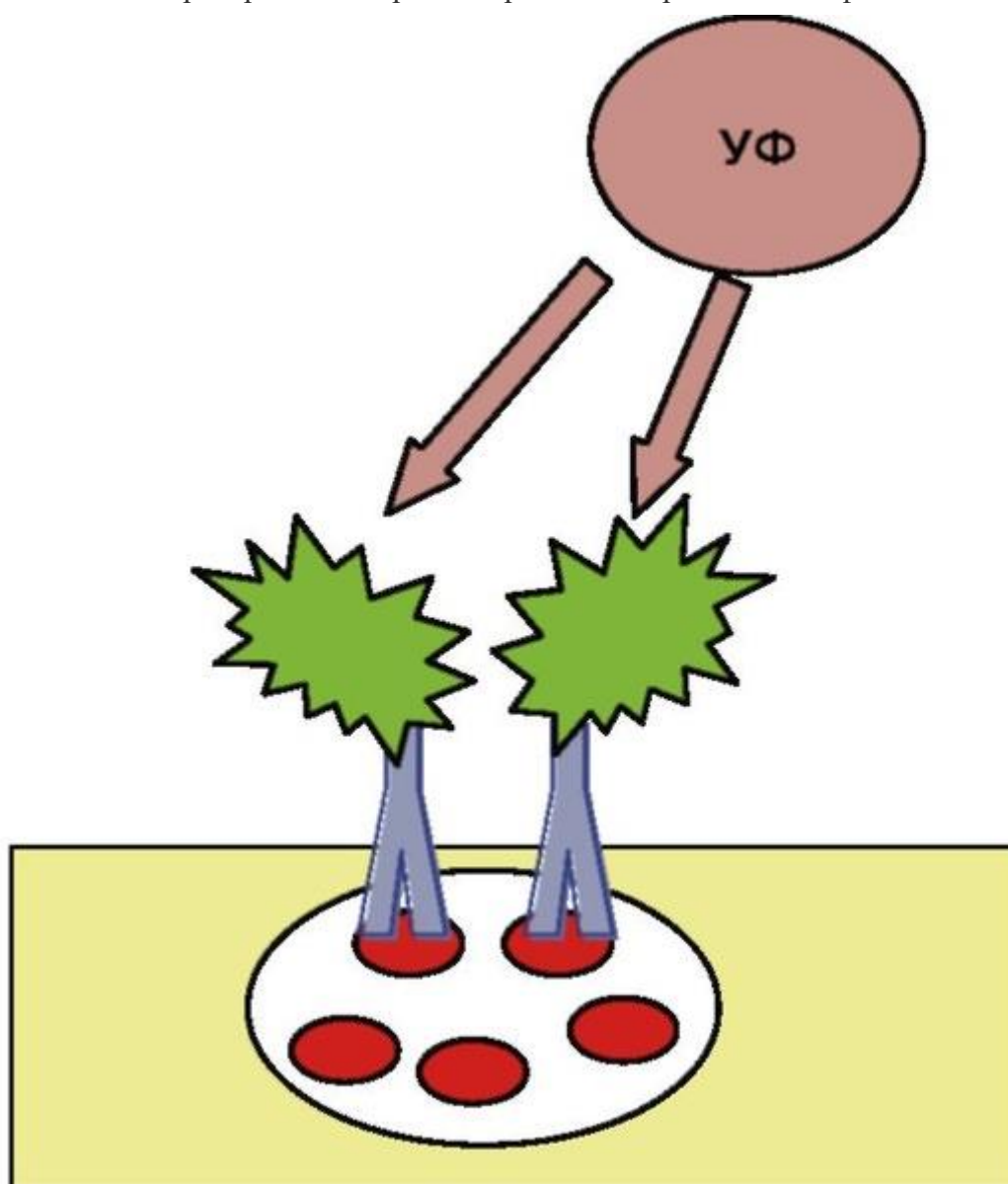


Рис. 9.11. Реакция иммунофлюоресценции, прямой вариант

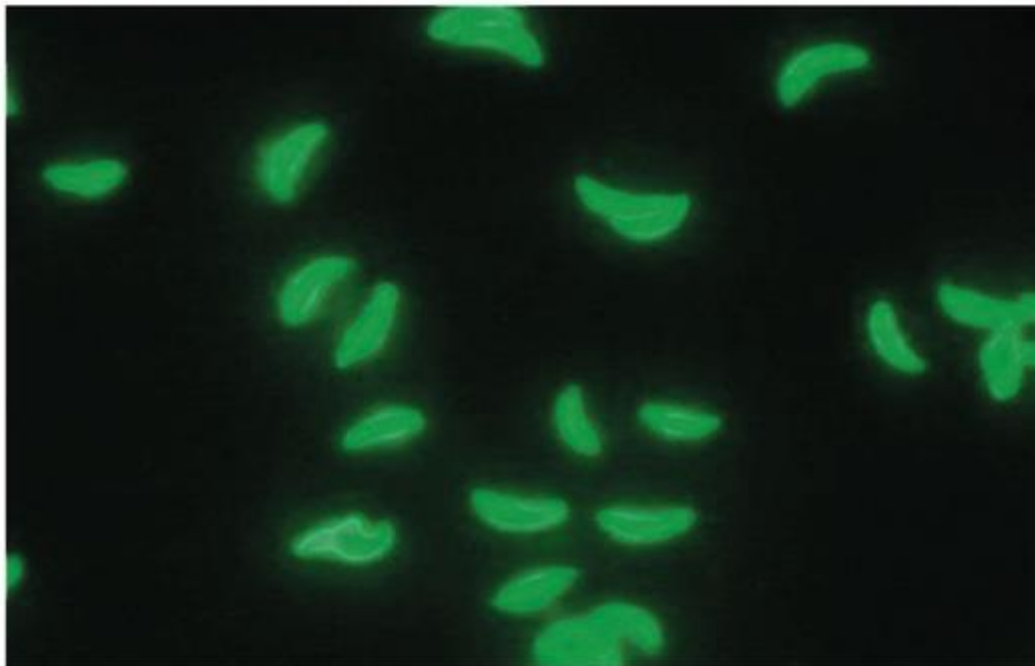


Рис. 9.12. Реакция иммунофлюоресценции, *Toxoplasma gondii*

Мазки подсушивают на воздухе, а затем погружают в фиксирующую жидкость. Фиксатор (этанол, метанол, ацетон и др.) и время фиксации должны быть специально определены для исследуемого вида микроорганизмов (фиксированные препараты до их окрашивания люминесцирующими сыворотками можно хранить при температуре 0-4 °С в течение 2 мес). Далее препарат обрабатывают соответствующей люминесцирующей сывороткой, ее остатки смывают и рассматривают препарат в люминесцентном микроскопе. В случае положительной реакции на темном фоне препарата видны несколько увеличенные клетки характерной для данного вида микроорганизмов морфологии, светящиеся по периферии. Цвет свечения зависит от цвета люминесценции красителя, примененного для метки сыворотки.

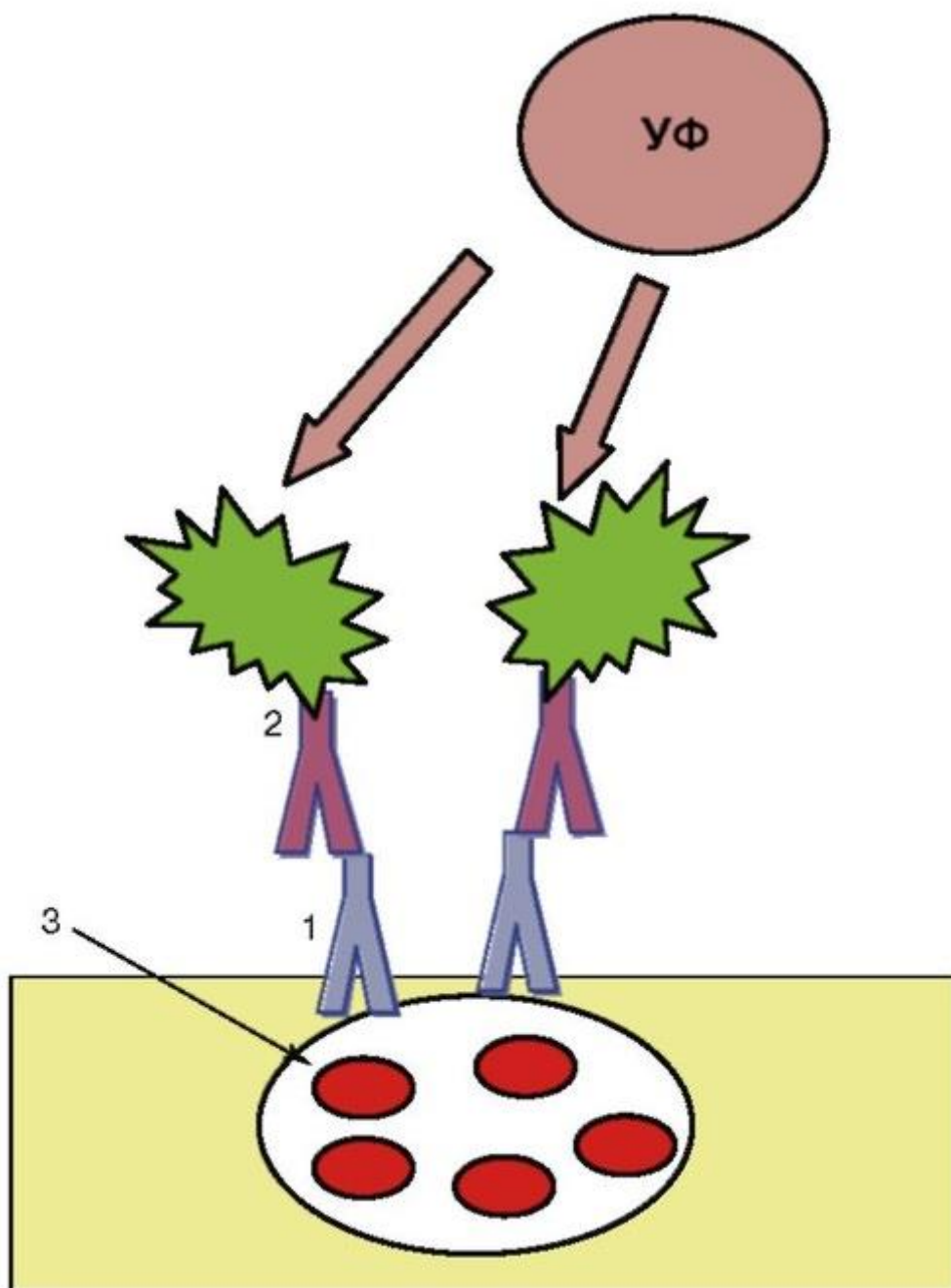


Рис. 9.13. Реакция иммунофлюоресценции, непрямой вариант: 1 - специфические антитела; 2 - конъюгат; 3 - антиген

9.8.2. Иммуноферментный анализ

Иммуноферментный анализ (ИФА) - выявление антигенов или антител с помощью антител, меченных ферментом. Реакцию оценивают путем индикации фермента, добавляя субстрат и хромоген. При положительной реакции хромоген меняет свой цвет. Существует множество модификаций ИФА, однако наиболее широко используют его *твердофазный неконкурентный вариант*.

При определении антител (рис. 9.14) используют иммунологический планшет с адсорбированными на его лунках известными антигенами. На первом этапе в лунки добавляют сыворотку больного. Если в сыворотке больного присутствуют антитела к данному антигену, они связываются и прилипают ко дну лунки. Не связавшиеся антитела удаляют путем промывания. Затем добавляют антитела против иммуноглобулинов человека, меченные ферментом (конъюгат). Конъюгат связывается с антителами человека,

фиксированными к антигенам лунок. Не связавшиеся антитела удаляют путем промывания. Таким образом, в случае положительной реакции (наличие антител в сыворотке больного) в лунке находится фермент, который можно обнаружить, добавив субстрат/хромоген. При положительной реакции субстрат разрушается, хромоген меняет свой цвет. Реакцию останавливают добавлением стоп-реагента (H_2SO_4 или HCl).

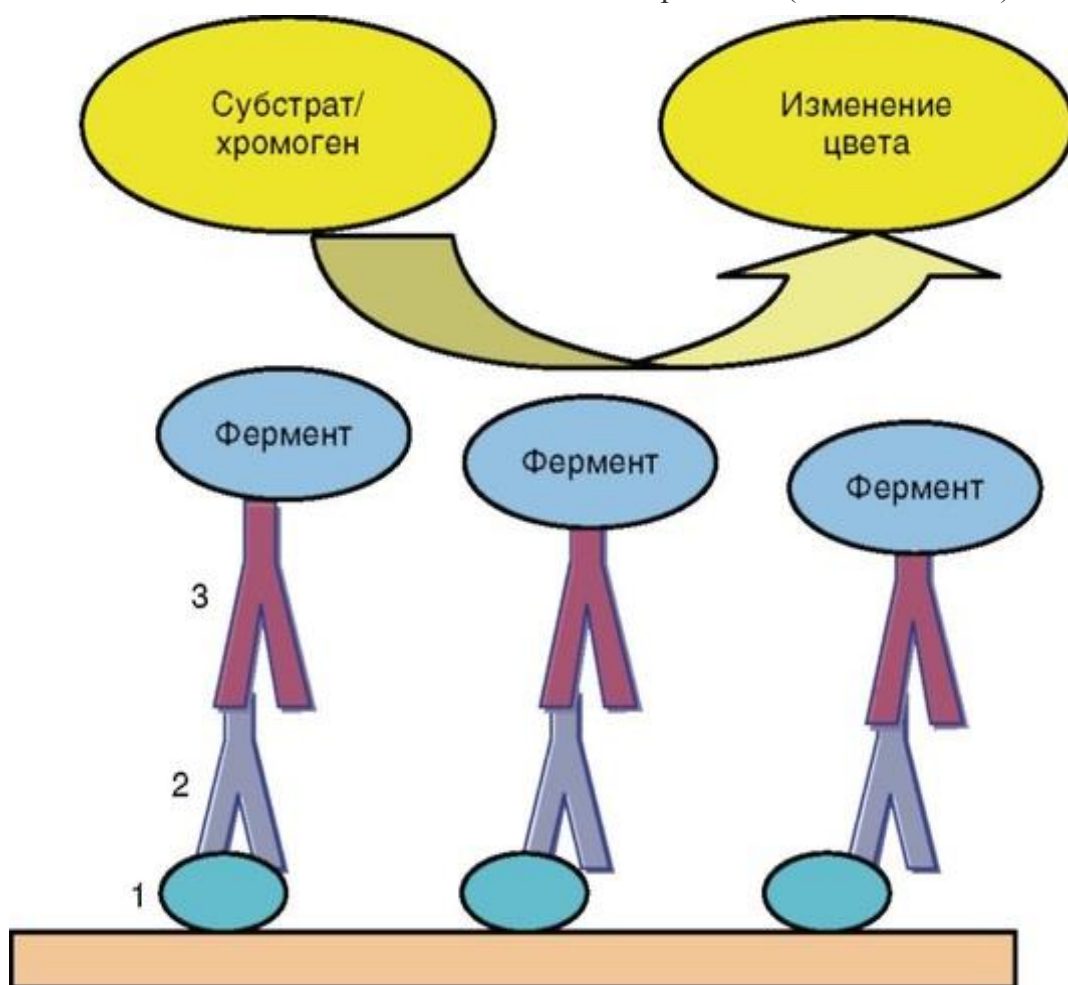


Рис. 9.14. Иммуноферментный анализ, выявление антител: 1 - известные антигены на поверхности планшета; 2 - искомые антитела; 3 - антитела, меченные ферментом

По интенсивности окраски можно судить о количестве антител у больного (чем больше антител, тем больше фермента присоединится, тем интенсивней будет окраска) (рис. 9.15). Результат анализа регистрируют визуально или считывают с помощью спектрофотометра.

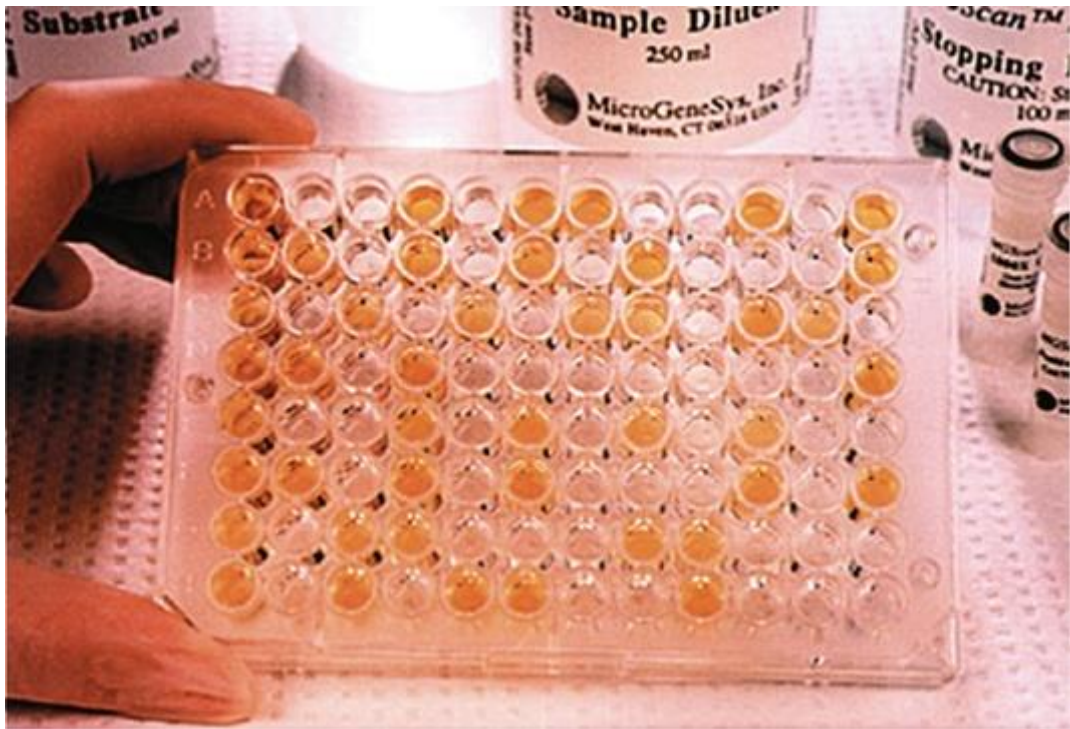


Рис. 9.15. Иммуноферментный анализ

Первый способ определения антигенов (сэндвич-метод)

На дно лунок адсорбируют известные антитела (рис. 9.16). На первом этапе в лунки добавляют материал больного, содержащий антиген. Антиген связывается с антителами. Не связавшиеся антигены удаляют путем промывания. Затем добавляют антитела против антигена, меченные ферментом. Не связавшиеся антитела удаляют путем промывания. Таким образом, в случае положительной реакции (наличие антигена) в лунке находится фермент, наличие которого регистрируют аналогичным образом (см. выше).

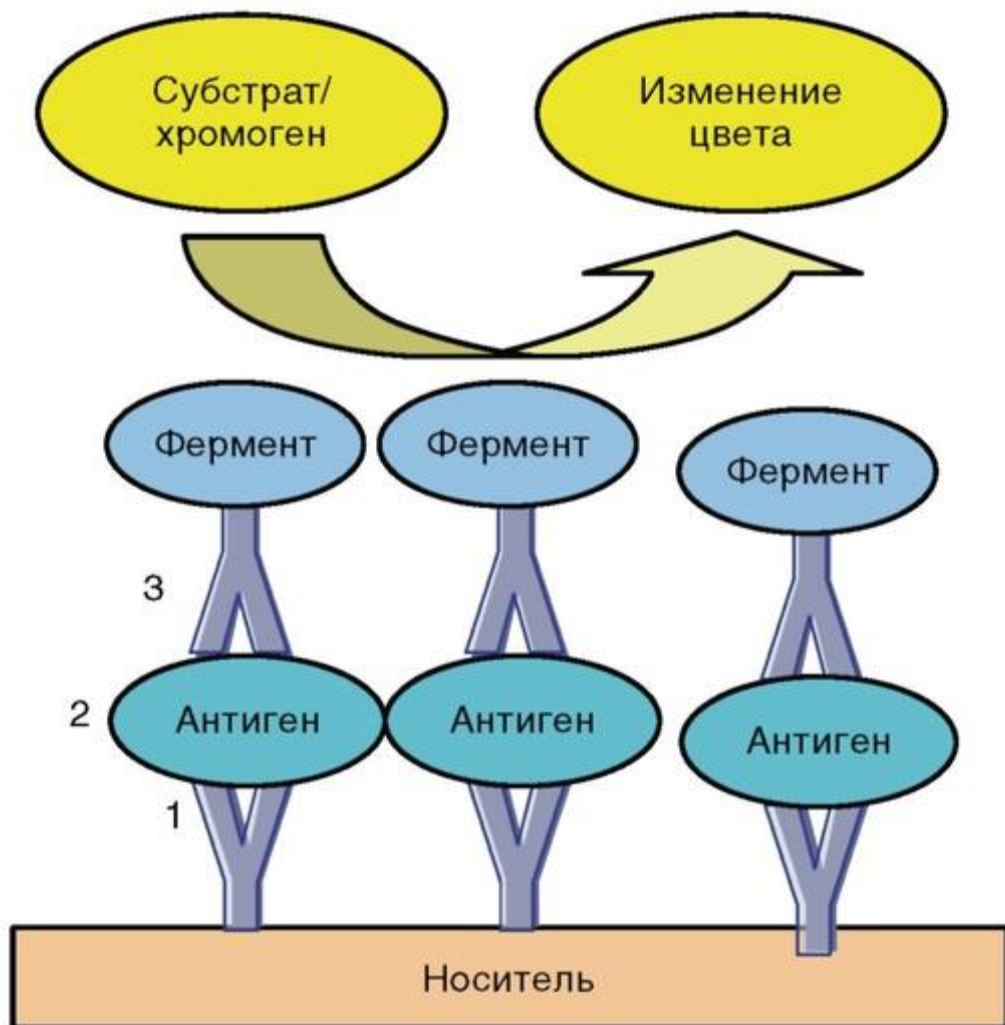


Рис. 9.16. Иммуноферментный анализ, выявление антигенов, сэндвич-метод: 1 - известные антитела на поверхности планшета; 2 - искомый антиген; 3 - антитела, меченные ферментом

Второй способ определения антигенов

На дно лунок адсорбируют известные антитела, затем добавляют исследуемый материал, содержащий антиген, который связывается с антителами (рис. 9.17). Не связавшиеся антигены удаляют путем промывания. Далее добавляют немеченные антитела против антигена. Не связавшиеся антитела удаляют путем промывания. Затем добавляют антитела против иммуноглобулинов человека, меченные ферментом. Не связавшиеся антитела удаляют путем промывания. Таким образом, в случае положительной реакции (наличие антигена) в лунке находится фермент, который регистрируют аналогичным образом (см. выше).

Пример. Система основана на твердофазном иммуноферментном анализе, в качестве ферментной метки используют пероксидазу хрена.

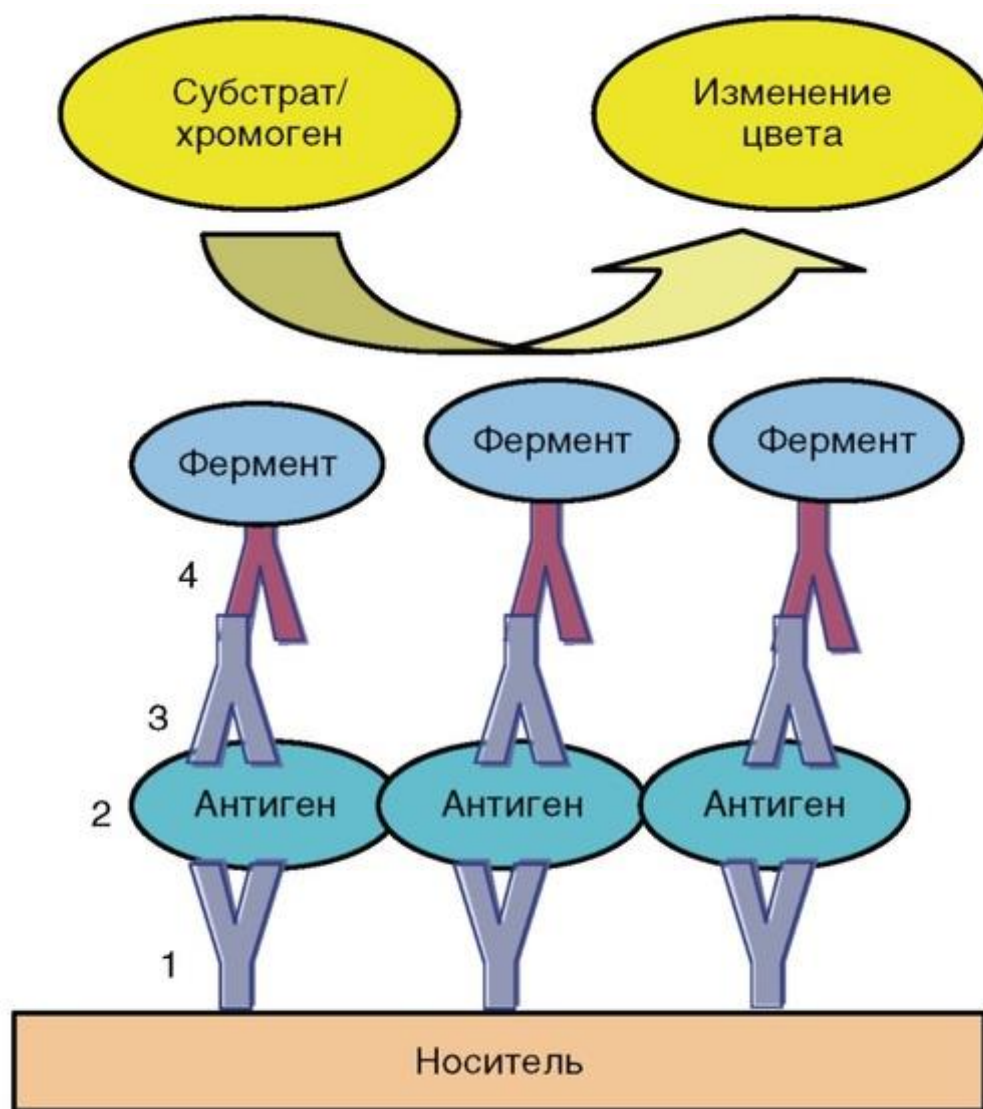


Рис. 9.17. Иммуноферментный анализ, выявление антигена: 1 - антитела против искомого антигена на поверхности планшета; 2 - искомый антиген; 3 - антитела против искомого антигена; 4 - антитела против иммуноглобулинов человека, меченные ферментом (конъюгат)

В течение первой инкубации специфические антитела (если они есть в образце) связываются с антигеном, адсорбированным на твердой фазе (в лунках планшета). С помощью промывки удаляют не связавшийся материал. В течение следующей инкубации антитела против IgG человека, меченные пероксидазой хрена, взаимодействуют с комплексом «антиген-антитело». После цикла промывки добавляют раствор хромогена в лунки, что приводит к появлению окраски под воздействием фермента. Реакцию останавливают добавлением стоп-реагента (HCl). Интенсивность окрашивания раствора измеряют на спектрофотометре при длине волны 450 или 405 нм. Содержание антител в образцах и калибровочных пробах прямо пропорционально измеренной интенсивности окраски раствора.

Оснащение

- Планшет с иммобилизованным антигеном.
- Лунки покрывают очищенным и инактивированным антигеном.
- Калибровочные пробы 0, 10, 30; 60, 120 и 240 ЕД/мл: растворы на основе инактивированной сыворотки крови, содержащие специфические антитела.

- Конъюгат: раствор мышинных моноклональных антител против IgG человека, конъюгированных с ферментом (пероксидазой хрена).

- Буферный раствор для промывки лунок.
- Буферный раствор для разведения образцов.
- Хромоген (раствор тетраметилбензидина - ТМБ).
- Стоп-реагент (раствор соляной кислоты).
- Самоклеящаяся пленка.
- Пластиковый пакет.

Методика анализа

Перед внесением образцов и калибровочных проб (КП) составляют протокол маркировки лунок. Лунки маркируют следующим образом.

- Для качественного анализа:
 - А1, А2 - № 1: лунки для определения оптической плотности раствора ТМБ;
 - В1, В2 - № 2: отрицательный контроль (0 ЕД/мл);
 - С1, С2 - № 3: контроль *cut-off* (10 ЕД/мл);
 - D1, D2 - № 4: положительный контроль (240 ЕД/мл);
 - остальные лунки - образцы от пациентов (в дублях, например: С3, С4; D5, D6; G7, G8).

- Для количественного анализа:
 - А1, А2 - № 1: раствор ТМБ;
 - В1, В2 - № 2: 0 ЕД/мл;
 - С1, С2 - № 3: 10 ЕД/мл;
 - D1, D2 - № 4: 30 ЕД/мл;
 - Е1, Е2 - № 5: 60 ЕД/мл;
 - F1, F2 - № 6: 120 ЕД/мл;
 - G1, G2 - № 7: 240 ЕД/мл;
 - остальные лунки - образцы от пациентов (в дублях, например: С3, С4; D5, D6; G7, G8).

Схема количественного анализа (табл. 9.7)

- В лунки А1 и А2 вносят по 100 мкл буферного раствора для разведения образцов.
- В соответствующие лунки вносят по 100 мкл калибровочных проб.
- В оставшиеся лунки вносят по 100 мкл предварительно разведенных исследуемых образцов.

Примечание. Общее время внесения калибровочных проб и исследуемых образцов не должно превышать 20 мин, иначе время инкубации различных образцов с иммуносорбентом будет значительно отличаться, что приведет к неправильным результатам.

- Накрывают планшет самоклеящейся пленкой и инкубируют в течение 60 ± 5 мин при температуре 37 ± 2 °С.

- По окончании инкубации промывают лунки 4 раза. При каждой промывке во все лунки добавляют по 350 мкл промывочного буферного раствора и выдерживают в течение

нескольких секунд с последующим декантированием (тщательно удаляют остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со полосками в перевернутом положении по фильтровальной бумаге).

- Вносят по 100 мкл конъюгата (меченные ферментом антитела к IgG человека) в каждую лунку. Накрывают планшет самоклеящейся пленкой и инкубируют в течение 30 ± 2 мин при температуре 37 ± 2 °С.

- По окончании второй инкубации удаляют содержимое лунок декантированием и промывают лунки.

- Добавляют во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ. Инкубируют в течение 10 мин при температуре 37 ± 2 °С или в течение 15 мин при комнатной температуре (18-25 °С). Следует избегать прямого попадания света на планшет.

- Добавляют во все лунки по 100 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции (с той же скоростью и в той же последовательности, как раствор ТМБ). Инкубируют в течение 1-2 мин при комнатной температуре (18-25 °С).

- Измеряют оптическую плотность (ОП) на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Референсный фильтр устанавливают на 620 нм, обнуляют прибор по лункам А1, А2. В случае если значение оптической плотности превышает предел линейности спектрофотометра, считывание результатов проводят при длине волны 405 нм. Измерение необходимо проводить в течение 15 мин после остановки реакции.

Таблица 9.7. Схема количественного анализа

Стадия анализа и реагенты	Номер лунки в соответствии с маркировкой							
	A1, A2	B1, B2	C1, C2	D1, D2	E1, E2	F1, F2	G1, G2	все остальные
КП 0 ЕД/мл, мкл	—	100	—	—	—	—	—	—
КП 10 ЕД/мл, мкл	—	—	100	—	—	—	—	—
КП 30 ЕД/мл, мкл	—	—	—	100	—	—	—	—
КП 60 ЕД/мл, мкл	—	—	—	—	100	—	—	—
КП 120 ЕД/мл, мкл	—	—	—	—	—	100	—	—
КП 240 ЕД/мл, мкл	—	—	—	—	—	—	100	—
Буферный раствор для разведения, мкл	100	—	—	—	—	—	—	—
Исследуемые образцы (С _x), разведенные 1:300, мкл	—	—	—	—	—	—	—	100
Инкубация № 1	60±5 мин, 37±2 °С							
4-кратная промывка буферным раствором								
Конъюгат, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100
Инкубация № 2	30±2 мин, 37±2 °С							
4-кратная промывка буферным раствором								

Хромоген (ТМБ), мкл	100	100	100	100	100	100	100	100
Инкубация № 3	18-25 °С, темное место, 15 мин или 37±2 °С, 10 мин							
Стоп-реагент, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100
Инкубация № 4	18-25 °С, 1-2 мин							
Измерение оптической плотности растворов в лунках. Спектрофотометр, 450 и 405 нм								
Расчет результатов	Калькулятор и масштабная бумага либо соответствующая компьютерная программа							

Учет результатов

Количественный анализ. Для определения количества исследуемых антител строят калибровочную кривую, используя данные оптической плотности (ОП) контрольных сывороток. Кривую строят на масштабной бумаге либо используя компьютерную программу. Далее сравнивают ОП исследуемой сыворотки с графиком калибровочной кривой и находят соответствующее значение концентрации опытного образца.

Пример расчетов приведен в таблице. 9.8.

Таблица 9.8. Пример расчетов (количественный анализ)

Описание		Оптическая плотность 450 нм	Концентрация антител	Оптическая плотность 405 нм
Калибратор	0 ЕД/мл	0,080	—	0,027
Калибратор	10 ЕД/мл	0,190	—	0,060
Калибратор	30 ЕД/мл	0,463	—	0,154
Калибратор	60 ЕД/мл	1,494	—	0,498
Калибратор	120 ЕД/мл	2,251	—	0,750
Калибратор	240 ЕД/мл	2,800	—	0,930
Образец		1,794	80 ЕД/мл	0,590

Вывод. Путем интерполяции на калибровочной кривой установлено, что концентрация специфических антител у больного составляет 80 ЕД/мл.

Качественный анализ

- Образцы с ОП ниже ОП контроля - *cut-off*-отрицательные (не содержащие антител).
- Образцы с ОП выше ОП контроля - *cut-off*-положительные (содержащие антитела).
- Область значений ОП составляет ±10% ОП *cut-off* - область сомнительных значений.

9.8.3. Определение avidности IgG

Авидность (от лат. *avidity avidus* - «жадный») - сила связывания специфических антител с молекулой антигена. Авидность зависит от количества образующихся связей (валентности антител) и аффинитета связывания, т.е. от степени соответствия трехмерной структуры антитела и связывающегося с ним участка антигенной детерминанты по принципу «ключ-замок». Соответственно, чем выше аффинность антител, тем больше avidность их взаимодействия с антигеном. Первоначально вырабатываются низкоаффинные антитела с небольшой avidностью (силой связывания). По мере формирования иммунного ответа начинается выработка более аффинных антител, связывающихся с антигеном большей avidности. В начале инфекции выявляются низкоавидные IgG. После перенесенного заболевания, хронической инфекции или вакцинации IgG обладают высокой avidностью.

В основе теста на avidность IgG лежит метод обработки комплексов «антиген-антитело» раствором мочевины, вызывающим диссоциацию. После такого воздействия связь низкоавидных антител с антигеном нарушается, а высокоавидных - сохраняется. Авидность IgG в пробе оценивают с помощью расчетного показателя - индекса avidности (ИА), который представляет собой отношение концентрации IgG после обработки диссоциирующим раствором мочевины к результату измерения концентрации IgG-антител без такой обработки.

Определение индекса avidности

Принцип анализа. Для определения ИА ставят ИФА (см. выше). Сыворотку пациента вносят в две лунки полистирольного планшета с сорбированным на дне лунок антигеном. После инкубации сыворотки планшет промывают буферным раствором и в одну лунку вносят реагент для диссоциации (раствор мочевины), а другую заполняют буферным раствором. Мочевина вызывает диссоциацию ранее образовавшегося комплекса «антиген-антитело». Степень диссоциации зависит от avidности антител. После цикла промывки антитела, связанные с антигеном, сорбированном на твердой фазе, вступают в последующие реакции - сначала с антителами против IgG человека, мечеными ферментом, а затем с раствором хромогена (ТМБ). Реакцию останавливают добавлением стоп-реагента. Интенсивность окрашивания раствора измеряют на спектрофотометре. По окончании ИФА определяют ИА как отношение ОП в лунке, обработанной раствором мочевины, к ОП в лунке без обработки.

Пороговые значения ИА устанавливают фирмы - производители тест-систем. Например, для краснухи:

- ИА >60% - высокоавидные антитела класса IgG;
- ИА=40-60% - антитела класса IgG неопределенной (промежуточной) avidности;
- ИА <40% - низкоавидные антитела класса IgG.

Процедура исследования

• Схема размещения на планшете образцов и контролей. Составляют протокол маркировки лунок. Лунки маркируют следующим образом:

— A1, A2 - № 1: лунки для определения оптической плотности (ОП) раствора ТМБ;

— B1, B2 - № 2: лунки для определения ОП низкоавидного контроля;

— C1, C2 - № 3: лунки для определения ОП высокоавидного контроля;

— остальные лунки (D1, D2, H11, H12) - № 4: лунки для определения ОП исследуемых образцов.

- Инкубация с образцом (1-я стадия). Вносят по 100 мкл контролей или разведенных образцов пациентов в отдельные лунки микропланшета в соответствии со схемой размещения (каждый образец и контроль в две лунки). Инкубируют планшет при комнатной температуре (18-25 °С) в течение 30 мин.

- Промывка. По окончании инкубации промывают лунки четыре раза. При каждой промывке во все лунки добавляют по 350 мкл промывочного буферного раствора и выдерживают в течение нескольких секунд с последующим декантированием (тщательно удаляют остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге).

- Инкубация с мочевиной (2-я стадия). Вносят в каждую лунку нечетного ряда (1, 3, 5-го и т.д.) по 200 мкл раствора мочевины и по 200 мкл фосфатного буфера в каждую лунку четного ряда (2, 4, 6-го и т.д.). Инкубируют в течение 10 мин (время зависит от тест-системы) при комнатной температуре (18-25 °С).

- Промывка. См. выше.

- Далее продолжают постановку ИФА.

- Инкубация с конъюгатом (3-я стадия). Вносят по 100 мкл конъюгата (меченные ферментом антитела к IgG человека) в каждую лунку. Накрывают планшет самоклеящейся пленкой и инкубируют в течение 30±2 мин при температуре 37±2 °С.

- Промывка. См. выше.

- Инкубация с субстратом (4-я стадия). Добавляют во все лунки по 100 мкл раствора хромогена/субстрата (ТМБ). Инкубируют в течение 10 мин при температуре 37±2 °С или в течение 15 мин при комнатной температуре (18-25 °С). Следует избегать прямого попадания света на планшет.

- Остановка реакции. Добавляют во все лунки по 100 мкл стоп-реагента (H₂SO₄ или HCl) для остановки ферментной реакции (с той же скоростью и в той же последовательности, как раствор ТМБ). Инкубируют в течение 1-2 мин при комнатной температуре (18-25 °С).

- Фотометрическое измерение. Измеряют ОП на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Измерение необходимо проводить в течение 15 мин после остановки реакции.

- Расчет результатов. Присутствие в сыворотке крови пациента антител с низкой авидностью считают установленным, если величина ОП в значительной степени снижается после обработки раствором мочевины. Для получения объективных результатов рассчитывают индекс авидности (ИА), который выражают в процентах, используя величины ОП образца после и без обработки мочевиной:

$$\text{ИА} = (\text{ОП образца, обработанного мочевиной} / \text{ОП образца, не обработанного мочевиной}) \times 100\%.$$

Пример расчета приведен в таблице 9.9.

Таблица 9.9. Пример расчета индекса авидности

Образец	Оптическая плотность (ОП) образца, обработанного мочевиной (450 нм)	Оптическая плотность (ОП) образца, обработанного мочевиной (450 нм)	Индекс авидности, %
Низкоавидный	0,947	0,178	18,8

контроль			
Высокоавидный контроль	1,244	0,972	78,1
Сыворотка пациента	0,565	0,080	14,1
<p>Результат: ИА = 14,1%.</p> <p>Вывод. У пациента выявлены низкоавидные антитела класса IgG</p>			

Примечание. Достоверные результаты измерения авидности IgG-антител могут быть получены только в том случае, если в образце пациента содержится диагностически значимое количество специфических антител. У некоторых пациентов с острой инфекцией обнаруживаются очень высокие титры IgG-антител. Даже если популяция антител класса IgG находится на разных стадиях созревания (т.е. присутствуют и высокоавидные, и низкоавидные антитела), свободные эпитопы антигенов в сыворотках с высоким титром антител будут реагировать преимущественно с высокоавидными антителами. Определение авидности для всей популяции антител класса IgG в таких образцах может привести к получению ложновысоких значений ИА. Это наблюдается в некоторых случаях при исследовании образцов больных с острой инфекцией, для которых ОП в лунках, не обработанных мочевиной, слишком высокое. Для таких образцов рекомендуют повторить исследование на авидность, исследуя их в разведении.

9.8.4. Радиоиммунологический анализ

Радиоиммунологический анализ (РИА) сходен по постановке с ИФА и основан на использовании меченных радиоактивными изотопами антигенов или антител. Результат оценивают по уровню радиоактивности образовавшихся в ходе реакции иммунных комплексов. В настоящее время для серологической диагностики метод практически не используют.

9.8.5. Иммуноблоттинг

Иммуноблоттинг (ИБ) (от англ. *blot* - «пятно») - метод, основанный на сочетании электрофореза и ИФА (реже РИФ, РИА). При проведении ИБ сложную смесь антигенов вначале подвергают электрофоретическому разделению в полиакриламидном геле. Фракционированные антигенные пептиды переносят в виде отдельных полос на нитроцеллюлозную мембрану, а затем проявляют мечеными ферментом, флюорохромом или изотопом антителами. Обычно этим методом перепроверяют положительный результат при ИФА, поскольку ИБ считают более чувствительным и специфичным (он позволяет одновременно обнаружить антитела сразу к нескольким антигенам возбудителя), хотя и более сложным и дорогим.

Используют наборы двух типов: вестерн-блот и лайн-блот.

- Вестерн-блот. Наборы содержат тестовые стрип-мембраны с электрофоретически разделенными нативными антигенами соответствующих инфекционных агентов. На стрипе антигены располагаются в порядке молекулярной массы (рис. 9.18). На мембраны могут быть также нанесены одна-две дополнительные линии с клинически значимыми антигенами (вестерн-лайн-блот). Это надежный подтверждающий метод, исключая ложноположительные ответы и перекрестные реакции.

- Лайн-блот. В этом случае на тестовые стрип-мембраны нанесены только клинически значимые антигены (нативные, синтетические или рекомбинантные) в определенном порядке. Такой подход используют при дифференциальной диагностике нескольких инфекций на одном стрипе (рис. 9.19).

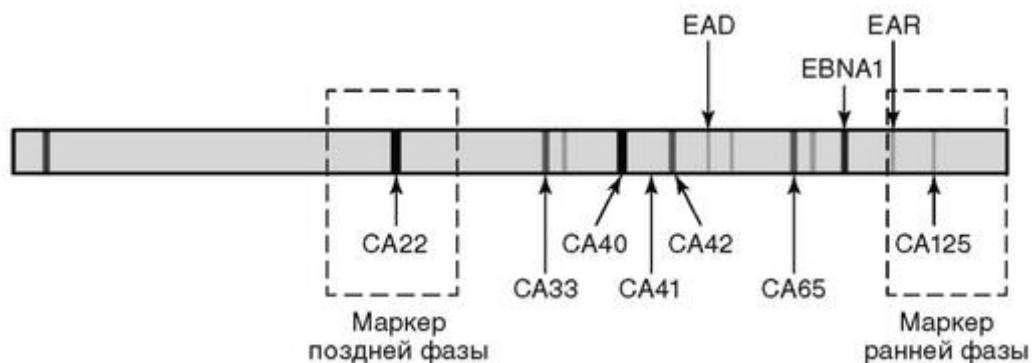


Рис. 9.18. Вестерн-блот для диагностики ВЭБ-инфекции

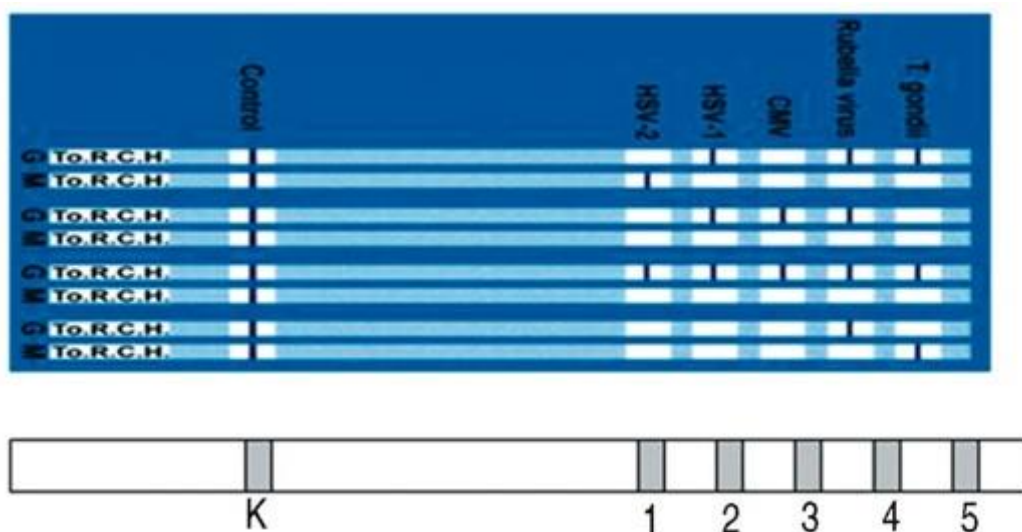


Рис. 9.19. Лайн-блот для диагностики TORCH-инфекций. Антигены: 1 - простого герпеса 2-го типа; 2 - простого герпеса 1-го типа, 3 - цитомегаловируса; 4 - вируса краснухи; 5 - *Toxoplasma gondii*. При наличии у пациента антител к данным антигенам в соответствующей зоне появляется полоска. К - контроль

Процедура иммуноблота состоит из нескольких стадий.

- Сначала патоген, предварительно очищенный и разрушенный до составных компонентов, подвергают электрофорезу, при этом все входящие в его состав антигены разделяются по молекулярной массе. В зависимости от молекулярной массы и заряда различные антигены мигрируют с различной скоростью. Молекулы белка, обладающие одинаковой молекулярной массой, пройдут в геле одинаковый путь и выстроятся в виде полосы. Поскольку в смеси присутствуют белковые молекулы разного размера, образуется множество полос. Для того чтобы сделать белки доступными для антител и дальнейшей детекции, их вместе с полоской геля методом блоттинга переносят на мембрану, изготовленную из нитроцеллюлозы или поливинилиденфторида. Виды переноса антигена с геля на нитроцеллюлозу:

- *капиллярный*, или *пассивный*. Мембрану накладывают поверх геля, а сверху кладут стопку фильтровальной бумаги. Вся стопку помещают в буфер для переноса, который продвигается вверх по бумаге под действием капиллярных сил, уносит с собой белки. Продолжается 18 ч в буфере;

- *вакуумный* - продолжается 10 мин (наиболее популярный);

- *электроперенос* - используется электрический ток, который переносит белки из геля на мембрану; продолжается в буфере 30-40 мин;

— сухой электроперенос - продолжается 3-5 мин.

- После переноса мембрана содержит невидимые пока глазом полосы различных белковых антигенов, характерные для возбудителя. Следующий этап называют блокированием. Это мера для исключения взаимодействия между мембраной и антителом, используемым для детекции целевого белка (так как антитело представляет собой белок). При этом свободные неспецифические связывающие места блокируются белками блокирующего буфера. Именно поэтому при добавлении антител для них нет свободного места на мембране, куда бы они могли прикрепиться, кроме сайтов связывания на специфичных целевых белках-антигенах.

- Далее на стрип наносят исследуемый материал (сыворотку, плазму крови пациента), и, если в пробе есть специфические антитела, они связываются со строго соответствующими им полосками белков-антигенов. Не связавшиеся компоненты сыворотки крови вымывают промывающим буфером. В результате последующих манипуляций (подобных ИФА) результат этого взаимодействия визуализируется. Специфически связанные с антигенами на полоске антитела метят высокоспецифичными антителами к человеческим иммуноглобулинам, меченым ферментом. После второй промывки специфически связанный фермент определяется по его реакции с субстратом/хромогеном. В случае присутствия в сыворотке пациента антител к антигенам на мембране будет видна голубая поперечная полоска. Используя шаблоны, специфичные для данного микроорганизма, по месторасположению проявившихся голубых окрашенных поперечных полосок на мембране можно идентифицировать антитела, присутствующие в сыворотке крови, и соответственно вид антигенов штамма, вызвавшего заболевание.

Иммуноблоттинг применяют в диагностике:

- вирусных инфекций: ВИЧ, коронавирусной, герпес-вирусной, Эпштейна-Барр, цитомегаловирусной, краснухи, вирусного гепатита С и др.;
- бактериальных инфекций: *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi*, и др.

Можно также диагностировать некоторые паразитические (финноз, токсоплазмоз) и генетические (некоторые формы анемии Фанкони) болезни. Возможно проведение подробного анализа антигенспецифических IgE (АС-IgE) к различным компонентам сложных аллергенов.

9.8.6. Иммунохроматографический анализ

Иммунохроматографический анализ (ИХА) - иммунохимический метод анализа, основанный на принципе тонкослойной хроматографии, проводят с помощью специальных тест-полосок, панелей или тест-кассет. ИХА - экспресс метод, позволяет получить результат в течение 10 мин.

ИХА используют для обнаружения различных антигенов [вирусов, бактерий, грибов, простейших, различных гормонов (например, в тестах на беременность)] в биологических жидкостях, онкологических метаболитов, наркотических соединений и др.

Различают два способа постановки ИХА - прямой и конкурентный.

Прямой (сэндвич) метод иммунохроматографического анализа

На специальной тест-полоске расположены три зоны (рис. 9.20).

- На первую (активную) нанесены меченые моноклональные антитела к исследуемому антигену. Наиболее часто в качестве метки используют краситель (коллоидное золото).

- Вторая (тестовая линия) содержит немеченые антитела к искомому антигену, прочно связанные с полоской.

- Третья (контрольная линия) содержит связанные с полоской антитела к иммуноглобулинам.

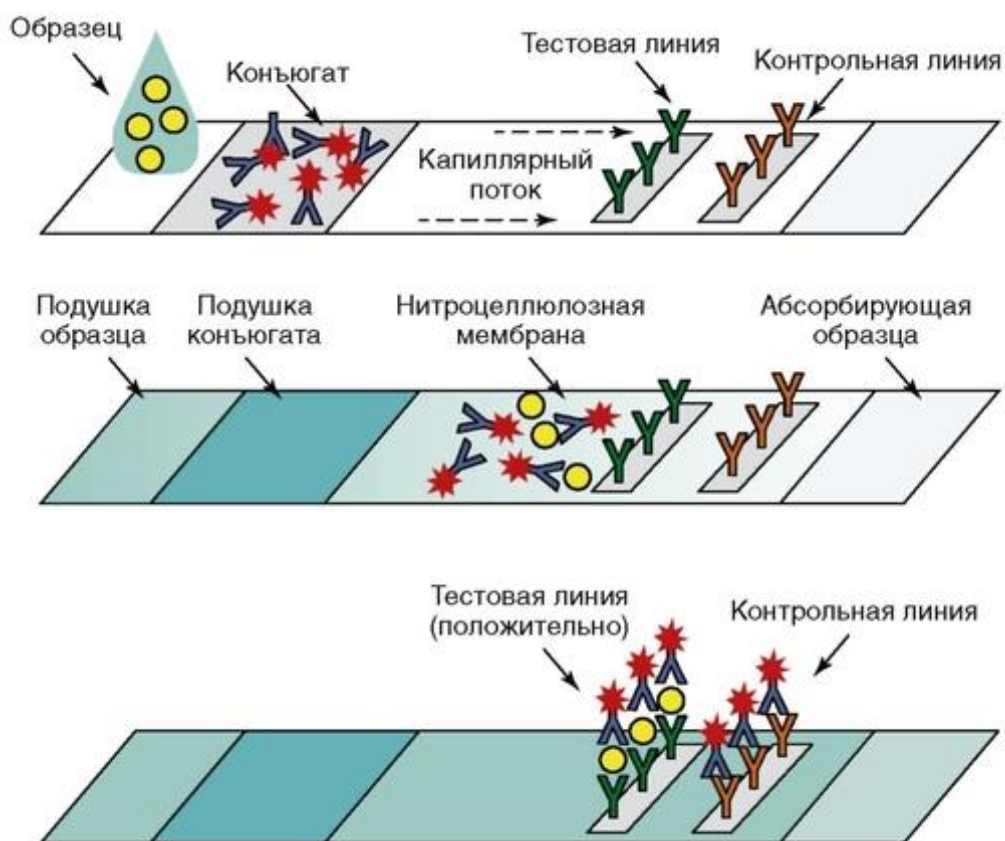


Рис. 9.20. Схема прямого метода иммунохроматографического анализа

При погружении тест-полоски в биологическую жидкость, содержащую антиген, она начинает мигрировать вдоль полоски под действием капиллярных сил по принципу тонкослойной хроматографии. Проходя через активную зону, искомый антиген (аналит) связывается с антителами, мечеными коллоидным золотом, и весь комплекс движется дальше. При прохождении через тестовую зону комплекс «антиген-антитело» с меткой посредством антигена присоединяется к антителам на полоске, и образуется сэндвич («антитело-антиген-антитело с коллоидным золотом»), видимый в виде окрашенной линии. Свободные антитела с красителем мигрируют далее вдоль полоски и неизбежно связываются с антителами против иммуноглобулинов в контрольной зоне, где наблюдается вторая окрашенная (контрольная) полоса. Таким образом, при наличии антигена в исследуемом образце видны две линии - положительная реакция. При отсутствии антигена в образце меченые антитела связываются только с антителами к иммуноглобулинам на контрольной линии, образуя одну линию на тест-полоске, - отрицательную реакцию (рис. 9.21).

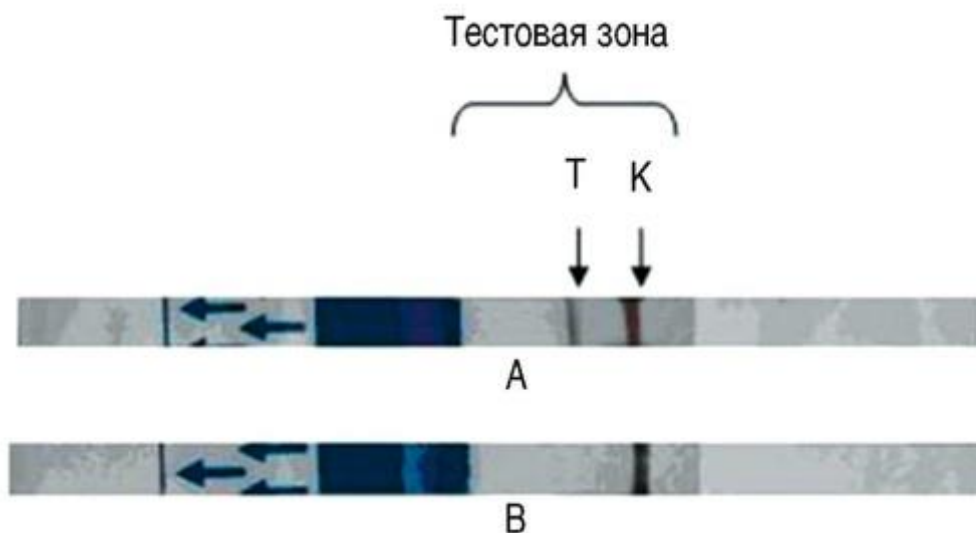


Рис. 9.21. Прямой метод иммунохроматографического анализа: К - контрольная полоса; Т - тестовая полоса; А - положительный результат; В - отрицательный результат

Метод прямого ИХА используют для выявления высокомолекулярных соединений - антигенов бактерий, простейших, грибов, вирусов, различных гормонов (например, в тестах на беременность).

Конкурентный метод иммунохроматографического анализа

Данный метод используют для определения низкомолекулярных соединений. Метод основан на конкуренции искомого антигена (аналита) и иммобилизованного на полоске антигена за ограниченное количество центров связывания специфических антител (рис. 9.22). На специальной тест полоске расположены три зоны:

- первая - активная, на которую нанесены меченые моноклональные антитела к исследуемому антигену;
- вторая - тестовая линия, содержит антигены, аналогичные искомому антигену;
- третья - контрольная линия, содержит антитела к иммуноглобулинам.

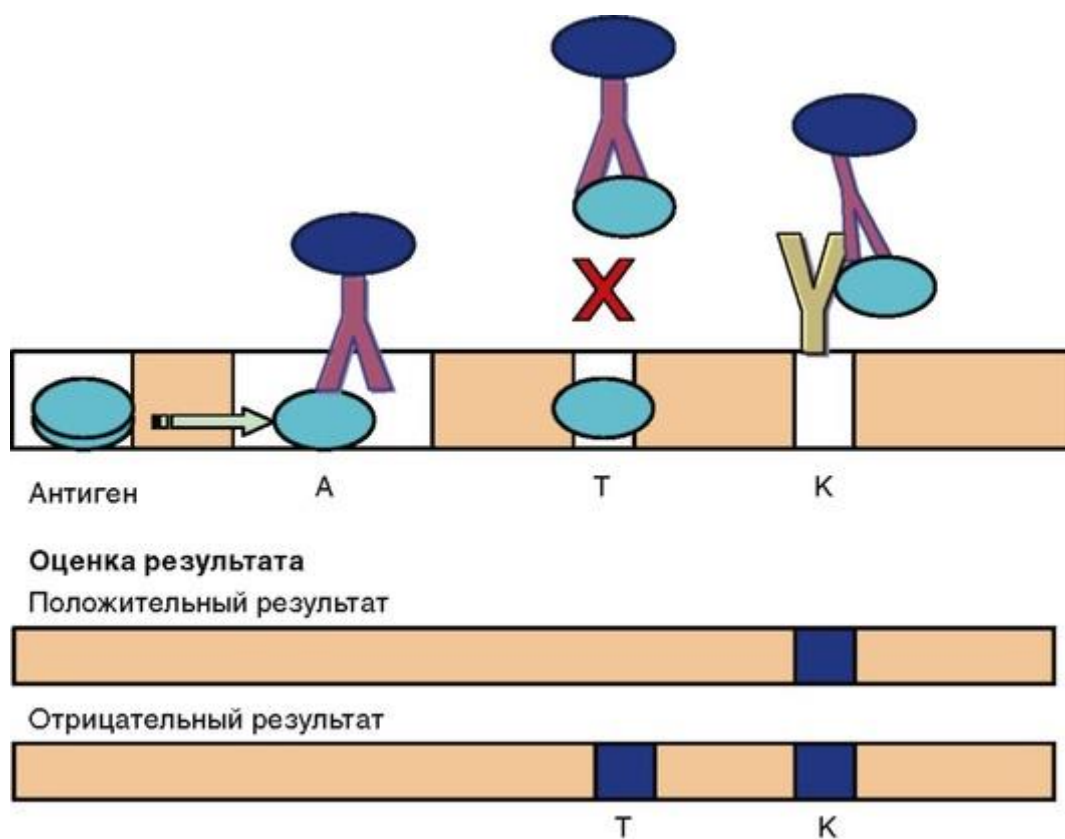


Рис. 9.22. Конкурентный метод иммунохроматографического анализа: антиген - искомый антиген; А - активная зона (место связывания искомого антигена и антител, меченных коллоидным золотом); Т - тестовая зона с антигеном, аналогичным искомому; К - контрольная зона с антителами против иммуноглобулинов

При нанесении образца искомый антиген (аналит) связывается с мечеными антителами в активной зоне. Далее иммунный комплекс проходит через тестовую зону, где закреплен антиген. Иммунный комплекс не может связаться с этой зоной из-за того, что у антител центры связывания уже заняты антигеном. Далее иммунный комплекс захватывается антителами против иммуноглобулинов, находящимися на контрольной линии. В результате отсутствие окрашенной полосы в тестовой зоне и наличие окраски в контрольной зоне свидетельствуют о том, что концентрация определяемого вещества в исследуемом образце превышает его пороговое значение для данного теста - положительная реакция. При отсутствии анализируемого вещества в образце меченые антитела связываются с антигеном, иммобилизованным в зоне тестовой линии. Не связавшиеся меченые антитела попадают в зону контрольной линии и связываются там с антителами к иммуноглобулинам. Таким образом, наличие двух окрашенных линий (тестовой и контрольной) - отрицательный результат анализа.

Формат конкурентного ИХА используют для выявления низкомолекулярных соединений, в том числе метаболитов наркотических соединений в моче, жидкости ротовой полости, экстрактах тканей.

9.9. РЕАКЦИЯ ТОРМОЖЕНИЯ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ

Реакцию торможения гемагглютинации (РТГА) используют при диагностике инфекций, вызываемых вирусами, имеющими на своей поверхности гемагглютинин. При помещении таких вирусов в пробирку с эритроцитами они вызывают гемагглютинацию (рис. 9.23), что проявляется выпадением эритроцитов в осадок в виде зонтика (тонкой пленки с неровными краями).

РТГА заключается в блокировании антителами вирусных антигенов, в результате чего вирусы теряют способность агглютинировать эритроциты (рис. 9.24). При положительной реакции, если антигены вируса и антитела комплементарны, вирус инактивируется, гемагглютинация отсутствует, определяется осадок в виде пуговки. В том случае, если антитела не комплементарны антигенам вируса, он не инактивируется и вызывает гемагглютинацию - осадок в виде зонтика.

С помощью РТГА можно выявлять антитела к вирусу в сыворотке больного (для этого используют вирусный диагностикум - известные убитые вирусы, сохранившие свои антигенные детерминанты). Реже данную реакцию используют для идентификации неизвестного вируса (для этого используют диагностическую сыворотку, содержащую антитела против известных вирусных антигенов). Схема постановки реакции представлена в таблице 9.10.

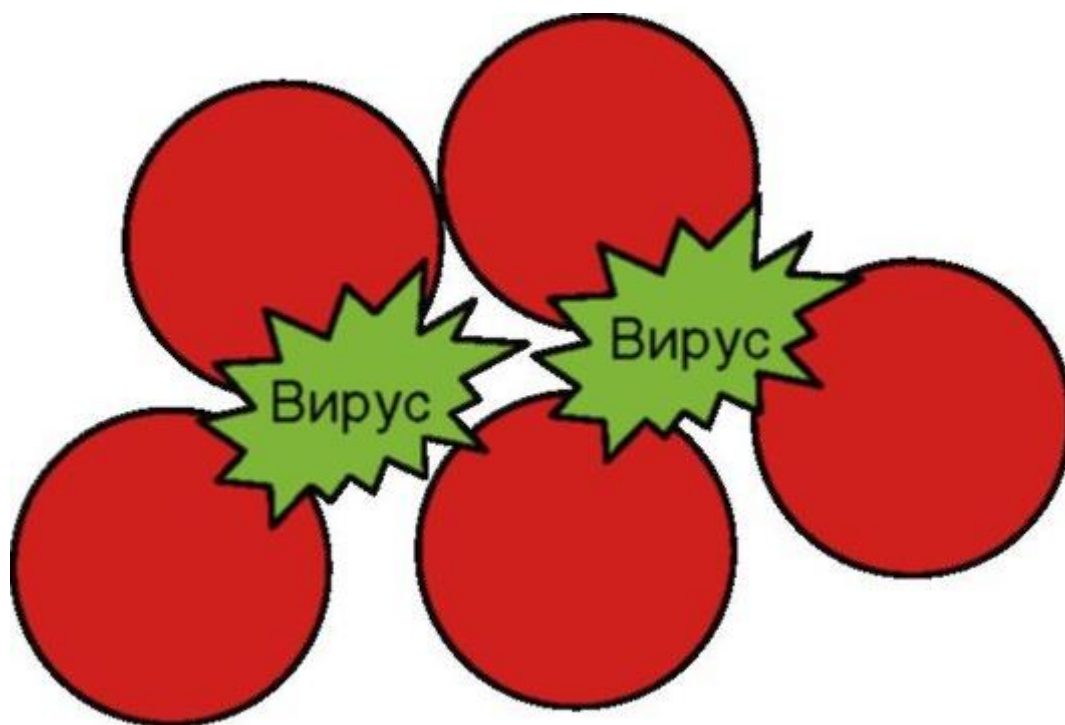


Рис. 9.23. Реакция гемагглютинации при участии вирусов

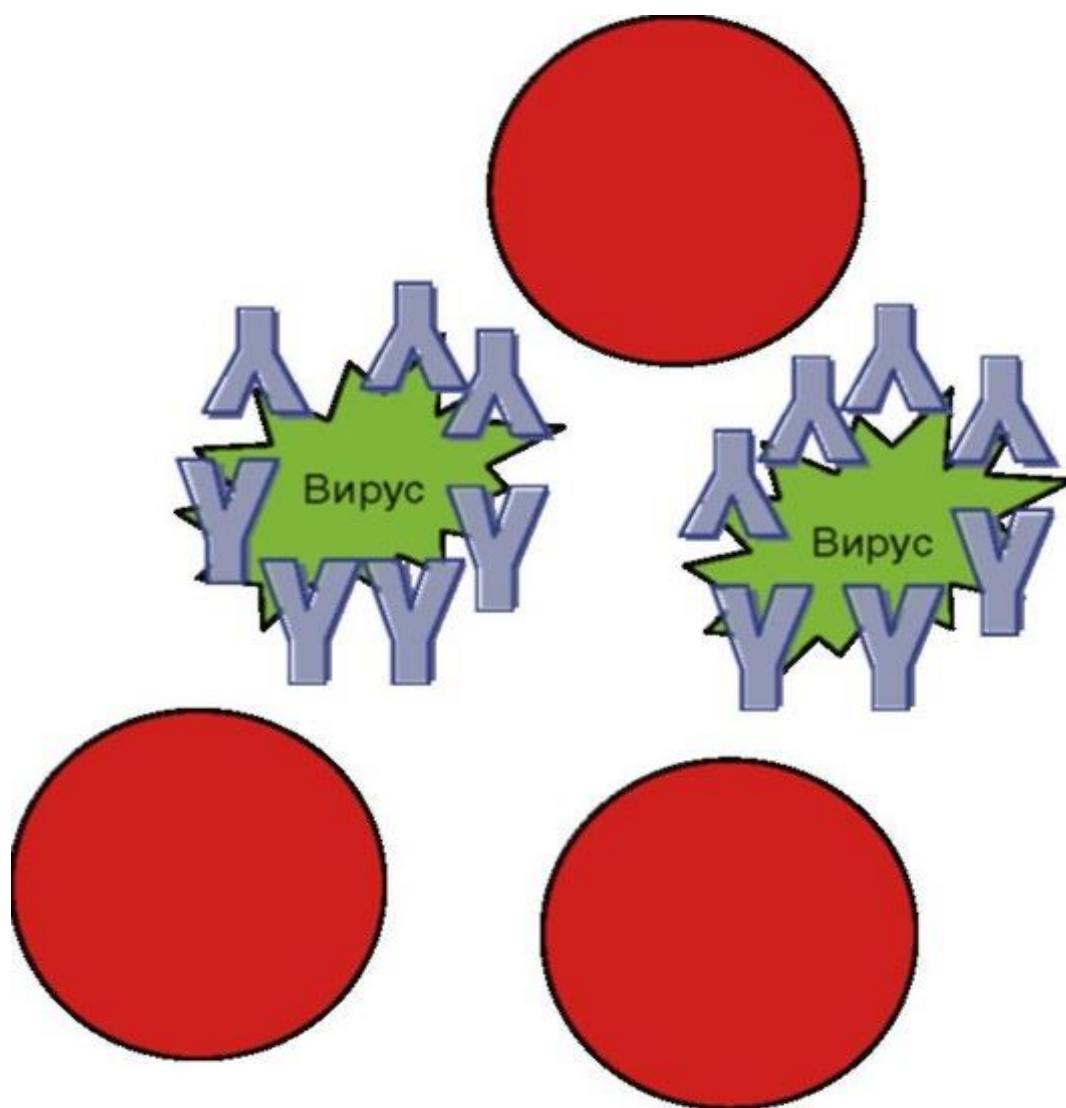


Рис. 9.24. Реакция торможения гемагглютинации. Антитела инактивируют вирус - гемагглютинация отсутствует

Таблица 9.10. Реакция торможения гемагглютинации

Ингредиенты, мл	Номер пробирки, разведение									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	контроль			
							сыворотки	вируса	эритроцитов	
0,85% раствор натрия хлорида	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1,0	
Исследуемая сыворотка (1:10)	0,5	→	→	→	→	→	Вылить 0,5	—	—	
Вирусный диагностикум	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	—	0,5	—	

1% суспензия эритроцитов	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Результаты										
Заключение. Титр антител в сыворотке больного - ...										

9.10. РЕАКЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ

Микроорганизмы и их токсины оказывают повреждающее действие на органы и ткани нашего организма. Антитела способны связываться с этими повреждающими агентами и блокировать их, т.е. нейтрализовать. На этой особенности антител основана диагностическая реакция биологической нейтрализации (РБН). Реакцию нейтрализации проводят путем введения смеси «антиген-антитело» в организм животных или иные тест-объекты (культуры клеток, эмбрионы), которые выживают при положительном результате.

Пример 1 - нейтрализующее действие антитоксической сыворотки в опыте нейтрализации столбнячного токсина на мышах (табл. 9.11). Реакцию нейтрализации проводят следующим образом:

- в одну пробирку с 1 мл противостолбнячной сыворотки 1 МЕ/мл добавляют 1 мл столбнячного токсина 20 ЕС/мл, в другую пробирку помещают только 1 мл столбнячного токсина 20 ЕС/мл и 1 мл изотонического раствора натрия хлорида;
- смесь для связывания выдерживают 60 мин в термостате;
- из каждой пробирки проводят заражение 2-4 мышей введением 0,2 мл разведенного токсина в мышцы бедра и наблюдают за состоянием животных в течение 4 сут. У мышей, которым ввели только столбнячный токсин, через сутки появляются первые признаки болезни - спастические сокращения мышц хвоста и мышечных групп вблизи места введения, затем поражение распространяется на другие мышцы тела, и животные погибают. При введении токсина одновременно с противостолбнячной сывороткой происходит реакция нейтрализации токсина антитоксином, и мыши выживают.

Таблица 9.11. Нейтрализация столбнячного токсина на мышах

Ингредиенты, мл	Номер пробирки	
	1	2
Столбнячный токсин 20 ЕС/мл	1	1
Антитоксическая противостолбнячная сыворотка 1 МЕ/мл	1	—
Изотонический раствор натрия хлорида	—	1
Термостат при температуре 37 °С в течение 1 ч		
Мышам вводят внутримышечно 0,2 мл смеси		
Результат		
Заключение		

Пример 2 - РБА в культуре клеток для идентификации вируса. Культуру клеток культивируют в питательной среде, содержащей индикатор. Изначально питательная среда имеет красный цвет. Если культура клеток живая, она выделяет продукты жизнедеятельности, закисляет питательную среду, и цвет меняется с красного на желтый. Если поместить вирус в культуру клеток, она погибает, и цвет остается красным. Реакция биологической нейтрализации вируса - вирус смешивают с антителами. Если антигены вируса и антитела комплементарны, вирус инактивируется, культура клеток выживает, цвет меняется на желтый - реакция положительная. В случае если антигены вируса не комплементарны антителам, вирус остается свободным и убивает культуру клеток - реакция отрицательная. Данную реакцию можно использовать как для идентификации вируса (для этого берут известные антитела - диагностическую сыворотку) (табл. 9.12), так и для поиска антител в сыворотке больного (для этого берут известные живые вирусы - диагностикум) (табл. 9.13).

Таблица 9.12. Реакция биологической нейтрализации в культуре клеток для идентификации вируса

Ингредиенты	Результат (изменение цвета питательной среды)
Неизвестный вирус + сыворотка против вируса X	
Неизвестный вирус + сыворотка против вируса Y	
Контроль	
Культура клеток	
Культура клеток + неизвестный вирус	
Культура клеток + сыворотка против вируса Y	
Заключение. Неизвестный вирус является вирусом ... (X/Y)	

Таблица 9.13. Реакция биологической нейтрализации с парными сыворотками

Разведение сыворотки больного	Первая сыворотка от больного (в начале заболевания)	Вторая сыворотка от больного (через 10-14 дней от начала заболевания)
	результат (изменение цвета питательной среды)	
1:50		
1: 100		
1:200		
1:400		
1:800		
Контроль		

Культура клеток		
-----------------	--	--

Окончание табл. 9.13

Разведение сыворотки больного	Первая сыворотка от больного (в начале заболевания)	Вторая сыворотка от больного (через 10-14 дней от начала заболевания)
	результат (изменение цвета питательной среды)	
Культура клеток + вирус (диагностикум)		
Культура клеток + сыворотка 1		
Культура клеток + сыворотка 2		
Заключение. Титр антител в первой сыворотке - ..., титр антител во второй сыворотке - ..., возрастание титра антител - в ... раз. Диагноз (подтвержден/не подтвержден)		

Вопросы для самоконтроля

Составьте пары «вопрос-ответ».

1. Реакция Кумбса	А. Используется конъюгат
2. ИФА	Б. Используется гемолитическая система
3. РСК	В. Используется бактериальный диагностикум
4. Развернутая реакция агглютинации	Г. Используется антиглобулиновая сыворотка
5. Позволяет определить антигенный состав бактерий	Д. Реакция флокуляции
6. Позволяет определить активность анатоксина	Е. Иммуноблот
7. Позволяет определить антитела к различным антигенам	Ж. Реакция Кумбса
8. Позволяет выявить неполные антитела	З. Реакция агглютинации на стекле

9. Отсутствие гемолиза считают ... результат РСК.

10. Положительный результат РПГА проявляется в виде образования .

МОДУЛЬ 10. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Цели модуля

- Знать: основные методы микробиологической диагностики инфекционных заболеваний, их цели и задачи, условия применения.
- Уметь: выбирать материал для исследования и метод исследования.
- Владеть: знаниями об условиях хранения и транспортировки материала для исследования.

10.1. МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Микробиологическая диагностика позволяет поставить или подтвердить клинический диагноз инфекционного заболевания, определить источник инфекции и чувствительность возбудителя к антибактериальным препаратам.

В микробиологической лаборатории используют различные методы диагностики:

- микроскопический;
- культуральный;
- биологический;
- серологический;
- аллергологический;
- молекулярно-генетический.

Микроскопический метод - обнаружение микроорганизмов в препаратах из исследуемого материала и их первичная морфологическая идентификация.

Микропрепараты могут быть нативными (изучают микроорганизмы в живом состоянии), при этом можно определить подвижность исследуемых объектов. Микроскопию таких препаратов осуществляют в затемненном поле зрения светового микроскопа, а также с помощью темнопольной и фазово-контрастной микроскопии.

Исследование фиксированных и окрашенных различными методами препаратов дает возможность определить расположение микроорганизмов в препарате, их размеры, компоненты клетки, отношение к окраске. Микроскопическая техника может быть различной - с помощью светового, люминесцентного, электронного микроскопа и др.

Световую микроскопию из-за ничтожно малых размеров вирусов при исследовании вирусосодержащего материала практически не применяют. С помощью светового микроскопа можно выявить внутриклеточные включения, которые образуются в пораженных клетках при некоторых вирусных инфекциях.

В этом случае чаще всего используют электронный микроскоп, реже - люминесцентный. Лишь для обнаружения крупных вирусов, используя методы свертывания, можно применить световой микроскоп.

Микроскопический метод чаще используют как ориентировочный, поскольку не всегда можно идентифицировать микроорганизм по морфологическим признакам.

Культуральный метод - посев исследуемого материала на питательные среды, куриные эмбрионы, культуры клеток для выделения чистой культуры возбудителя и его идентификации. Этот метод - «золотой стандарт» микробиологического исследования, поскольку позволяет успешно выделить и идентифицировать возбудителя, хотя и является

дорогостоящим, трудоемким и длительным (проводится в течение 3-5 дней, а иногда и более).

Данный метод называют:

- *бактериологическим* - при выращивании бактериальной культуры, которую идентифицируют по морфологическим, тинкториальным, культуральным, биохимическим и антигенным свойствам. При необходимости этот метод позволяет провести эпидемиологическое маркирование и определить чувствительность к антибиотикам;
- *микологическим* - при культивировании грибов (посев исследуемого материала проводят на специальную среду Сабуро);
- *протозоологическим* (паразитологическим) - при выделении простейших;
- *вирусологическим* - при работе с вирусосодержащим материалом. Выделение чистой культуры осуществляют в несколько этапов.

Иногда перед посевом проводят первичную микроскопию исследуемого материала (необязательный этап). Моча, кровь, фекалии, мазки из зева и носа первичной микроскопии не подлежат. Гной, спинномозговая жидкость, мокрота (из разведений 10^4 - 10^5) подлежат микроскопии перед посевом, так как она помогает выбрать среды для посева (этапы выделения чистой культуры - см. модуль 3).

Вирусологический метод заключается в выделении вирусов при заражении исследуемым материалом лабораторных животных, куриных эмбрионов, культур клеток с последующей индикацией вируса в зараженном объекте и его идентификацией (см. модуль 5).

Биологический метод (экспериментальный, биопроба) - выделение чистой культуры при заражении экспериментальных животных с последующим высевом крови, секционного материала на питательные среды, выделением чистой культуры и ее идентификацией. Этот метод позволяет определить факторы патогенности микроорганизма, летальную дозу (DL), тип токсина, вырабатываемого микроорганизмом.

Серологический метод - выявление антител в сыворотке крови (а также в слюне и других биологических жидкостях больного) с помощью известных бактериальных антигенов. Этот метод позволяет определить количество (титр) антител, протекание инфекционного процесса путем определения нарастания титра антител. Серологический метод позволяет также определить стадию заболевания. Для этого определяют класс иммуноглобулинов. Обнаружение специфических иммуноглобулинов класса М свидетельствует об острой инфекции. При диагностике некоторых инфекций (гепатита В) определяют антигены микроорганизмов в материале от больного.

Особенность серологического метода в вирусологии - исследование парных сывороток. Первую сыворотку берут у больного в острый период в начале болезни, хранят при температуре 4-8 °С, а вторую сыворотку - через 10-14 дней. Сыворотки исследуют одновременно. О болезни свидетельствует сероконверсия, т.е. нарастание титра антител во второй сыворотке по отношению к первой. Диагностической является сероконверсия в 4 раза и выше. Поскольку многие вирусные болезни протекают остро, этот вариант серологического метода обычно применяют для ретроспективной диагностики.

Аллергологический метод - выявление повышенной чувствительности к бактериальному аллергену. С этой целью ставят кожно-аллергические пробы с диагностическими аллергенами.

Молекулярно-генетический метод - идентификация возбудителя в исследуемом материале путем определения нуклеотидных последовательностей с помощью ПЦР, ЛЦР и других методов молекулярной биологии (см. модуль 4).

Для диагностики бактериальных инфекций можно использовать все методы микробиологической диагностики, однако «золотой стандарт» диагностики бактериальных инфекций - бактериологический метод. Он позволяет не только выделить и идентифицировать возбудителя, но и подобрать антибактериальный препарат для лечения, а также провести эпидемиологическое исследование, определяя источник инфекции и цепочку передачи возбудителя (для этого часто используют молекулярно-биологические методы). В тех случаях, когда не удается выделить возбудителя, в качестве дополнительного метода применяют серологические исследования. Микроскопический метод в большинстве случаев используют как ориентировочный. Молекулярно-биологические методы можно использовать в качестве экспресс-диагностики и для типирования возбудителя. Аллергический метод используют в качестве предварительного исследования при массовых обследованиях.

В вирусологии используют вирусоскопический, вирусологический, серологический и молекулярно-генетический методы диагностики.

Вирусоскопический метод - микроскопическое обнаружение вируса в исследуемом материале. Вследствие малых размеров вирусы исследуют с помощью электронной микроскопии. Световую микроскопию вирусов из-за их малых размеров не применяют, за исключением самого крупного вируса - натуральной оспы, который после окраски серебром по Морозову разбухает в виде отдельных точек. С помощью светового микроскопа можно выявить только внутриклеточные включения, образующиеся в пораженных клетках.

Вирусологический метод заключается в выделении вируса из исследуемого материала путем заражения лабораторных животных, куриных эмбрионов или культур клеток с последующей его индикацией и идентификацией.

Вирусы идентифицируют с помощью ПЦР и серологических реакций (реакций непрямой гемагглютинации - РНГА, РТГА, реакций нейтрализации - РН, ИФА, РИФ, РСК и др.). Аналогичные реакции применяют для выявления антител в сыворотке больного (серологический метод).

Простейших выявляют в различных биологических материалах, взятых от больного, в частности:

- фекалиях - их исследуют в день дефекации (обычно доставляют в лабораторию утром), причем вегетативные подвижные формы дизентерийной амебы выявляют не позднее 20 мин после дефекации, а вегетативные формы других простейших (лямблий, дизинтамеб) исследуют в течение первых 1-1,5 ч после дефекации;
- крови - ее доставляют в лабораторию в стерильных пробирках (для серологических исследований) или в виде мазков и препарата толстой капли для исследования на малярию.

Микроскопический метод - основной метод диагностики протозойных инвазий, микроскопируют мазки, окрашенные по Романовскому-Гимзе, Райту и др. Иногда применяют серологический, аллергологический, биологический и молекулярно-генетический (ПЦР и др.) методы диагностики.

Для диагностики микозов используют микроскопический, гистологический микологический, серологический и молекулярно-генетические методы.

Микроскопический метод основан на выявлении возбудителя в неокрашенных и окрашенных препаратах исследуемого клинического материала. Исследуют соскобы кожи, ногтей, отделяемое покровных тканей, пунктаты абсцессов, отделяемое пазух носа, биологические жидкости (мокроту, бронхоальвеолярную жидкость, мочу, спинномозговую жидкость, желчь) и др. Рассмотрению элементов гриба в препаратах

мешают различные компоненты ткани, поэтому на исследуемый материал (соскобы кожи), помещенный на предметное стекло, наносят 1-3 капли 10-20% раствора NaOH или KOH и через 15 мин слегка придавливают покровным стеклом. Щелочь разрушает ткань (просветляет ее), способствуя выявлению элементов гриба. Для ускорения этого процесса препарат прогревают на пламени до появления паров. Пораженные волосы и соскобы ногтей обрабатывают аналогичным способом 20-30% щелочью в течение 1-3 ч.

Микроскопию окрашенных препаратов применяют при исследовании соскобов грануляций, отделяемого язв и свищей, реже при изучении соскобов кожи и ногтей для выявления элементов гриба. Препараты окрашивают по Граму, Романовскому-Гимзе, Цилю-Нельсену, акридиновым оранжевым и другими методами.

Гистопатологические препараты чаще применяют при изучении глубоких микозов в лабораториях с особым режимом работы (с опасными патогенами).

Культуральный метод (посев на питательную среду) применяют для выделения чистой культуры при комнатной температуре. Диморфные грибы при комнатной температуре образуют мицелий, а при температуре 37 °С (температуре тела человека) - дрожжеподобные клетки. Для культивирования грибов рода *Candida* и дерматофитов применяют среду Сабуро, а для гифальных (плесневых) - среду Чапека. Часто в среды добавляют антибиотики. Культуры возбудителей глубоких микозов из-за их высокой контагиозности получают только в специализированных клиничко-лабораторных центрах.

Серологический метод. В сыворотке крови больных обнаруживают антитела с помощью РП, ИФА и др. Перспективно также при этом определение антигенов грибов.

Среди молекулярных методов наиболее распространены ПЦР и газожидкостная хроматография.

10.2. СБОР, ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВКА МАТЕРИАЛА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

В большой степени результаты микробиологического исследования зависят от соблюдения правил забора материала. Нарушение правил забора, неправильная и несвоевременная доставка материала в лабораторию отрицательно влияют на результаты исследования.

Вид материала для исследования определяется клинической картиной заболевания. Основные правила взятия материала включают следующие положения.

- Материал по возможности берут непосредственно из очага инфекции.
- Материал берут до начала лечения антибиотиками и исключают возможность попадания в него антибактериальных препаратов.
- Взятие материала необходимо проводить в асептических условиях:
 - кровь берут из локтевой вены после тщательной обработки кожи 70% этанолом с последующим протиранием места укола раствором йода;
 - при заборе мокроты больной должен почистить зубы и прополоскать рот слабым раствором антисептика;
 - перед забором мочи необходимо провести тщательный туалет наружных половых органов с мылом и кипяченой водой.
- После взятия материал нужно в кратчайшие сроки доставить в лабораторию, соблюдая условия хранения и транспортировки (табл. 10.1). Оптimalен первичный посев в месте взятия материала. Доставляют материал в специальных контейнерах, биксах, сумках-холодильниках. Необходимо учитывать, что при длительном хранении происходят гибель наиболее требовательных к условиям культивирования микроорганизмов и размножение менее требовательной сопутствующей микрофлоры.

- При взятии материала необходимо строго соблюдать меры безопасности при работе с клиническим материалом для микробиологического исследования.

- Материал забирают в достаточном количестве, обеспечивающем необходимый для исследования объем. К исследуемому материалу, направляемому в лабораторию, прилагают сопроводительный документ, в котором указывают фамилию, имя, отчество больного, время взятия материала, предполагаемый диагноз.

Таблица 10.1. Забор, хранение и транспортировка материала для микробиологического исследования

Материал для исследования	Условия хранения	Условия транспортировки
Кровь (10-30 мл венозной крови)	Не более 2 ч при комнатной температуре	Стерильные транспортные емкости со средой, содержащей нейтрализаторы антибиотиков, или в шприце (5-10 мл крови, перемешанной с гепарином)
Спинномозговая жидкость	При температуре 37 °С, избегая охлаждения (≤ 15 мин)	В стерильных пробирках с завинчивающейся крышкой или в шприце, на иглу которого воткнута стерильная резиновая пробка
Мокрота	В холодильнике 2-3 ч при температуре 4 °С	В стерильной одноразовой емкости с завинчивающейся крышкой для сбора мокроты
Гнойное отделяемое	Не более 2 ч при комнатной температуре	Стерильная сухая пробирка или емкость с транспортной средой, в которую вмонтирован одноразовый зонд-тампон. Стерильная транспортировочная емкость со средой для анаэробов. Шприц, на обработанную 70% спиртом иглу которого воткнута стерильная резиновая пробка
Моча (средняя порция утренней, свободно выпущенной мочи)	Не более 2 ч при комнатной температуре и не более 8 ч в холодильнике при температуре 4 °С	В стерильной одноразовой емкости с завинчивающейся крышкой для сбора мочи

Окончание табл. 10.1

Материал для исследования	Условия хранения	Условия транспортировки
Фекалии	Не более 2 ч при температуре 4 °С в холодильнике	В пробирках с консервирующим раствором или в стерильной одноразовой емкости с завинчивающейся крышкой

Желчь	Не более 2 ч при температуре 37 °С	Пробирки с фракциями желчи необходимо держать в строго вертикальном положении
-------	------------------------------------	---

Вопросы для самоконтроля

1. Назовите метод микробиологической диагностики, позволяющий установить вид возбудителя.
2. Назовите метод диагностики, позволяющий обнаружить возбудителя в исследуемом материале без выделения чистой культуры.
3. Стадию заболевания и течение инфекционного процесса можно определить, используя ...
4. Основной метод диагностики протозойных инвазий - ...

ЧАСТЬ II. ЧАСТНАЯ МЕДИЦИНСКАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ

МОДУЛЬ 11. ВОЗБУДИТЕЛИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ: ОСНОВНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, ПРИНЦИПЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Цели модуля

- Знать: этиологическую структуру, основные свойства и методы исследования бактериальных кишечных инфекций.
- Уметь: подбирать материал для исследования и методы исследования для микробиологической диагностики.
- Владеть: методами оценки результатов проведенных исследований.

Этиологическая структура бактериальных кишечных инфекций включает возбудителей острых кишечных инфекций (брюшного тифа, шигеллезов, кишечных эшерихиозов, сальмонеллезов), холеры, иерсиниозов (кишечного и псевдотуберкулеза), кампилобактериоза, хеликобактер-инфекции, лептоспироза, листериоза, ботулизма.

11.1. ДИАГНОСТИКА ОСТРЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Возбудителей острых кишечных инфекций (ОКИ) относят к семейству *Enterobacteriaceae*, родам *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*. Все они представляют морфологически неразличимые грамотрицательные палочки, не образующие спор и капсул, поэтому бактериоскопический метод исследования для диагностики не применяют.

Серологический метод исследования используют при диагностике брюшного тифа, паратифов и в качестве вспомогательного при сальмонеллезе и шигеллезах.

Основной метод диагностики ОКИ - бактериологический. Материал для бактериологического исследования определяется патогенезом заболевания, основу которого составляет характер взаимодействия возбудителя с эпителием кишечника (табл. 11.1, 11.2).

Таблица 11.1. Дифференцирующие свойства возбудителей острых кишечных инфекций

Возбудитель	Заболевания	Материал для исследования	Метод исследования	Дифференциация			Внутриродовая идентификация
				Глю	Лак	H ₂ S	
Диареогенные кишечные палочки (ЭПКП, ЭТКП, ЭГКП, ЭИКП)	Кишечный эшерихиоз	Испражнения, кровь (при колисепсисе, вызванном ЭПКП)	Бактериологический	КГ	КГ	—	По антигенной структуре
<i>Shigella</i>	Шигеллезы	Испражнения	Бактериологический	К	—	—	По антигенной структуре и

							способности утилизироват ь маннит
<i>S. Typhi</i> <i>S. Paratyhi A.B</i>	Брюшной тиф, паратифы	Кровь, желчь, испражнени я, моча, костный мозг, сыворотка	Бактериологическ ий. Серологический	К(г)	—	+	По антигенной структуре
<i>S. enteritidis</i> и другие серовары зооантропонозн ых сальмонелл	Сальмонелл ез	Испражнени я, рвотные массы, кровь, желчь, сыворотка	Бактериологическ ий. Серологический	К(г)	—	+	По антигенной структуре

Примечания: Глю - ферментация глюкозы; Лак - ферментация лактозы; H₂S - продукция сероводорода; К - образование кислоты; Г - газа; (г) - вариабельное образование газа ЭПКП, ЭТКП, ЭГКП, ЭИКП.

Как видно из таблице 11.1, материалами для исследования при ОКИ являются кровь, испражнения, рвотные массы, желчь, моча, а также костный мозг. При взятии материала следует придерживаться следующих правил.

- Материал берут до начала антибиотикотерапии или через промежуток времени после введения ЛС, необходимого для его выведения из организма.

- Материал собирают в стерильную посуду:

- шприцы стерилизуют в автоклаве;

- судна для испражнений дезинфицируют хлорной известью (использование растворов карболовой кислоты или лизола недопустимо), а затем тщательно промывают горячей водой для полного удаления дезинфектанта;

- транспортировку материала в лабораторию осуществляют в стерильной посуде. В настоящее время выпускают стерильные емкости одноразового использования для забора и транспорта мочи, кала, желчи, рвотных масс.

- Материал немедленно доставляют в лабораторию; он может храниться не более 2 ч в холодильнике при температуре 2-4 °С.

Таблица 11.2. Механизмы взаимодействия возбудителей острых кишечных инфекций с кишечным эпителием

Тип взаимодействия	Возбудители	Факторы патогенности, обеспечивающие процесс взаимодействия
1-й тип - адгезия, размножение (колонизация) на поверхности эпителия тонкой кишки без повреждения эпителия, без инвазии	<i>V. cholerae</i> . ЭТКП (энтеротоксигенные кишечные палочки)	Поверхностные структуры - токсинопосредованные пили <i>V. cholerae</i> . Факторы колонизации - CFA/1, CFA/2

2-й тип - размножение на поверхности эпителия тонкой и толстой кишки с разрушением микроворсинок, повреждением апикальной поверхности эпителия	ЭПКП (ограниченно инвазивные цитотоксические кишечные палочки). ЭГКП (энтерогеморрагические кишечные палочки)	Интимин, продукты секреторной системы 3-го типа. Шигаподобные токсины
--	--	---

Окончание табл. 11.2

Тип взаимодействия	Возбудители	Факторы патогенности, обеспечивающие процесс взаимодействия
3-й тип - внедрение и размножение в эпителиальных клетках слизистой оболочки стенки толстой кишки, размножение бактерий в эпителии, цитотоксическое повреждение и гибель эпителиоцитов	<i>Shigella</i> . ЭИКП (энтероинвазивные кишечные палочки)	Ира В,С,Д. Контактный гемолизин (детерминируются плазмидой 140 МД). Шига и шигаподобные токсины
4-й тип - транцитоз эпителия через М-клетки с инфицированием пейеровых бляшек с последующим размножением в фагоцитах	<i>Salmonella</i> . <i>Yersinia</i>	Инвазин - белок наружной мембраны. Продукты секреторной системы 3-го типа

Основные этапы бактериологического исследования. Применяемые питательные среды

Питательные среды, используемые при диагностике ОКИ, представлены в таблице 11.3.

Таблица 11.3. Питательные среды, используемые при диагностике кишечных инфекций

Среда	Назначение	Этап бактериологического исследования	Материал для посева	Дифференцирующий признак
Желчный бульон	Среда обогащения	Предварительный	Кровь	Отсутствует
Селенитовый бульон	Среда обогащения	Предварительный	Фекалии, желчь, рвотные массы	Отсутствует

Окончание табл. 11.3

Среда	Назначение	Этап бактериологического исследования	Материал для посева	Дифференцирующий признак
Агар Плоскирева	Выделение возбудителя и	1-й этап	Пересев со сред обогащения.	Сбраживание лактозы: лаК ⁺ /

	первичная идентификация		Прямой посев испражнений, желчи, мочи, рвотных масс	лак-
Среда Эндо	-//-//-//-	-//-//-//-	-//-//-//-	-//-//-//-
Среда Левина	-//-//-//-	-//-//-//-	-//-//-//-	-//-//-//-
Висмут-сульфитный агар	Для выделения сальмонелл	-//-//-//-	-//-//-//-	Продукция H ₂ S
Среда Клигlera	Накопление чистой культуры и вторичная предварительная идентификация до рода	2-й этап	Пересев подозрительных лактозоотрицательных или агглютинирующих эшерихиозной ОК-сывороткой лактозопозитивных колоний, выросших на средах 3-5, и темных колоний со среды 6	Продукция H ₂ S, газообразование при сбраживании глюкозы. Сбраживание лактозы: H ₂ S+/H ₂ S-, лаK ⁺ /лак-
Система дифференциально-диагностических сред наборов «Энтеротест»	Идентификация до рода и вида	3-й этап	Материал со среды Клигlera	Совокупность дифференцирующих биохимических признаков семейства

Основные этапы бактериологического исследования ОКИ представлены на рисунке. 11.1.

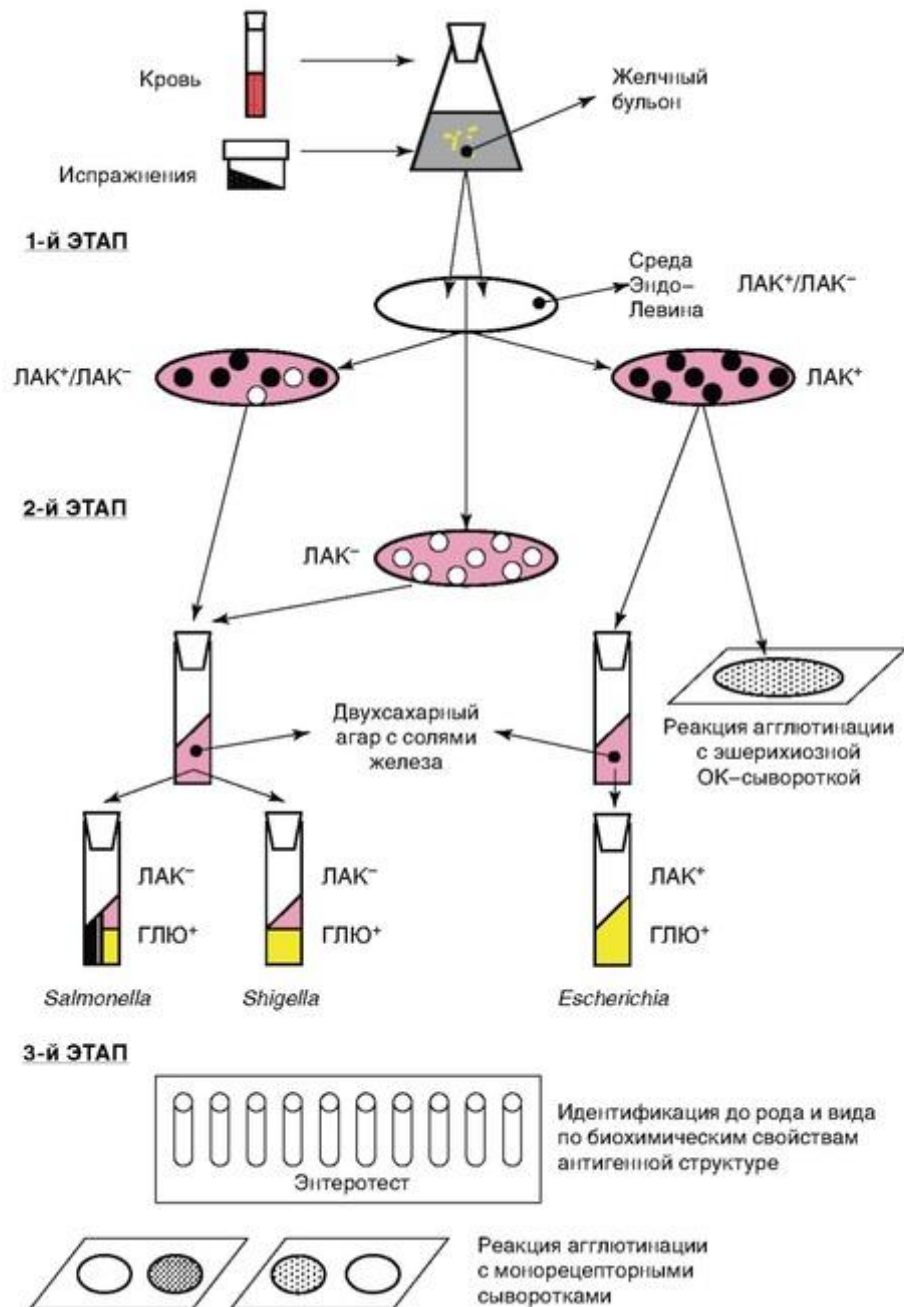


Рис. 11.1. Основные этапы бактериологического исследования острых кишечных инфекций

Предварительный этап включает посев исследуемого материала на среды обогащения. Этот этап обязателен, если материалом является кровь, и при исследовании других материалов (испражнений, желчи, мочи, костного мозга) на бактерионосительство.

В качестве сред обогащения используют следующие.

- 10% желчный бульон - для посева крови как материала, не содержащего постороннюю микрофлору.
- Селенитовый бульон - для посева материала, содержащего постороннюю микрофлору (испражнения, рвотные массы, желчь).

— Кровь засевают в среду обогащения в соотношении 1:10 для разбавления бактерицидных субстанций крови, в 50-100 мл среды в колбе на 250 мл.

- Желчь засевают в соотношении 1:10 в колбы, содержащие 50 мл среды.
- Испражнения вносят в среду в соотношении 1:5.
- Рвотные массы засевают в соотношении 1:1 в среду с удвоенной концентрацией.

— Мочу засевают в среду с удвоенной концентрацией в соотношении 1:1.

Посевы инкубируют в среде обогащения не более 18 ч (кроме крови и желчи). Кровь инкубируют в течение 10 сут, делая высев на плотные среды на 2-е и 3-и сутки, в случае отрицательного результата высева повторяют на 6-е и 10-е сутки.

По окончании срока инкубации на среде обогащения проводят посев на электро-дифференциальные среды для выделения возбудителя.

- 1-й этап исследования. Проводят пересев со среды обогащения или прямой посев (испражнений, рвотных масс, желчи, мочи и др.) для выделения отдельных колоний и проведения первичной дифференциации на электро-дифференциальные среды.

- Учитывая биохимические различия между возбудителями ОКИ (табл. 11.4), на этом этапе проводят посев на лактозосодержащие среды - Эндо, Левина, Плоскирева и др.

- При целенаправленном выделении сальмонелл посев проводят на висмут-сульфитный агар и агар с бриллиантовым зеленым.

- Высокоэлектро-дифференциальная лактозосодержащая среда для выделения сальмонелл и шигелл - агар Плоскирева, который содержит желчные кислоты, бриллиантовый зеленый, подавляющие рост грамположительной микрофлоры и сдерживающие рост эшерихий. Слабоэлектро-дифференциальные среды - дифференциально-диагностические среды Эндо, Левина.

- Дифференцирующий субстрат в средах Эндо, Левина, Плоскирева - лактоза, по отношению к которой различают лактозонегативные бесцветные (сальмонеллы, шигеллы) и окрашенные колонии, лактозоположительные колонии (эшерихии).

- 2-й этап исследования предусматривает накопление чистой культуры возбудителя и предварительную дифференциацию его до рода. Для этого проводят посев подозрительных (лактозонегативных и лактозопозитивных колоний, агглютинирующихся эшерихиозной ОК-сывороткой) на среду Клигlera. Предварительную дифференциацию на среде Клигlera проводят на основании способности бактерий продуцировать сероводород, образовывать газ при расщеплении глюкозы и ферментировать лактозу. Состав и принцип действия среды Клигlera рассмотрены ниже.

- 3-й этап исследования включает окончательную идентификацию выделенного возбудителя ОКИ до рода и вида. Для этого обязательно проводят биохимическую идентификацию выделенной чистой культуры с помощью энтеротестов или набора дифференциально-диагностических сред и определение антигенной структуры возбудителя. При необходимости определяют чувствительность выделенной чистой культуры возбудителя.

- 4-й этап исследования включает внутривидовую идентификацию выделенного возбудителя ОКИ в целях обнаружения источника инфекции и эпидемиологического маркирования.

Таблица 11.4. Биохимическая идентификация возбудителей острых кишечных инфекций

Биохимический признак	<i>Escherichia</i>	<i>Shigella</i>	<i>Salmonella</i>
Продукция индола	+	+/-	—

Продукция сероводорода	—	—	+
Утилизация цитрата	—	—	+
Продукция лизиндекарбоксилазы	+	—	+
Гидролиз мочевины	—	—	—
Ферментация лактозы	+	—	—
Ферментация глюкозы	КГ	К	К(г)

Примечания: К - образование кислоты; Г - газа; (г) - вариабельное образование газа.

11.1.1. Диагностика брюшного тифа и паратифов

Брюшной тиф и паратифы А и В - острые кишечные инфекции, сходные по патогенезу и клиническим проявлениям, характеризующиеся циклическим течением, поражением лимфатического аппарата тонкой кишки, мезентериальных лимфатических узлов, паренхиматозных органов, бактериемией. Клинически протекают с выраженной интоксикацией, развитием энтерита и сыпью.

Возбудителей брюшного тифа и паратифов относят к роду *Salmonella*, семейству *Enterobacteriaceae*, виду *S. enterica*, сероварам *S. Typhi*, *S. Paratyphi A* и *S. Paratyphi B*.

Патогенез характеризуется циклическостью течения. Возбудитель попадает через рот, достигает тонкой кишки, где размножается в ее лимфатических образованиях, из которых попадает в кровь (стадия бактериемии). С током крови разносится по всему организму, оседая в паренхиматозных органах (селезенке, печени, легких, костном мозге). Из печени сальмонеллы попадают в желчный пузырь, где могут сохраняться годами, а из него вновь в тонкую кишку. В результате повторного попадания сальмонелл в лимфоидный аппарат тонкой кишки развивается аллергическая реакция, проявляющаяся в форме воспаления и некроза лимфатических образований. Из организма сальмонеллы выводятся в основном с калом и мочой.

С учетом развития инфекционного процесса при брюшном тифе и паратифах возбудитель выделяют:

- на 1-й неделе - из крови (гемокультура);
- с конца 2-3-й недели - из испражнений (копрокультура);
- с конца 2-й недели - из мочи (уринокультура);
- из желчи - начиная с 2-й недели заболевания, в течение всего периода заболевания.

Начиная с 2-й недели заболевания параллельно проводят серологическое исследование.

Правила взятия крови для получения гемокультуры.

- Кровь для посева следует брать в начале озноба при подъеме температуры тела.
- Кровь берут в объеме 5-10 мл из локтевой вены.
- Перед забором крови поверхность кожи обрабатывают спиртовым раствором йода или спиртом.
- Посев рекомендуют проводить непосредственно после взятия крови в 50-100 мл среды обогащения, налитой в колбу объемом 250 мл.

- При невозможности посева сразу после взятия кровь помещают в стерильную пробирку, содержащую антикоагулянт, и транспортируют в лабораторию. Хранить материал можно не более 2 ч в холодильнике при температуре 4 °С. Далее исследование проводят, как описано выше.

Правила забора испражнений у больных брюшным тифом, паратифами и сальмонеллезом для получения копрокультуры.

- Посев испражнений для выделения сальмонелл проводят из жидкой части.
- Посев испражнений можно проводить прямым способом - на плотные среды и среды обогащения.

— Для прямого посева небольшое количество испражнений размешивают в физиологическом растворе, оставляют на 30 мин для оседания крупных частиц. С поверхности берут одну каплю материала, которую засевают на элективные среды для выделения сальмонелл - агар Плоскирева, висмут-сульфитный агар (при диагностике сальмонеллеза - на агар с бриллиантовым зеленым).

— Посев на селенитовый бульон (как на среду обогащения) обязателен при обследовании на бактерионосительство.

Рекомендуемая ВОЗ схема выделения возбудителя при брюшном тифе и паратифах представлена на рисунке 11.2.

В связи с тем что по основным биохимическим свойствам представители рода *Salmonella* однотипны, дифференциацию внутри рода проводят по антигенной структуре. Сальмонеллы обладают соматическим О-антигеном, жгутиковым Н-антигеном. Некоторые сальмонеллы обладают К-антигеном. Согласно классификации по Кауфману-Уайту, сальмонеллы подразделяют на серологические группы по общности строения О-антигена и внутри серогруппы - на серовары в соответствии с различиями в строении Н-антигена (табл. 11.5). Некоторые серовары сальмонелл, в частности *S. Typhi*, имеют полисахаридный Vi-антиген, являющийся разновидностью К-антигена. Этот антиген является рецептором для бактериофагов. Установление фаговара *S. Typhi* необходимо для эпидемиологического анализа вспышек брюшного тифа в целях определения источника инфекции. Идентификацию выделенной чистой культуры проводят постановкой реакции агглютинации на стекле: сначала с поливалентной сальмонеллезной сывороткой, затем с монорецепторными адсорбированными О-сыворотками для установления серогруппы, затем с адсорбированными монорецепторными Н-сыворотками для установления серовара.

Выделение и идентификация *S. Typhi*

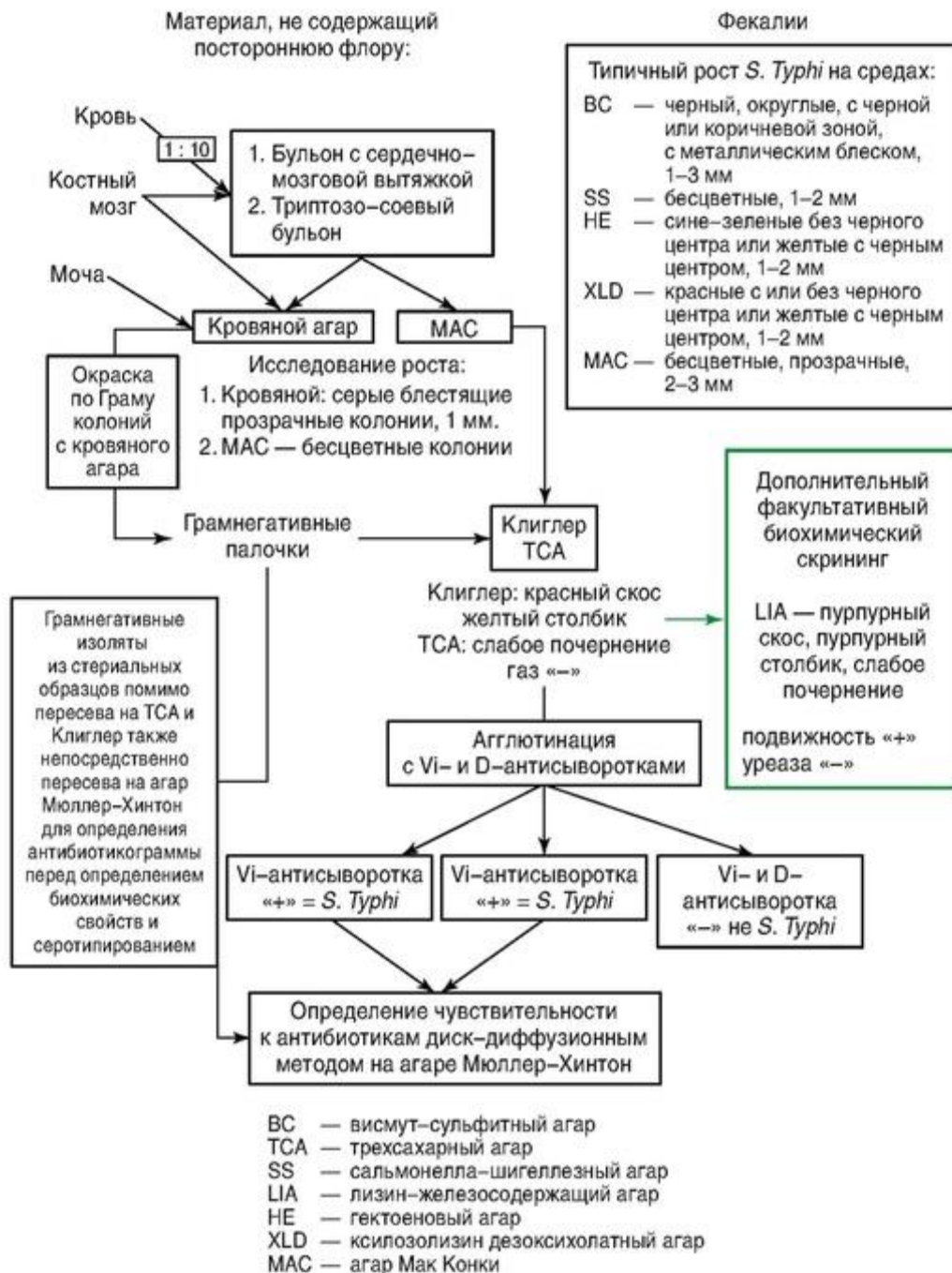


Рис. 11.2. Рекомендуемая ВОЗ схема выделения возбудителя при брюшном тифе и паратифах

Таблица 11.5. Классификация сальмонелл по антигенной структуре по Кауфману-Уайту

Серовар	Серогруппа	Антиген		
		O	H	
			фаза 1	фаза 2
<i>S. Paratyphi A</i>	2(A)	1, 2, 12	a	—

<i>S. Derby</i>	4(B)	1, 4, 5, 12	<i>f, g</i>	1, 2
<i>S. Haifa</i>		1, 4, 5, 12	<i>Z10</i>	1, 2
<i>S. Paratyphi B</i>		1, 4, 5, 12	<i>b</i>	1, 2
<i>S. Typhimurium</i>		1, 4, 5, 12	<i>i</i>	1, 2
<i>S. Infants</i>	6, 7(C1)	6, 7	<i>R</i>	1, 5
<i>S. Choleraesuis</i>		6, 7	<i>c</i>	1, 5
<i>S. Paratyphi C</i>		6, 7 (vi)	<i>c</i>	1, 5
<i>S. Newport</i>	6, 8(C2)	6, 8	<i>eh</i>	1, 2
<i>S. Dublin</i>	9(D1)	1, 9, 12 (vi)	<i>g, p</i>	—
<i>S. Enteritidis</i>		1, 9, 12	<i>g, m</i>	—
<i>S. Panama</i>		1, 9, 12	<i>e, v</i>	1, 5
<i>S. Typhi</i>		9, 12 (vi)	<i>d</i>	—
<i>S. Anatum</i>	3(E1)	3, 10	<i>ch</i>	1, 6

Серологическая диагностика брюшного тифа и паратифов основана на том, что к концу первой недели заболевания появляются антитела к О-антигену, которые достигают максимальных титров к разгару заболевания, а потом исчезают. Антитела к Н-антигену появляются в период реконвалесценции, а также у привитых лиц и длительно сохраняются. У бактерионосителей брюшного тифа обнаруживают антитела к Vi-антигену. Проводят постановку РПГА с диагностическим титром для О-диагностикумов - 1:200, для Vi-диагностикумов - 1:40. РПГА ставят согласно таблице 11.6 (ранее ставили развернутую реакцию агглютинации Видаля). Постановку Vi-РПГА используют для отбора лиц, подозрительных на бактерионосительство. При титрах 1:80 и выше этим лицам проводят многократные бактериологические исследования фекалий, мочи, желчи.

Таблица 11.6. Результаты серологического исследования сыворотки больного с предполагаемым диагнозом «брюшной тиф, паратифы»

Тип диагностикума	Разведение сыворотки						
	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	К
Эритроцитарный O ₂							
Эритроцитарный O ₄							
Эритроцитарный O ₉							
Эритроцитарный H _a							
Эритроцитарный H _b							
Эритроцитарный H							

11.1.2. Диагностика сальмонеллезов

Сальмонеллез - острая кишечная инфекция, вызываемая различными сероварами *S. enterica*, за исключением сероваров *S. Typhi*, *S. Paratyphi A* и *S. Paratyphi B*, характеризируемая преимущественным поражением желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) и протекающая чаще в виде локальной инфекции в форме гастроэнтерита, реже в виде генерализованных форм - тифоподобной и септикопиемической.

Лабораторную диагностику проводят бактериологическим и серологическим методами. Бактериологическому исследованию подвергают испражнения, рвотные массы, промывные воды желудка, желчь, костный мозг, кровь (при системных инфекциях), пищевые продукты. Выделение возбудителя из крови и костного мозга проводят аналогично исследованиям при диагностике брюшного тифа. При исследовании испражнений, рвотных масс, желчи посев делают непосредственно на среды для выделения сальмонелл (висмут-сульфитный агар, ВГА-агар, гектоенный агар, агар Плоскирева) и среду накопления (селенитовый бульон и среду Раппопорта-Вассилиадиса). Далее исследования проводят по общей схеме. Серологическое исследование проводят постановкой РПГА.

11.1.3. Диагностика шигеллезов

Бактериальная дизентерия, или шигеллез, - инфекционное заболевание с поражением толстой кишки, развитием колита и интоксикацией организма. Возбудители - бактерии рода *Shigella*:

- *Shigella dysenteriae* (группа А);
- *Shigella flexneri* (группа В);
- *Shigella boydii* (группа С);
- *Shigella sonnei* (группа D).

Шигеллы - мелкие грамтрицательные неподвижные палочки. Биохимически малоактивны: лактозу не расщепляют, расщепляют только до кислоты глюкозу; за исключением *Shigella dysenteriae*, другие виды расщепляют маннитол, сероводород не продуцируют. Наибольшей биохимической активностью обладает *Shigella sonnei* (табл. 11.7). Все шигеллы обладают соматическим О-антигеном, в зависимости от строения которого происходит подразделение на серовары, а *S. flexneri* внутри сероваров подразделяют на подсеровары. Серовароспецифические О-антигены *S. flexneri* детерминируются конвертирующими бактериофагами. *S. sonnei* обладает антигеном 1-й фазы, которая является К-антигеном. Все виды шигелл инвазируют слизистую оболочку толстой кишки с последующим межклеточным распространением. Эта способность связана с крупной плазмидой, которая детерминирует синтез чувствительных к трипсину белков-инвазинов и фактор распространения микроорганизма через межклеточные пространства. Кроме того, все шигеллы продуцируют белковые шига и шигаподобные цитотоксины, поражающие эндотелий, следствием чего является появление в кале крови.

Таблица 11.7. Биохимическая дифференциация внутри рода *Shigella*

Биохимический признак	<i>S. sonnei</i>	Другие виды шигелл
Продукция индола	—	В
Орнитиндекарбоксилаза	+	—
Расщепление раффинозы	—	В

Расщепление рамнозы	+	—
ОНФГ-тест	+	—

Примечание. В - вариабельно (+/-).

Лабораторную диагностику шигеллезов осуществляют бактериологическим методом. В соответствии с особенностями патогенеза (см. табл. 11.2) шигеллы локализуются в эпителиальных клетках толстой кишки, поэтому основным материалом для бактериологического исследования служат испражнения или материал толстой кишки, взятые с помощью ватно-марлевого тампона или ректальной петлей.

При сборе испражнений для выделения шигелл следует учитывать следующее.

- Шигеллы находятся главным образом в слизи и гное, поэтому отбирают пробы, содержащие слизь и гной.

- Первые порции кала представляют собой пробку в нижней части кишки, где микроорганизмы могли погибнуть, поэтому для посева отбирают последующие порции кала, происходящие из верхней части прямой и сигмовидной кишки.

- Для исследования не следует брать последние, жидкие порции испражнений, которые являются содержимым нижнего отрезка тонкой кишки.

- Прямой посев фекалий для выделения шигелл можно проводить только в том случае, если его выполняют непосредственно в палате, иначе в постоявших испражнениях возникают процессы брожения, обуславливающие кислую реакцию, при которой шигеллы гибнут.

Собранный материал доставляют в лабораторию в специальной транспортной среде или консервирующей смеси, которые наливают в стерильные пробирки в количестве 5-10 мл. Транспортной средой служат среды обогащения (20% желчный и селенитовый бульоны). Консервант - глицериновая смесь (химически чистый глицерин и изотонический раствор натрия хлорида). Объем вносимых испражнений не должен превышать 1/5 объема транспортных сред. После доставки в лабораторию в транспортной среде материал высевают на плотные селективно-дифференциальные среды.

Испражнения, доставленные в консерванте, хранят до посева при температуре 4 °С.

Правила посева испражнений для выделения шигелл.

- Посев осуществляют только шпателем.

- Посев осуществляют одновременно на несколько сред - Плоскирева, Эндо, Левина. Кроме того, для повышения высеваемости шигелл используют эти среды с добавлением антибиотиков [хлор-амфеникола (левомицетина^Δ), тетрациклина] в связи с циркуляцией штаммов, устойчивых к антибиотикам.

- Техника посева. Из материала, доставленного в транспортной среде, на поверхность плотной питательной среды наносят каплю суспензии, растирают шпателем. Шпатель, не прожигая, переносят на вторую и третью чашки, где делают равномерный посев. Поскольку увеличение количества исходного материала повышает шансы высева, можно провести первоначальное растирание материала на площади малого размера, а затем, не прожигая шпатель, размазать остатки по остальной поверхности. Для второй и третьей чашек в этом случае берут каждый раз новый материал.

Изолирование и идентификация возбудителя шигеллеза из испражнений



Рис. 11.3. Рекомендуемая ВОЗ схема выделения чистой культуры шигелл

- При прямом посеве испражнений крупной петлей отбирают кусочки слизисто-гнойно-кровяных образований фекалий, промывают в двух чашках Петри, содержащих стерильный физиологический раствор, переносят на поверхность плотной питательной среды и проводят посев. Чашки с посевами инкубируют при температуре 37 °C в течение 18-24 ч.

Рекомендуемая ВОЗ схема выделения чистой культуры шигелл представлена на рисунке 11.3.

11.1.4. Диагностика кишечного эшерихиоза

Кишечные эшерихиозы - острые инфекционные болезни, характеризующиеся поражением ЖКТ. Возбудители - диареогенные *E. coli*.

Диареогенные эшерихии неоднородны, их подразделяют на несколько подгрупп, которые различаются по особенностям экологии, путям передачи, особенностям

патогенеза и клинического проявления вызываемого ими заболевания, что обусловлено различиями в наличии факторов патогенности и их генетической детерминации. В пределах каждой подгруппы имеется определенный состав О-серогрупп или О:Н-сероваров (табл. 11.8). Именно по составу О-серогрупп и проводят первичную дифференциацию диареогенных эшерихий.

Таблица 11.8. Классификация энтеровирулентных (диареогенных) *E. coli*

Категория <i>E. coli</i>	Наиболее частые серогруппы по О-антигену	Основные факторы патогенности
ЭПЭК	O55, O86, O111, O119, O125ac, O126, O127, O128, O142	Пили 4-го типа (Vfp), интимин, эффекторные белки ТТСС
ЭТЭК	O6, O8, O11, O15, O20, O25, O27, O78, O128, O148, O149, O159, O173	Факторы колонизации (CF), термолабильный (LT) и термостабильный (ST) энтеротоксины
ЭИЭК	O28ac, O29, O112ac, O124, O136, O143, O144, O152, O159, O164, O167	Ipa-BDC-антигены, белок VirG

Окончание табл. 11.8

Категория <i>E. coli</i>	Наиболее частые серогруппы по О-антигену	Основные факторы патогенности
ЭГЭК	O26, O55, O111ab, O113, O117, O157	Интимин, эффекторные белки ТТСС, шигаподобные токсины, серинпротеаза, гемолизин
ЭАЭК	O3, O15, O44, O86, O77, O111, O127	Формирующие биопленку фимбриальные адгезины (AAF) и белок дисперзин, энтеротоксины - термостабильные (ЭАСТ-1), Pet, Pic

Лабораторную диагностику проводят обычным бактериологическим методом. Материал для исследования - испражнения, рвотные массы, которые засевают на лактозосодержащие дифференциальные среды. Поскольку в состав микрофлоры кишечника входит кишечная палочка, после 18 ч инкубации отбирают те колонии, которые агглютинируются поливалентной агглютинирующей ОВ-сывороткой, дифференцируют их до вида по биохимическим свойствам, а определение серогруппы и серовара проводят реакцией агглютинации на стекле с адсорбированными монорецепторными сыворотками.

11.2. ДИАГНОСТИКА ХОЛЕРЫ

Возбудитель холеры - *Vibrio cholerae* - грамтрицательная мелкая изогнутая палочка. Спор и капсул не образует, имеет один жгутик (монотрих), придающий микроорганизму подвижность. Факультативный анаэроб, с преимущественным аэробным способом культивирования, растет на средах с низким содержанием питательных веществ (например, 1% пептонной воде), слабощелочной реакции. Появление пленки на жидких средах наблюдается через 6 ч. Колонии на плотной среде TCBS образуются через 18-24 ч. Ферментативная активность высокая.

Антигенная структура *Vibrio cholerae* сложная. Н-антиген - общий для всего рода *Vibrio*, по О-антигену микроорганизмы разделяют на серогруппы. Возбудители холеры - представители групп О₁ и О₁₃₉.

По биологическим свойствам *Vibrio cholerae* разделяют на два биовара - *eltor* и *classic*. В серогруппу О₁ входят два варианта - *eltor* и *classic*, в серогруппу О₁₃₉ входит вариант *Bengal*, являющийся генетическим дериватом варианта *eltor*, с измененной антигенной структурой, по фенотипу близкий к *eltor*. В серогруппе О₁ выделяют три серовара в зависимости от сочетания А-, В- и С-субъединиц: Огава (АВ), Инаба (АС) и Гикошима (АВС).

Факторы патогенности холерных вибрионов - холерный энтеротоксин, нейраминидаза и гемагглютининпротеаза. Холерный энтеротоксин нарушает водно-солевой обмен, при этом происходит гиперсекреция воды и хлоридов в просвет кишечника, что вызывает обезвоживание организма за счет диареи и рвоты.

Лабораторную диагностику проводят бактериологическим методом, а также экспресс-методами с помощью РИФ и ПЦР.

Материалы для исследования - испражнения, рвотные массы, пищевые продукты, вода.

- В первый день исследования материал вносят в колбу с 50 мл 1% пептонной воды, инкубируют 6-8 ч при температуре 37 °С. На поверхности среды образуется пленка. Затем делают пересев на среду ТСBS (содержащую тиосульфат, цитрат, желчь, сахарозу) и щелочной агар.

- На второй день исследования отмечают появление на щелочном агаре прозрачных голубоватых колоний, на агаре ТСBS - желтоватых колоний с выпуклым центром. С подозрительными на холерные вибрионы колониями ставят ориентировочную реакцию агглютинации на стекле с холерными О₁- и О₁₃₉-сыворотками. Культуры, дающие положительные реакции, пересевают на полиуглеводную среду (среду Клиглера). Посев проводят уколом до дна и, извлекая петлю из агара (но не из пробирки), штрихом по скошенной поверхности.

- В третий день исследования делают мазки с полиуглеводной среды, окрашивают по Граму, изучают морфологию клеток, определяют грамтрицательные изогнутые палочки.

- На среде Клиглера:

- ◇ газ;

- ◇ Н₂S;

- ◇ розовый скол/желтый столбик.

- На среде ТСА (трехсахарный агар с солями железа):

- ◇ газ;

- ◇ Н₂S;

- ◇ желтый скол/желтый столбик.

Также ставят оксидазный тест, который у возбудителя холеры оценивают положительно. С оксидазоположительными культурами, дающими на полиуглеводной среде характерные для вибрионов изменения, ставят ориентировочную реакцию агглютинации с холерными О₁- и О₁₃₉-сыворотками в разведении 1:50. В положительном случае их изучают как подозрительные на принадлежность к *V. cholerae* О₁ и О₁₃₉. Если реакция агглютинации положительна с поливалентной О₁-антисывороткой, проводят реакцию агглютинации с сыворотками Огава и Инаба, определяя соответствующий

серовар. Также проводят фаготипирование по *Mukerjee* (классический холерный вибрион лизируется бактериофагами IV группы, а вибрион биовара *eltor* - бактериофагами V группы). Определяют чувствительность к антибиотикам диск-диффузионным методом.

• На четвертый день исследования определяют результаты антибиотикограммы. Рекомендуемая ВОЗ схема выделения возбудителя холеры представлена на рисунке 11.4. Для ускоренной диагностики холеры используют РИФ и ПЦР.

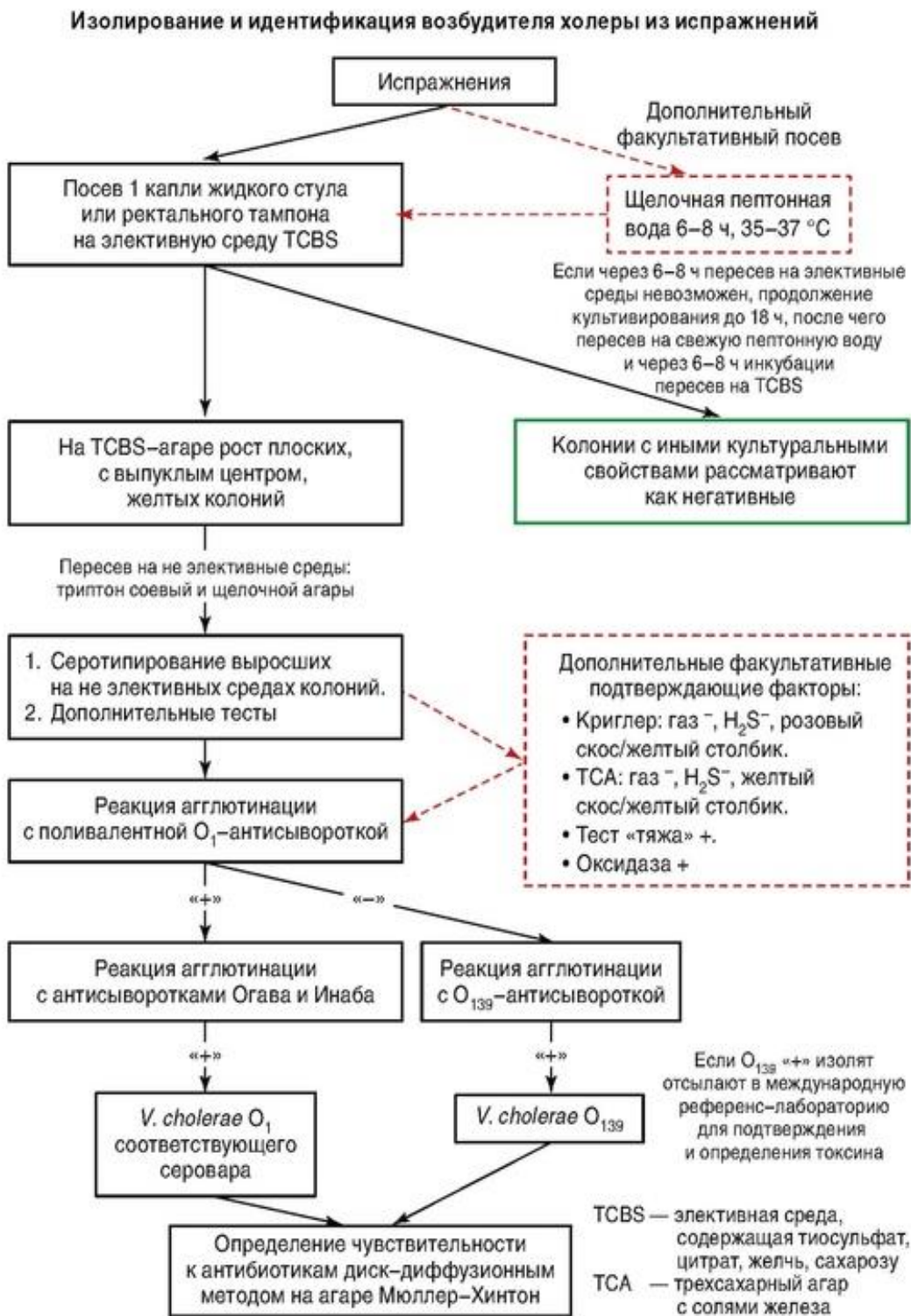


Рис. 11.4. Рекомендуемая ВОЗ схема выделения возбудителя холеры

11.3. ДИАГНОСТИКА ИЕРСИНИОЗОВ

Возбудители кишечного иерсиниоза и псевдотуберкулеза - энтеропатогенные иерсинии *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* соответственно. *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* различаются между собой по биохимическим свойствам и антигенной структуре (табл. 11.9) По строению О-антигена *Y. enterocolitica* подразделяют более чем на 20 сероваров, наиболее значимые из них - серовары О₃ и О₉. Этот вид по способности продуцировать индол и ферментировать трегалозу, эскулин и реакции Фогеса-Проскауэра подразделяют на 5 хемоваров. Вид *Y. pseudotuberculosis* является биохимически однородным. К питательным средам иерсинии не требовательны.

Таблица 11.9. Дифференциация видов внутри рода *Yersinia*

Вид	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i>
Заболевание	Кишечный иерсиниоз	Псевдотуберкулез
Подвижность при температуре 18 °С	+	+
Уреаза	+	+
Декстрин	—	—
Эскулин	-/+	—
Рамноза	—	+
Сахароза	+	—

Окончание табл. 11.9

Вид	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i>
Орнитиндекарбоксилаза	+	—
Продукция индола	-/+	—
Реакция Фогеса-Проскауэра	-/+	—

Иерсинии - сапронозы, их резервуаром в природе являются грызуны, домашние животные и птицы. Основной фактор передачи - овощи, которые могут быть инфицированы через корневую систему. Энтеропатогенные иерсинии обладают психрофильностью, оптимальная температура для их размножения - 22-25 °С. Они способны сохранять жизнеспособность в диапазоне температур от -15 до -25 °С; сохраняют способность к размножению при температуре 4 °С. У энтеропатогенных иерсиний существует температурная регуляция экспрессии факторов вирулентности. Гены, обеспечивающие начальные этапы инфекции, а именно транцитоз слизистой оболочки кишечника через М-клетки, функционируют только при температуре ниже 37 °С, поэтому инфекционное заболевание возникает только в случае, если микроорганизм перед попаданием в организм человека будет находиться минимум 3 сут при низкой температуре - 8-10 °С. В процессе нахождения в макроорганизме у энтеропатогенных иерсиний начинается синтез факторов патогенности, гены которых расположены на плазмиде и экспрессируются при температуре 37 °С:

- цитотоксина, повреждающего эпителий кишечника;
- V- и W-антигенов, которые обеспечивают энтеропатогенным иерсиниям возможность размножаться в фагоцитах и вызывать незавершенный фагоцитоз.

Сохранение и размножение в фагоцитах обеспечивают энтеропатогенным иерсиниям распространение по макроорганизму, поражение лимфоидного аппарата кишечника с развитием мезентерита, формирование очагов инфекции в различных тканях, что сопровождается развитием длительной персистенции микроорганизмов в макроорганизме и его аллергизацией.

Лабораторную диагностику псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза проводят бактериологическим и серологическим методами.

Бактериологический метод исследования

Материал для исследования. Основной материал - фекалии. Для исследования берут также аппендикулярные отростки, удаленные во время операции, смыв из зева и мочу.

Накопление возбудителя. Материал помещают в фосфатный буфер и инкубируют в холодильнике при температуре 4 °С в течение 7-28 сут. Каждые 3 сут проводят высеивание на плотные питательные среды. Этот этап получил название этапа холодного обогащения.

В качестве плотных сред используют лактозосодержащие среды Эндо, Левина, а также специальную среду Серова для выделения энтеропатогенных иерсиний. Среда Серова содержит питательный агар, глюкозу, молибденово-кислый аммоний (стимулятор роста иерсиний), генциановый фиолетовый, желчь (для подавления сопутствующей микрофлоры), мочевины и индикатор конго красный.

Выросшие на лактозосодержащих средах светлые (лактозонегативные колонии), а на среде Серова - уреазопозитивные колонии пересеивают на скошенный МПА для выделения чистой культуры, которую идентифицируют для определения вида иерсиний по биохимическим тестам и антигенной структуре, постановкой РА.

Серологический метод исследования

Для определения антител в сыворотке больного, начиная со второй недели заболевания в динамике, ставят развернутую реакцию агглютинации для определения нарастания количества антител. Диагностический титр - 1:200.

В более ранние сроки исследование проводят постановкой РНГА. Диагностический титр реакции - 1:100. РНГА ставят с интегральным псевдотуберкулезным эритроцитарным диагностикумом и эритроцитарными диагностикумами из *Y. enterocolitica*, O₃, O₉.

С помощью ИФА определяют в сыворотке IgM и IgG. Наличие IgM свидетельствует об острой фазе процесса.

11.4. ДИАГНОСТИКА КАМПИЛОБАКТЕРИОЗА

Возбудители кампилобактериоза - бактерии рода *Campylobacter*: *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. fetus*, *C. intestinalis*.

Кампилобактерии - тонкие, спирально изогнутые палочки, спор и капсул не образуют. Могут иметь S-образную форму или располагаться попарно в виде крыльев чайки; монотрихи.

Микроаэрофилы не ферментируют сахара, обладают окислительным метаболизмом. Растут при пониженном парциальном давлении кислорода на сложных питательных средах с добавлением антибиотиков для подавления сопутствующей микрофлоры: грамотрицательной - полимиксина; грамположительной - ванкомицина; грибов - амфотерицина.

Факторы патогенности - эндо- и экзотоксин (энтеро- и цитотоксин).

Заболевание протекает в виде энтероколита, у иммунодефицитных лиц - в виде системной инфекции. Род *Campylobacter* включает 16 видов. Среди них выделяют термочувствительный вид *C. intestinales*, который не растет при температуре 42 °С, резистентен к полимиксину и способен вызвать системную инфекцию у иммунодефицитных лиц. Большинство видов являются терморезистентными, способными расти при температуре 42 °С. Среди них отмечена адаптация к определенным видам животных. Так, *C. jejuni*, наиболее частый возбудитель энтероколитов у людей, выделяется от крупного рогатого скота, птицы; *C. coli* - от свиней, *C. lari* - из устриц. Источник инфекции - домашние животные и птица. Передача возбудителя осуществляется фекально-оральным, водным алиментарным и контактно-бытовым путями.

Лабораторная диагностика. Основной метод диагностики - бактериологический (рис. 11.5).

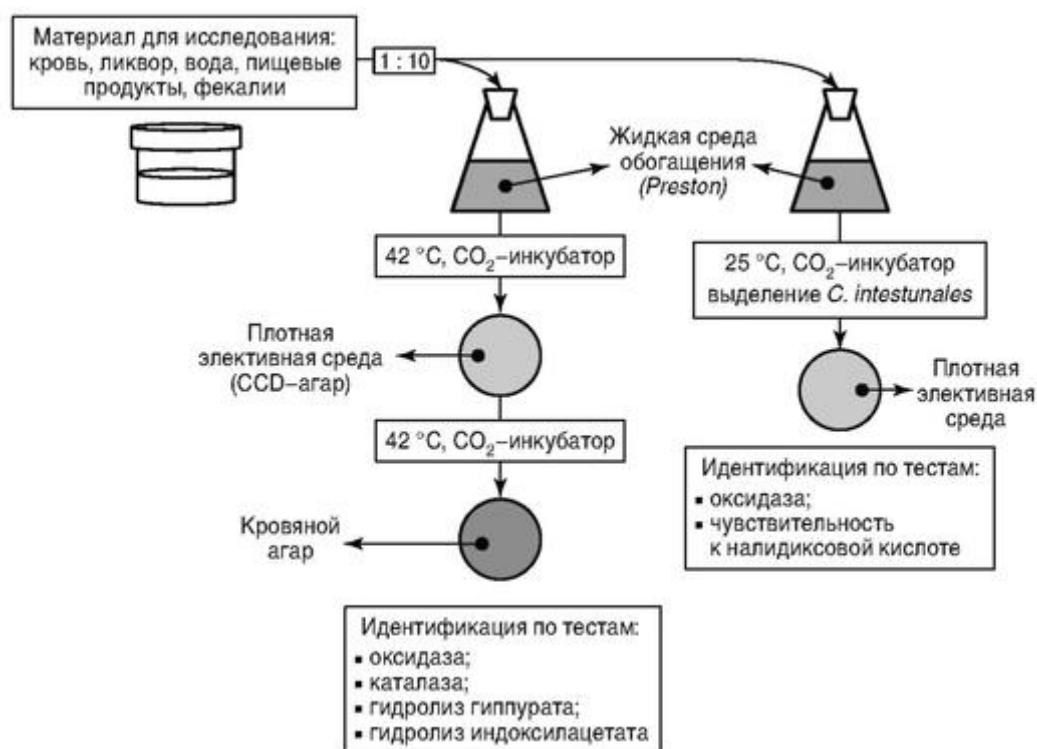


Рис. 11.5. Лабораторная диагностика кампилобактериоза

Для исследования берут материал от больного - кровь, спинномозговую жидкость, испражнения, промывные воды желудка, продукты питания, воду. Материал для исследования (кровь, спинномозговую жидкость, фекалии - при асимптоматическом течении инфекции и в неострый период, воду и продукты - при санитарно-бактериологическом исследовании) помещают в жидкую среду обогащения (среду *Preston*) в соотношении 1:10 и инкубируют при температуре 42 °С в CO₂-инкубаторе в течение 24-48 ч. Среда обогащения должна содержать FeSO₄, метасульфат, тиогликолят и пируват натрия, гематин, лизированную лошадиную кровь, набор антибиотиков. После этого, согласно рекомендациям ВОЗ, делают пересев на плотную селективную среду, например CCD-агар, который инкубируют при температуре 42 °С в CO₂-инкубаторе в течение 1-5 сут. Выросшие колонии пересевают на кровяной агар, после инкубации на котором в течение ночи при температуре 42 °С в CO₂-инкубаторе проводят межвидовую идентификацию по следующим тестам (табл. 11.10):

- на каталазу;
- на оксидазу;
- гидролизу гиппурата;

- гидролизу индоксил ацетата.

Таблица 11.10. Идентификация термофильных видов рода *Campylobacter*

Тест	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>
Каталаза	+	+	+
Оксидаза	+	+	+
Гидролиз гиппурата	+	—	—
Гидролиз индоксил ацетата	+	+	—

Внутривидовую идентификацию проводят постановкой ПЦР по праймерам *fla-гена*, определяющего синтез жгутиков.

Фекалии можно непосредственно высевать на CCD-агар или использовать метод мембранных фильтров, при котором 10-15 капель суспензии фекалий в физиологическом растворе (1 г фекалий в 1 мл физиологического раствора) наносят в стерильный ацетат-целлюлозный мембранный фильтр и помещают на 30-40 мин на поверхность плотной кровяной среды без антибиотиков. Фильтр удаляют и инкубируют в течение 1-2 сут при температуре 37-41 °С в микроаэрофильных условиях.

11.5. ДИАГНОСТИКА ХЕЛИКОБАКТЕР-ИНФЕКЦИИ

Хеликобактер-инфекция проявляется развитием гастритов и язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки.

Helicobacter pylori - грамтрицательные извитые бактерии, в мазках из патологического материала расположены в виде крыльев летящей чайки. Подвижны за счет пучка жгутиков, расположенном на одном из полюсов. Спор и капсул не образуют. Микроаэрофилы, растут на средах, содержащих белки, в течение 3-5 сут в атмосфере 5% CO₂.

Углеводы не разлагают. Обладают оксидазной и каталазной активностью, а также способностью разлагать мочевины (уреазной активностью).

Факторы патогенности хеликобактера - уреазы, способная нейтрализовать кислую среду желудка, а также жгутики, обеспечивающие проникновение в вязкий слой слизи. Цитотоксин, фосфолипаза повреждают эпителиоциты желудка. Антигенной активностью обладают уреазы и цитотоксин.

Источник инфекции - больной человек. Возбудитель выделяется с фекалиями и со слюной. Пути заражения-фекально-оральный и контактный. Часто заражение происходит в пределах одной семьи. Возможно заражение при эндоскопическом исследовании через медицинский инструментарий.

Микробиологическая диагностика. Исследуют биоптаты слизистой оболочки. Проводят микроскопию мазков-отпечатков, а также используют бактериологический метод. Биоптат слизистой оболочки засевают на кровяной агар. Возбудитель идентифицируют по морфологическим и культуральным свойствам, определяют чувствительность к антибиотикам.

Серологическая диагностика - определение антител к уреазе и цитотоксину *H. pylori* методом ИФА и иммунохроматографически.

Уреазный тест применяют в качестве экспресс-диагностики. Материал для исследования - гомогенат биоптата желудка, который помещают в пробирку с

питательной средой, содержащей мочевины и индикатор фенилрот. Исходный цвет среды - оранжевый. Инкубируют в термостате; через 30 мин, 1 и 2 ч проверяют изменение цвета среды. При положительной реакции цвет среды становится розовым.

Возможна постановка ПЦР.

11.6. ДИАГНОСТИКА ЛЕПТОСПИРОЗА

Лептоспироз - зоонозная инфекция, вызываемая различными сероварами вида *Leptospira interrogans*, характеризуемая лихорадкой, поражением капилляров печени, почек, центральной нервной системы (ЦНС).

Источник инфекции - дикие и домашние животные, инфицированные лептоспирами, которые выделяют лептоспиры с мочой, загрязняя окружающую среду. Больной человек не является источником инфекции. Заражение человека лептоспирами происходит водным, алиментарным (через зараженные продукты) и контактным (через поврежденную кожу и слизистые оболочки) путями.

Лабораторную диагностику лептоспироза осуществляют бактериологическим, биологическим, серологическим методами и ПЦР. Выбор метода диагностики и материала для исследования определяется стадией заболевания.

На 1-й неделе заболевания лептоспиры могут быть обнаружены бактериоскопически в крови и выделены из нее в чистой культуре. Со 2-й недели и до конца заболевания лептоспиры обнаруживают и выделяют из мочи. В период разгара заболевания лептоспиры можно обнаружить в спинномозговой жидкости.

При бактериологическом исследовании материал для исследования засевают в водно-сывороточную среду, которую инкубируют при температуре 28 °С в СО₂-инкубаторе. Рост лептоспир фиксируют микроскопией проб среды в темнопольном микроскопе.

Лептоспиры растут медленно, поэтому результат бактериологического исследования будет известен не ранее чем через 40 сут. В связи с этим ведущее место занимает серологический метод, при котором в крови выявляют антитела, а в биологических жидкостях - антигены лептоспир. «Золотой стандарт» - реакция микроагглютинации с эталонным набором живых культур лептоспир по схеме, предложенной ВОЗ. Антитела можно определить с конца 1-й недели заболевания в диагностическом титре 1:100. В качестве экспресс-диагностики на 1-й неделе заболевания определяют IgM методом ИФА и ДНК возбудителя методом ПЦР.

Серологический метод исследования предусматривает также обнаружение 4-кратного увеличения титра антител в парных сыворотках в реакциях агглютинации, лизиса. Первую сыворотку берут в начале заболевания, вторую - спустя неделю.

11.7. ДИАГНОСТИКА ЛИСТЕРИОЗА

Возбудитель листериоза - *Listeria monocytogenes*. Это грамположительные мелкие палочки, в мазках располагаются короткими цепочками или под углом друг к другу. Подвижные, спор и капсул не образуют, микроаэрофилы. К питательным средам не требовательны. На кровяном агаре образуют зону гемолиза. Биохимическая активность высокая, ферментируют углеводы с образованием кислоты. При разложении белков образуют сероводород.

Антигенная структура сложная. Листерии имеют О- и Н-антигены. По антигенной структуре выделяют семь серологических вариантов.

Факторы патогенности листерий - поверхностные белки, ферменты, разрушающие клеточные мембраны, токсины (гемолизин, листериолизин). Листерии - факультативные внутриклеточные паразиты. Они захватываются фагоцитами - мононуклеарами (незавершенный фагоцитоз), клетками эндотелия, М-клетками кишечника, гепатоцитами, нейронами, а также клетками плаценты.

Листерии - сапронозы, обитают в почве и воде в некультивируемом состоянии или в симбиозе с простейшими и корневой системой простейших. Сельскохозяйственные животные инфицируются через воду и корма.

Человек заражается через овощи, молочные, мясные продукты, не прошедшие достаточную термическую обработку, воду. Возможны трансплацентарный, контактный и воздушно-пылевой пути заражения, а также заражение плода во время родов.

Из места входных ворот листерии распространяются лимфогенно и гематогенно в печень, селезенку, ЦНС, где размножаются с образованием гранулем - листериом. В листериомах происходит размножение возбудителей. Листериомы, формирующиеся в ЦНС, обуславливают клиническую картину менингита, энцефалита.

Микробиологическая диагностика. Применяют бактериологический, серологический и аллергологический методы.

Материалами для бактериологического исследования служат кровь, спинномозговая жидкость, биопсийный материал из лимфатических узлов, околоплодные воды, плацента. Выделяют чистую культуру, посева выдерживают в термостате 2-3 нед. Возбудителя идентифицируют по культуральным и биохимическим свойствам. Возможно проведение биопробы на мышах.

Серологическая диагностика включает реакцию агглютинации, РСК, РНГА, ИФА. Определяют нарастание титра антител в парных сыворотках, а также титр IgM.

11.8. ДИАГНОСТИКА БОТУЛИЗМА

Возбудитель ботулизма - *Clostridium botulinum*, грамположительные палочки, имеющие субтерминально расположенные крупные споры, которые придают возбудителю вид теннисной ракетки. Капсулы не образуют, перитрихи. Строгие анаэробы, растут на питательных средах с добавлением крови. Биохимическая активность высокая.

Антигенными свойствами обладает токсин, продуцируемый возбудителем. Возбудитель выделяет белковый токсин. По антигенной структуре различают семь типов токсина - А, В, С, D, Е, F, G. На территории России встречаются типы А, В и Е. Токсин каждого типа может быть полностью нейтрализован лишь сывороткой гомологичного типа.

Clostridium botulinum - нормальный обитатель кишечника многих животных. Возбудители выделяются с испражнениями во внешнюю среду, где переходят в споровое состояние. Место их постоянного обитания - почва, где они размножаются (сапроноз), откуда попадают на пищевые продукты. Путь заражения - пищевой. Продукты, через которые передается ботулизм, - большие куски ветчины, колбасы, рыбы, а главное - домашние консервы из грибов, овощей, мяса, рыбы. Споры в анаэробных условиях переходят в вегетативные формы и выделяют токсин. Для окружающих ботулизмом не заразен.

Токсин вместе с продуктами попадает в пищеварительный тракт, оттуда всасывается в кровь. Ботулотоксин нарушает синаптическую передачу. Поражаются мотонейроны передних рогов спинного мозга и клетки черепно-мозговых нервов, а также парасимпатическая нервная система. Как следствие, возникают парезы и параличи. При ботулизме возможны тошнота, рвота, учащенный стул. Наблюдаются зрительные

расстройства - двоение в глазах, птоз и др. Развивается паралич дыхательной мускулатуры, что приводит к смертельному исходу.

Микробиологическая диагностика ботулизма. Материалы для исследования - промывные воды желудка, остатки пищи, рвотные массы, кровь. Основной целью диагностики ботулизма является обнаружение ботулотоксина в исследуемом материале реакцией обратной не прямой гемоглютинации или ИФА(табл. 11.11).

Таблица 11.11.Реакция обратной не прямой гемагглютинации для определения типа ботулинического токсина

Ингредиенты, мл	Разведение							
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	контроль
Изотонический раствор натрия хлорида	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Исследуемый материал (промывные воды желудка, разведение 1:5)	0,5	→	→	→	→	→	Вылить 0,5	—
Антителный эритроцитарный диагностикум соответствующего серотипа	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Результаты								
С поливалентным диагностикумом ABE								
С диагностикумом А								
С диагностикумом В								
С диагностикумом Е								
Заключение								

Возможна постановка реакции нейтрализации токсина антитоксической сывороткой на мышах.

Бактериологический метод не проводят, так как это длительный процесс и не всегда в исследуемом материале может присутствовать возбудитель.

Вопросы для самоконтроля

1. Основной метод диагностики ОКИ - ...
2. Первичную дифференциацию возбудителей ОКИ осуществляют по .
3. Кровь для получения гемокультуры засевают в .
4. Идентификацию внутри рода *Salmonella* проводят по ...
5. Изолирование диареогенных эшерихий проводят по результатам
6. Метод холодого обогащения перед посевами проводят при выделении из исследуемого материала .
7. «Золотой стандарт» диагностики листериоза - ...
8. Цель диагностики ботулизма - обнаружение в исследуемом материале .
9. Основное условие культивирования при выделении чистой культуры кампилобактеров и хеликобактера - создание .

МОДУЛЬ 12. ВОЗБУДИТЕЛИ РЕСПИРАТОРНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ: ОСНОВНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, ПРИНЦИПЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Цели модуля

- Знать: этиологическую структуру, свойства возбудителей респираторных бактериальных инфекций, принципы их диагностики.
- Уметь: подбирать материал для исследования и методы исследования.
- Владеть: методами оценки результатов проведенных микробиологических исследований при диагностике этих инфекций.

Бактериальные инфекции с аэрогенным механизмом передачи вызывает большая группа бактерий, которые относят к различным таксономическим группам. Условно их можно разделить на три группы (табл. 12.1).

- Первая группа включает инфекционные заболевания, которые отличаются специфичностью патогенеза и клинической картины, формированием защитного иммунитета, способностью к эпидемическому распространению. Эта группа включает дифтерию, туберкулез, коклюш, скарлатину, менингококковую инфекцию. Основу микробиологической диагностики этих заболеваний составляет бактериологический метод исследования. В качестве дополнительных методов, в зависимости от вида заболевания, используют бактериоскопический, серологический, аллергический методы, ПЦР.

- Вторую группу составляют так называемые неспецифические инфекции органов дыхательных путей. Следует отметить, что многие возбудители этих заболеваний - представители нормальной микрофлоры ротоглотки и верхних дыхательных путей, поэтому вызываемые ими заболевания могут протекать как экзо-, так и эндоинфекции. Диагностику этих заболеваний проводят количественным бактериологическим методом; в качестве вспомогательных используют бактериоскопический метод и ПЦР.

- Третья группа респираторных бактериальных инфекций включает заболевания, возбудители которых совсем не культивируются на искусственных питательных средах (представители рода *Chlamydia*) либо для своего культивирования требуют применения специальных сложных питательных сред (представители родов *Legionella*, *Mycoplasma*). Их нельзя выделить из исследуемого материала, применяя рутинную методику бактериологического исследования. Вызываемые ими заболевания не диагностируют бактериологическим методом, поэтому их называют атипичными пневмониями. Диагностику этих инфекций проводят серологическим методом исследования, в качестве дополнительного используют ПЦР.

Таблица 12.1. Этиологическая структура бактериальных респираторных инфекций

I группа		II группа		III группа	
возбудитель	заболевание	возбудитель	заболевание	возбудитель	заболевание
<i>M. tuberculosis</i> <i>M. bovis</i> <i>M. africanum</i>	Туберкулез	<i>S. pneumoniae</i>	Неспецифические инфекции дыхательных путей	<i>L. pneumophila</i>	Болезнь легионеров
		<i>S. pyogenes</i> <i>H. influenzae</i>		Другие виды легионелл	Легионеллез
<i>C. diphtheriae</i>	Дифтерия	<i>S. aureus</i> <i>K.</i>		<i>M. pneumoniae</i>	Пневмония

<i>B. pertussis</i>	Коклюш	<i>pneumoniae</i>		<i>C. pneumoniae</i>	Хронический бронхит, пневмония
<i>B. parapertussis</i>	Паракоклюш			<i>C. psittaci</i>	Орнитоз

Окончание табл. 12.1

I группа		II группа		III группа	
возбудитель	заболевание	возбудитель	заболевание	возбудитель	заболевание
<i>S. pyogenes</i>	Скарлатина				
<i>N. meningitidis</i>	Эпидемический цереброспинальный менингит			<i>C. burnetii</i>	Кулихорадка

12.1. ДИАГНОСТИКА СПЕЦИФИЧЕСКИХ ИНФЕКЦИЙ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ

12.1.1. Диагностика дифтерии

Возбудителей дифтерии относят к роду *Corynebacterium*, виду *C. diphtheriae*. Это прямые или слегка изогнутые тонкие грамположительные палочки с булавовидными концами за счет наличия зерен волютина. Спор и капсул не образуют, неподвижны. Возбудители дифтерии - факультативные анаэробы, культивируются при температуре 37 °С. На среде Клауберга образуют колонии черного или черно-серого цвета. Элективными являются сывороточные среды Ру и Ру-Леффлера.

C. diphtheriae ферментируют глюкозу и мальтозу с образованием кислоты, продуцируют фермент цистиназу (проба Пизу положительна). Не ферментируют сахарозу, не образуют индол и не имеют фермента уреазы (отрицательная проба Закса).

Известно четыре биовара *C. diphtheriae* - *gravis*, *mitis*, *intermedius* и *belfanti*, которые различаются культуральными признаками и способностью ферментировать крахмал. Факторы патогенности *C. diphtheriae* - дифтерийный гистотоксин, дермонекротоксин, гиалуронидаза, нейроминидаза, гемолизин.

Дифтерия - антропонозное заболевание. Источник инфекции - больные и носители токсигенных штаммов *C. diphtheriae*. Заражение происходит воздушно-капельным, редко контактно-бытовым и алиментарным путями. Дифтерию относят к токсинемическим инфекциям, так как возбудитель остается в месте входных ворот, а клинические симптомы обусловлены действием дифтерийного гистотоксина. Различают клинические формы дифтерии - зева, носа, гортани, трахеи, глаз, уха, половых органов, кожи и ран. В месте входных ворот инфекции развиваются воспалительная реакция, некроз эпителиальных клеток, отек, фибринозная пленка.

Лабораторную диагностику проводят бактериологическим, серологическим методами и ПЦР.

Бактериологическое исследование дифтерии

Бактериологическое исследование проводят в целях лабораторной диагностики дифтерийной инфекции, выявления источников инфекции и наблюдения за распространенностью токсигенных коринебактерии дифтерии.

Взятие и доставка материала

- Взятие материала должны проводить специально обученные медицинские работники лечебно-профилактических учреждений.

- При исследовании на дифтерию обследуют ротоглотку и нос. При дифтерии редких локализаций (глаз, ухо, рана, кожа, влагалище), помимо пораженных участков, следует брать материал также с миндалин и из носа.

- Взятие материала осуществляют с помощью стерильных ватных сухих тампонов. Для их приготовления используют деревянные или металлические (из нержавеющей стали) палочки, на один из концов которых плотно наматывают слой гигроскопической ваты. Стерилизуют тампоны в сухожаровом шкафу при температуре 140 °С в течение 1 ч или в автоклаве при 0,5 атм в течение 30 мин.

- Материал из ротоглотки и носа берут отдельными тампонами натошак или не ранее чем через 2 ч после еды, при хорошем освещении, с использованием шпателя, не касаясь тампоном языка и внутренних поверхностей щек и зубов. Одним тампоном собирают материал с пораженных участков ротоглотки (миндалин), при необходимости - с дужек мягкого нёба, нёбного язычка или задней стенки глотки. При наличии налетов материал следует брать с границы пораженных и здоровых тканей, слегка нажимая на них тампоном. Для взятия материала из носа используют другой тампон, который вводят сначала в один, а затем в другой носовой ход, не касаясь крыльев носа снаружи.

- Тампоны должны быть доставлены в лабораторию не позднее 3 ч с момента взятия материала.

- В случае использования транспортной среды материал собирают сухим тампоном, опускают в пробирку со средой и следят за тем, чтобы пробка тампона не намочилась. Следует учитывать, что применение транспортной среды увеличивает срок выдачи окончательного ответа на одни сутки.

Ход исследования

- Первый день - посев материала.

- Материал для исследования из ротоглотки, носа или других пораженных мест засевают на поверхность одной из рекомендуемых плотных питательных сред (таких как кровяно-теллуритовая среда Клауберга, среда Бучина, коринебакагар), разлитых в чашки Петри.

- При посеве материал втирают в среду со всех сторон тампона. Посев проводят частыми штрихами, не отрывая тампон от поверхности питательной среды. Такой метод посева позволяет засеять весь материал с тампона, получить изолированные колонии (чистую культуру) для дальнейшей идентификации. Засеянные чашки или пробирки с транспортной средой помещают в термостат при температуре 37 °С. Высев из транспортной среды проводят на следующие сутки на плотную питательную среду тампоном, отжатым о стенки пробирки, или петлей, забирая материал из осадка.

- Второй день

- Колонии, выросшие на чашках, просматривают через 24 ч после посева материала визуально или с помощью микроскопа бинокулярного стереоскопического (МБС).

- Чашки с колониями, похожими на дифтерийные, отбирают для дальнейшей идентификации. Подозрительные колонии на кровяно-теллуритовых средах - светло-серого цвета, выпуклые, с ровными краями, через 48 ч - серые с металлическим оттенком, с ровными или слегка изрезанными краями, крошащиеся при прикосновении петлей или

мягкой консистенции. Из этих колоний готовят микропрепараты, окрашивают (метиленовой синькой, по Нейссеру) и микроскопируют.

— Клетки коринебактерий дифтерии из культуры, выросшей на средах с ингибиторами роста (теллуридом калия, хинозолом), могут быть укорочены, утолщены, однако присущие им расположение и полиморфизм сохраняются. Оценка морфологических признаков не позволяет установить видовую принадлежность микроорганизма, но дает возможность предположительно отнести его к роду *Corynebacterium*.

— Токсигенные свойства изучают не менее чем у двух изолированных колоний путем посева одной половины каждой колонии на среду для определения токсигенности и (необожженной петлей) на среду для определения пробы Пизу, а другой половины колонии - в пробирку со скошенным сывороточным агаром для сохранения и накопления культуры. Учитывая, что в исследуемом материале могут находиться одновременно токсигенные и нетоксигенные разновидности коринебактерий дифтерии, важно изучить токсигенные свойства у максимального числа выросших колоний (20 и более), смешивая по 5-7 однотипных колоний в одну петлю.

— В целях выдачи предварительного ответа в случае множественного роста подозрительных колоний можно провести посев нескольких колоний на жидкую питательную среду для постановки РНГА, провести дополнительную пробу Закса и пробу Пизу. При характерных для коринебактерий дифтерии морфологии, культуральных свойствах, отрицательной пробе Закса, положительных результатах пробы Пизу, РНГА выдают предварительный ответ.

- Третий день

— Через 24 ч при появлении специфических линий преципитации на среде для определения токсигенности, положительной пробе Пизу (на цистиназу), отрицательной пробе Закса (на уреазу) изучаемую культуру идентифицируют как коринебактерии дифтерии токсигенные и выдают документированный ответ. При отсутствии специфических линий преципитации на среде для определения токсигенности чашки инкубируют еще 24 ч.

— Культуру, выросшую на скошенном сывороточном агаре или с пробы Пизу, засевают на среды для определения биохимического варианта (сахароза, глюкоза, крахмал).

— Чашки с первичным посевом исследуемого материала просматривают визуально или с помощью МБС повторно через 36-48 ч инкубации в термостате. При наличии подозрительных колоний изучают их токсигенные свойства, цистиназную активность и выделяют чистую культуру на скошенном сывороточном агаре (см. второй день исследования).

- Четвертый-пятый день

— При выделении токсигенных коринебактерий дифтерии дополнительно выдают ответ о биохимических свойствах (через 72 или 96 ч от момента первичного посева исследуемого материала).

Бактериологическое заключение. Наличие специфических линий преципитации при определении токсигенных свойств, положительная проба Пизу на цистиназу, отрицательная проба Закса на уреазу, характерные культуральные и биохимические свойства (сахароза, глюкоза, крахмал) позволяют заключить, что выделенная культура относится к виду *C. diphtheriae* (рис. 12.1).

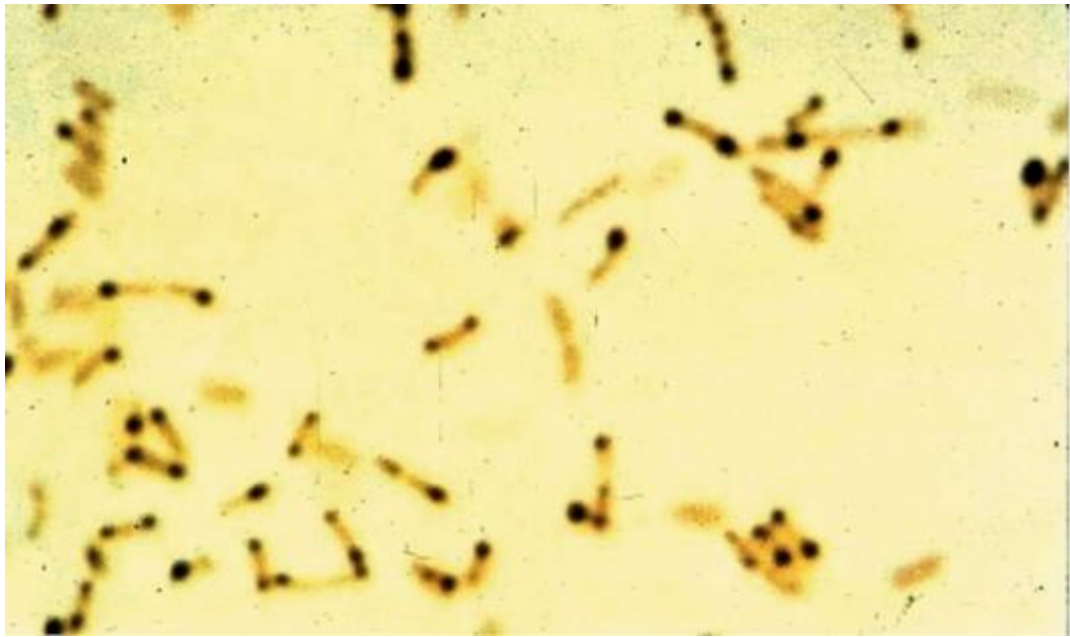


Рис. 12.1. *Corynebacterium diphtheriae*

Серологические методы применяют для оценки антитоксического иммунитета и обнаружения антибактериальных антител в острый период заболевания. Используют РНГА (РПГА) с антигенным эритроцитарным диагностикумом и ИФА. Защитный титр антител в РНГА составляет 1:40.

Для ускоренного обнаружения дифтерийного токсина в бактериальных культурах и биологических жидкостях (сыворотке крови) применяют РНГА с антительным эритроцитарным диагностикумом и ИФА.

Молекулярно-генетические методы. Используют ПЦР для определения *tox*-гена.

12.1.2. Диагностика коклюша

Клинический синдром коклюша может быть вызван тремя возбудителями - *B. pertussis*, *B. parapertussis* и в единичных случаях *B. bronchiseptica*. Микроорганизмы относят к роду *Bordetella*, семейству *Halobacterium*. Все они - грамотрицательные мелкие овоидные палочки (коккобактерии), располагаются поодиночке или группами, имеют нежную капсулу, пили. Бордетеллы - неподвижные (*B. pertussis* и *B. parapertussis*) или подвижные (*B. bronchiseptica*) бактерии. Спор не образуют. При окраске толуидиновым синим обнаруживаются биполярно расположенные метахроматические гранулы. Хемоорганотрофы, метаболизм окислительный, строгие аэробы. Бордетеллы на простых питательных средах не культивируются. Для роста им необходимы три аминокислоты - пролин, цистеин, глутаминовая кислота. Бордетеллы растут на картофельно-глицериновом агаре с добавлением крови (среде Борде-Жангу), кровяном агаре и на полусинтетическом казеиновоугольном агаре (КУА).

Колонии коклюшных бактерий мелкие, круглые, с ровными краями, блестящие, напоминающие капельки ртути или жемчуг, вырастают на 3-4-й день. Свежевыделенные культуры образуют S-форму колоний (1-я фаза), при дальнейшем культивировании могут образовывать R-формы (2-я фаза). Колонии паракоклюшных бактерий крупнее и выявляются на 1-2-й день. Оптимальная температура роста - 35-36 °С. На кровяных средах образуют зону гемолиза. Бордетеллы не обладают протеолитической и сахаролитической активностью, не восстанавливают нитраты в нитриты. Паракоклюшные бактерии выделяют тирозиназу, образуя пигмент, окрашивающий культуру и среду в коричневый цвет. Дифференциальные признаки бордетелл приведены в таблице 12.2.

Таблица 12.2. Дифференциальные признаки бордетелл

Тест	Вид микроорганизма		
	коклюшный	паракоклюшный	бронхисептический
Сроки появления колоний, ч	48-72	24-48	18-24

Окончание табл. 12.2

Тест	Вид микроорганизма		
	коклюшный	паракоклюшный	бронхисептический
Размер колоний, мм	1-2	2-4	2-4
Окраска по Граму	—	—	—
Подвижность	—	—	+
Рост на простом агаре	—	+	+
Изменение цвета питательных сред (побурение)	—	+	—
Расщепление мочевины	—	+	+
Утилизация цитратов	—	—	+
Образование пигментов из тирозина	—	+	—
Агглютинация видовыми специфическими неадсорбированными коклюшными и паракоклюшными сыворотками	+	+	+
Агглютинация сыворотками к монорецепторными агглютиногенам (факторам): • фактору 1; • фактору 14; • фактору 12	+	+	+

Источник инфекции - больной человек, чаще дети. Заражение происходит аэрогенным путем. Инкубационный период составляет от 5 дней до 2 нед. Возбудитель размножается в клетках верхних дыхательных путей и попадает в бронхи. При действии экзотоксина эпителий слизистой оболочки некротизируется, раздражаются кашлевые рецепторы и возникают спазматические приступы кашля.

Лабораторную диагностику коклюша и паракокклюша осуществляют двумя методами:

- *бактериологическим*, при котором выделяют возбудителя из слизи с задней стенки глотки;
- *серологическим*, при котором определяют специфические антитела в сыворотке больного или переболевшего.

Бактериологический метод проводят с диагностической целью и по эпидемическим показаниям, серологический - для ретроспективного установления диагноза.

Бактериологическая диагностика

Взятие материала. Материал для исследования - слизь из верхних дыхательных путей. Взятие материала проводят двумя способами:

- заднеглоточным тампоном;
- «кашлевыми пластинками».

Заднеглоточным тампоном материал забирают как с диагностической целью, так и по эпидемическим показаниям. Метод «кашлевых пластинок» используют только с диагностической целью при наличии кашля. У детей грудного возраста рекомендуют брать материал заднеглоточным тампоном. Для взятия материала используют два вида тампонов, предварительно изогнутых под тупым углом (до его стерилизации):

- сухой;
- увлажненный.

Материал, взятый сухим тампоном, засевают немедленно на питательную среду, а при взятии увлажненным тампоном материал доставляют для посева в лабораторию, но не позднее 2-4 ч после его взятия. Сбор материала методом «кашлевых пластинок» проводят на две чашки с питательной средой (КУА). Во время приступа кашля левой рукой снимают крышку чашки, а правой подносят ее ко рту на расстояние 10-12 см так, чтобы капельки слизи из дыхательных путей попали на поверхность среды. Чашку в таком положении держат в течение 6-8 кашлевых толчков, затем закрывают крышкой и доставляют в лабораторию при температуре 37 °С. При посеве материала с диагностической целью рекомендуют использовать 2 чашки со средой КУА, а по эпидемическим показаниям - 1 чашку.

- Первый день исследования

— Посев материала, взятого тампоном, проводят последовательно на 1-2 чашки с питательной средой, предварительно обработанной пенициллином или бициллином для подавления сопутствующей микрофлоры. Для получения изолированных колоний посев материала проводят путем тщательного втирания его тампоном вначале по периферии среды чашки Петри в виде 4-5 площадок, а затем Z-образным штрихом в центре чашки.

— Засеянные чашки (тампоном или «кашлевыми пластинками») помещают в термостат при температуре 35-37 °С на 3 сут (72 ч). Для увлажнения воздуха в термостат ставят сосуд с водой.

- Четвертый день исследования (3 сут, или 72 ч)

— Просматривают посевы на чашках с питательной средой в целях отбора подозрительных колоний микробов рода *Bordetella*.

— Колонии микробов рода *Bordetella* при росте на плотных питательных средах выпуклые, влажные, гладкие, блестящие, с ровными краями, серого цвета с голубоватым, жемчужным или металлическим оттенком. Колонии имеют мягкую (маслянистую) консистенцию и легко снимаются. При просмотре колоний в стереоскопическом микроскопе можно наблюдать узкий луч света («хвостик»), отходящий от ее центра.

— Колонии бронхисептического микроба в субкультуре могут быть двух видов - сходные с коклюшными и более плоские с приподнятым центром.

— Колонии бронхисептического микроба появляются через 18-24 ч, паракоклюшного - через 24-48 ч, коклюшного - через 48-72 ч. На средах с кровью вокруг колоний почти всегда образуется зона слабого гемолиза.

— Рост коклюшного и бронхисептического микробов на питательной среде не сопровождается изменением ее цвета. Паракоклюшные возбудители при обильном росте на среде КУА вызывают диффузное окрашивание среды в буровато-коричневый цвет.

— При наличии на среде подозрительных колоний проводят выделение чистой культуры путем отсева их на скошенный КУА. При этом поверхность среды делят на несколько секторов и отсевают каждую колонию на отдельный сектор, тщательно втирая ее в среду круговыми движениями.

— Из оставшихся колоний делают мазки и определяют морфологию культуры при окраске по Граму. Микробы рода *Bordetella* имеют вид мономорфных мелких овоидных палочек (коккобактерий), равномерно расположенных в мазке; грамотрицательны. Иногда паракоклюшные микробы, особенно со среды Борде-Жангу, могут иметь вид удлинённых полиморфных палочек. Культуру из оставшихся колоний проверяют в реакции агглютинации на стекле со специфическими видовыми неадсорбированными сыворотками и с адсорбированными монорецепторными сыворотками к агглютиногенам. Возможна постановка пробы Закса для определения фермента уреазы.

Пятый-шестой день исследования (4-5 сут, или 96-120 ч.)

— Просматривают посеvy чистой культуры и отмечают изменение цвета среды: паракоклюшные микробы диффузно окрашивают среду выращивания (КУА) в буровато-коричневый цвет.

— Определяют морфологию выделенной культуры, ее чистоту, а также отсутствие спонтанной агглютинации.

— Серологические свойства проверяют в реакции агглютинации на стекле со специфическими неадсорбированными коклюшными и паракоклюшными сыворотками, разведенными 1:10, а также с адсорбированными монорецепторными сыворотками к факторам 1 и 14. Серовариант коклюшного микроба определяют агглютинацией с монорецепторными сыворотками к факторам 1, 2, 3.

— В целях проверки биохимических свойств проводят посеvy чистой культуры на агаровую среду с тирозином (для выявления тирозиназы), определяют наличие уреазы пробой Закса или посевом на бульон Хоттингера с мочевиной. При подозрении на выделение чистой культуры бронхисептического микроба определяют утилизацию цитрата на среде Симмонса и подвижность путем посева в полужидкий агар (0,5% агар-агар).

Для определения потребности в цитратах делают посев испытуемой культуры на скошенный агар среды Симмонса. Пробирки инкубируют при температуре 37 °С в течение 1 сут. Цитрат-ассимилирующие бактерии хорошо растут, подщелачивают среду и окрашивают ее в синий цвет. Микробы, не ассимилирующие цитраты, на этой среде не растут и не меняют ее цвета.

Для определения пигментообразования проводят посев выделенной культуры на простой питательный агар с 0,1% тирозином и инкубацией в течение суток при температуре 37 °С. При расщеплении тирозина среда окрашивается в желто-коричневый цвет.

- *B. pertussis* биохимически инертна: не растет на мясо-пептонном агаре, не изменяет цвет агаровой среды с тирозином, не имеет фермента уреазы (проба Закса отрицательная), не утилизирует цитраты.

- *B. parapertussis* дает рост на простых питательных средах, изменяет среду с тирозином в коричневый цвет, обладает ферментом уреазой (проба Закса положительная).

- *B. bronchiseptica* отличается быстрым ростом на простых питательных средах, подвижностью, не изменяет цвет среды с тирозином, способна утилизировать цитраты на среде Симмонса.

Бактериологическое заключение. На основании изучения чистой культуры - морфологии колоний и клеток, реакции агглютинации с видовыми неадсорбированными сыворотками и адсорбированными монорецепторными сыворотками к факторам 1 и 14, результатов пробы на уреазу, изменения цвета среды с тирозином, утилизации цитратов - выдают окончательный ответ.

Серологическая диагностика

Серологическая диагностика коклюша и паракоклюша заключается в обнаружении в исследуемой сыворотке специфических антител. Исследования проводят на 2-3-й неделе заболевания, когда в крови больных появляются специфические антитела. В связи с широкой иммунизацией против коклюша результаты серологических реакций могут иметь диагностическое значение только при изучении их в динамике, исследуя парные сыворотки больного не менее 2-3 раз с интервалом 1-2 нед. Серологические реакции следует ставить параллельно с коклюшным и паракоклюшным диагностикумами.

Из исследуемой сыворотки готовят 9-10 последующих разведений: 1:5, 1:10 и так далее до 1:1280 или 1:2560. В 10-ю (или 11-ю) пробирку вместо сыворотки наливают 0,25 мл физиологического раствора (контроль). Реакцию агглютинации ставят в объеме 0,5 мл: к 0,25 мл соответствующего разведения сыворотки добавляют 0,5 мл диагностикума. Пробирки помещают в термостат при температуре 37 °С на 2 ч и оставляют затем при комнатной температуре. Результаты учитывают на следующий день с помощью агглютиноскопа. Конечным титром считают разведение, при котором отмечают четкую агглютинацию на два креста (2+), однако реакцию учитывают как положительную лишь при наличии в предыдущих пробирках четкой агглютинации на четыре или три креста (4+ или 3+).

Диагностическим титром реакции агглютинации у непривитых и не болевших детей считают разведение 1:80. У иммунизированных детей и взрослых положительные результаты реакции учитывают только при исследовании парных сывороток крови, взятых с интервалом 1-2 нед при нарастании титра не менее чем в 4 раза.

12.1.3. Диагностика туберкулеза

Возбудителей туберкулеза относят к семейству *Mycobacteriaceae*, роду *Mycobacterium*. Вызывающие у человека туберкулез микобактерии объединены в комплекс *Mycobacterium tuberculosis*, включающий:

- *M. tuberculosis* - человеческий вид;
- *M. bovis* - бычий вид;
- *M. africanum* - промежуточный вид.

Возбудители туберкулеза полиморфны, могут иметь вид тонких, длинных, немного изогнутых (*Mycobacterium tuberculosis*) или толстых коротких (*M. bovis*) палочек. Грамположительны, спор не образуют, неподвижны, кислото-, спирто- и щелочеустойчивы. Клеточная стенка микобактерий содержит липиды, миколовые

кислоты, поэтому микобактерии плохо воспринимают анилиновые красители и выявляются по методу Циля-Нильсена (рис. 12.2).

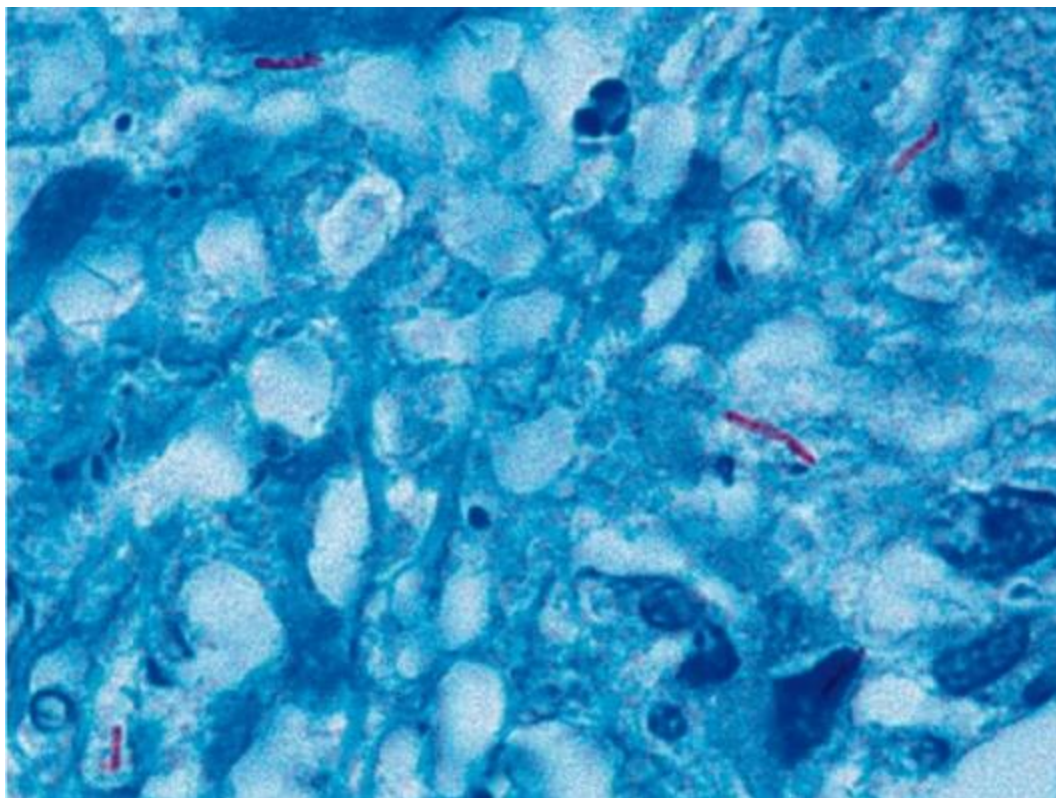


Рис. 12.2. *M. tuberculosis* в мокроте (окраска по Цилю-Нельсену)

Микобактерии могут образовывать L-формы, имеющие сниженный уровень метаболизма, ослабленную вирулентность и длительное время персистирования в организме. Микобактерии - облигатные аэробы. Для их роста необходимы питательные среды, содержащие глицерин, лецитин, витамины, аминокислоты. Применяют яичную среду Левенштейна-Йенсена, Финна II и синтетическую среду Сотона. Для подавления роста сопутствующей микрофлоры к средам добавляют краситель малахитовый зеленый и антибиотики, не действующие на микобактерии. Оптимальная температура культивирования - 37-38 °С; рН - 6,8-7,2.

На плотных средах рост отмечается на 15-20-е сутки в виде светло-кремового, белого или бледно-желтого чешуйчатого налета с неровными краями (R-форма колоний), который по мере роста принимает бородавчатый вид, напоминая цветную капусту. На жидких средах через 5-7 дней образуется толстая, сухая, бугристо-морщинистая пленка кремового цвета. Микобактерии способны к культивированию на стекле в жидкой питательной среде (метод микрокультур Прайса). Через 48-72 ч у вирулентных штаммов выявляется корд-фактор (от англ. *cord* - «жгут, веревка»), благодаря которому микобактерии склеиваются и растут в виде кос или жгутов (рис. 12.3). Корд-фактор - гликолипид, который относят к факторам патогенности микобактерий.

Биохимическая активность микобактерий слабая, они имеют фермент каталазу, образуют никотиновую кислоту (ниацин), редуцируют нитраты в нитриты.

Источник инфекции - больной человек или больные животные (крупный рогатый скот, свиньи, овцы). Пути передачи - аэрогенный, редко алиментарный и контактный. Инкубационный период составляет от 1-1,5 мес до 1 года. Чаще возникает туберкулез органов дыхания, который проявляется субфебрильной температурой тела, кашлем с кровавой мокротой, одышкой, слабостью. Микобактерии длительно сохраняются в макрофагах, фагоцитоз незавершенный.



Рис. 12.3. Корд-фактор

Микробиологическая диагностика туберкулеза

Бактериоскопический метод

- Прямая бактериоскопия мазка из исследуемого материала, окрашенного по Цилю-Нельсену.
- Бактериоскопия после предварительного обогащения исследуемого материала методами флотации или гомогенизации.
- Микроскопия препаратов, окрашенных люминесцентными красителями аураминол или родамином В, способными взаимодействовать с липидами клеточной стенки микобактерий, в результате чего наблюдается свечение в потоке УФ-лучей в люминесцентном микроскопе.

Бактериологический метод

Бактериологический метод осуществляют деконтаминацией исследуемого материала от сопутствующей микрофлоры с последующим посевом на среду Левенштейна-Йенсена (рис. 12.4). При этом рост видимых колоний возбудителей туберкулеза появляется на 5-6-й неделе инкубации. Выделенные колонии подвергают видовой идентификации, а также определяют их чувствительность к антибиотикам. Метод является наиболее точным, но в связи с длительностью его проведения используют экспресс-методы.

Экспресс-методы

- Метод Прайса (метод микрокультивирования на стеклах в жидкой среде). Вирулентные штаммы, обладающие корд-фактором, при микрокультивировании через 48-72 ч формируют параллельные тяжи. Авирулентные штаммы при этом растут беспорядочно.

- Радиометрический метод позволяет определять наличие живых микобактерий после 2 нед инкубации в специальной жидкой среде *Middlebrook 12B* с добавлением антибиотиков. Исследуемый материал помещают в среду *Middlebrook 12B*, в которую добавляют меченную нуклидом C^{14} пальмитовую кислоту. В случае наличия в исследуемом материале пальмитовой кислоты происходит ее утилизация микобактериями с выделением $^{14}CO_2$, который определяют радиометрически.

- ПЦР ставят с праймерами к нуклеотидной последовательности рРНК. ПЦР также используют для быстрого определения чувствительности бактерий к антибиотикам.

Биопроба

Биопробу осуществляют заражением морской свинки и в случае необходимости других животных (кроликов, мышей).

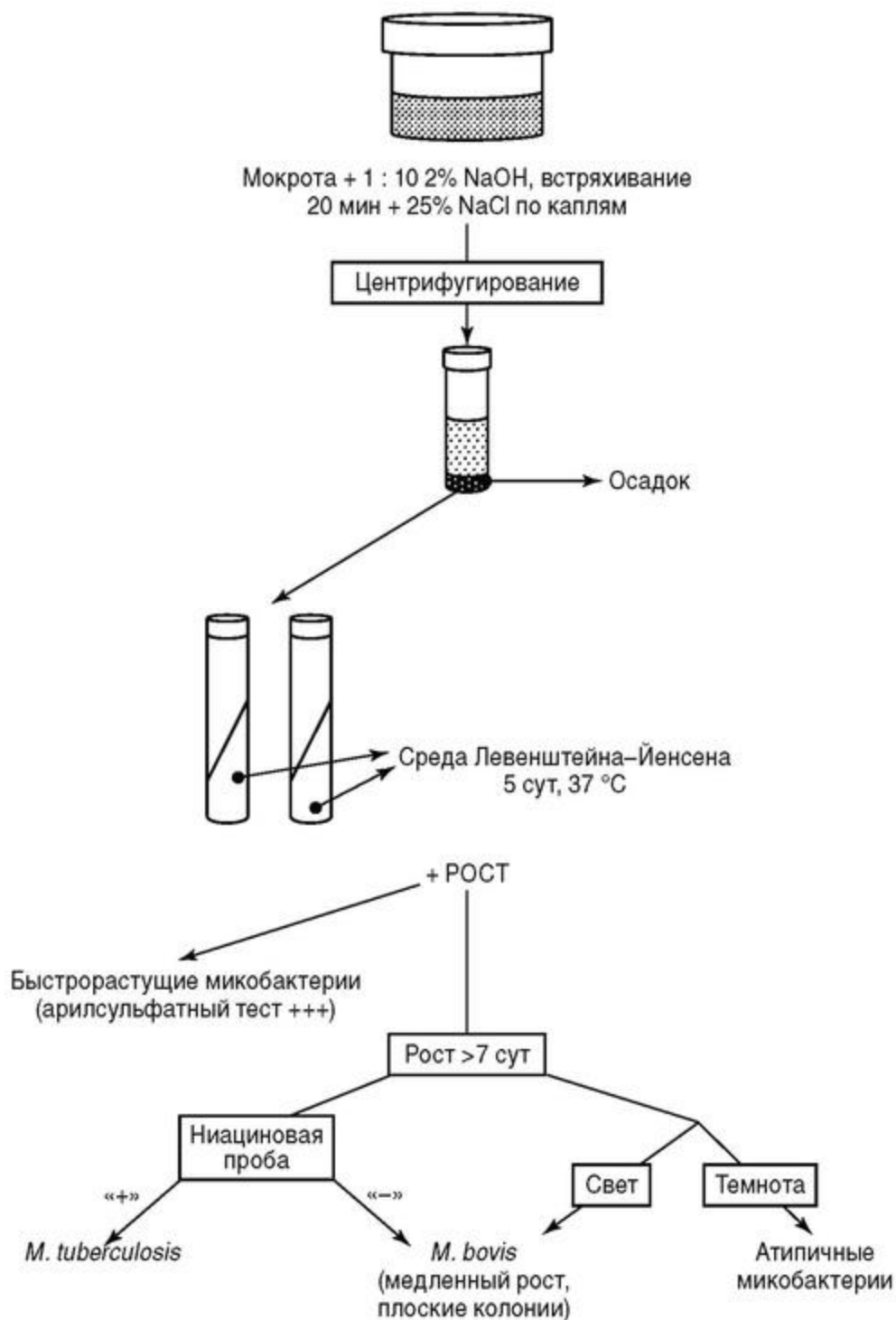


Рис. 12.4. Бактериологический метод диагностики туберкулеза

Аллергические пробы

Туберкулиновые пробы - специфический диагностический тест. Их используют для массовых обследований населения на инфицирование микобактериями.

Туберкулин был получен Р. Кохом и позднее назван старым туберкулином Коха (*Alt Tuberculin Koch* - АТК).

АТК - водно-глицериновая вытяжка культуры микобактерий человеческого и бычьего видов, выращенная в течение 6-8 нед на мясо-пептонном бульоне с добавлением 4% раствора глицерина, стерилизованная, освобожденная фильтрацией от бактериальных тел и сгущенная выпариванием при температуре 90 °С до 1/4 первоначального объема.

АТК содержит продукты жизнедеятельности микобактерий, отдельные компоненты бактериальной клетки и часть питательной среды. Его применяют только для накожной пробы Пирке. Чаще для выявления инфицирования ставят внутрикожную пробу Манту с ППД-Л (*Purified Protein Derivate* - очищенный белковый дериват; в нашей стране отечественный сухой очищенный туберкулин был изготовлен в 1939 г. под руководством М.А. Линниковой в Ленинградском НИИ вакцин и сывороток, поэтому этот туберкулин называют ППД-Л).

Реакцию оценивают через 72 ч. У лиц, не имевших контакта с микобактериями, реакция на ППД отсутствует.

12.1.4. Диагностика скарлатины

Возбудители скарлатины - микроорганизмы рода *Streptococcus*, *S. pyogenes*, которые относят к серогруппе А (всего известно 20 серогрупп).

Стрептококки - грамположительные кокки круглой (*S. pyogenes*) формы, расположенные цепочками. Неподвижны, спор не образуют, факультативные анаэробы. Культивируются на сложных питательных средах с добавлением крови, сыворотки, углеводов.

В соответствии с характером роста на 5% кровяном агаре возбудители скарлатины вызывают β -гемолиз - полный гемолиз эритроцитов с формированием вокруг колонии прозрачной зоны.

Основной фактор патогенности возбудителей скарлатины - эритрогенный токсин, синтез которого опосредован конвертирующим бактериофагом. Для возбудителей также характерны следующие факторы патогенности:

- белок М;
- капсула;
- липотейхоевая кислота;
- пептидогликан;
- секретлируемые факторы персистенции - АЛА и АКА;
- экзотоксины (эритрогенин, стрептолизины, лейкоцидин, цитотоксины);
- ферменты (гиалуронидаза, ДНКаза, мурамидаза, фибринолизин, стрептокиназа, НАДаза).

S. pyogenes (серогруппа А) колонизирует слизистые оболочки носа и носоглотки, миндалин, встречается на коже. *S. pneumoniae* обнаруживается на слизистой оболочке верхних отделов дыхательных путей. Источник инфекции - больной человек или бактерионоситель. Заболевание передается воздушно-капельным путем, реже - контактно-бытовым. Скарлатина характеризуется ангиной, интоксикацией, характерной сыпью на коже.

Микробиологическую диагностику скарлатины проводят бактериологическим, серологическим и экспресс-методами.

Взятие материала. Стерильный тампон вводят в полость рта, стараясь не прикасаться к языку и зубам. Легким надавливанием с поверхности миндалин и задней стенки глотки берут слизистое отделяемое. Материал из полости носа получают путем введения тампона на глубину 1-2 см в каждую ноздрю. Материал из везикул на коже берут после обработки поверхности 70% этиловым спиртом* и последующей их пункции с соблюдением правил асептики.

- Экспресс-диагностику стрептококковой инфекции проводят с помощью латекс-агглютинации, коагглютинации или ИФА группоспецифических антигенов, экстрагируемых непосредственно с тампонов.

- Бактериологический метод осуществляют путем посева материала на кровяной агар с дальнейшей инкубацией, выделением чистой культуры и ее идентификацией. Определение серологической группы проводят с помощью реакций агглютинации и преципитации с типовыми антистрептококковыми сыворотками.

- Серологический метод используют для определения антител к стрептолизину О.

12.1.5. Диагностика эпидемического цереброспинального менингита

Возбудители эпидемического цереброспинального менингита - *N. meningitidis*, относящиеся к роду *Neisseria*. Это грамотрицательные диплококки бобовидной формы (рис. 12.5). Неподвижны, спор не образуют, имеют пили 4-го типа, образуют полисахаридную капсулу.

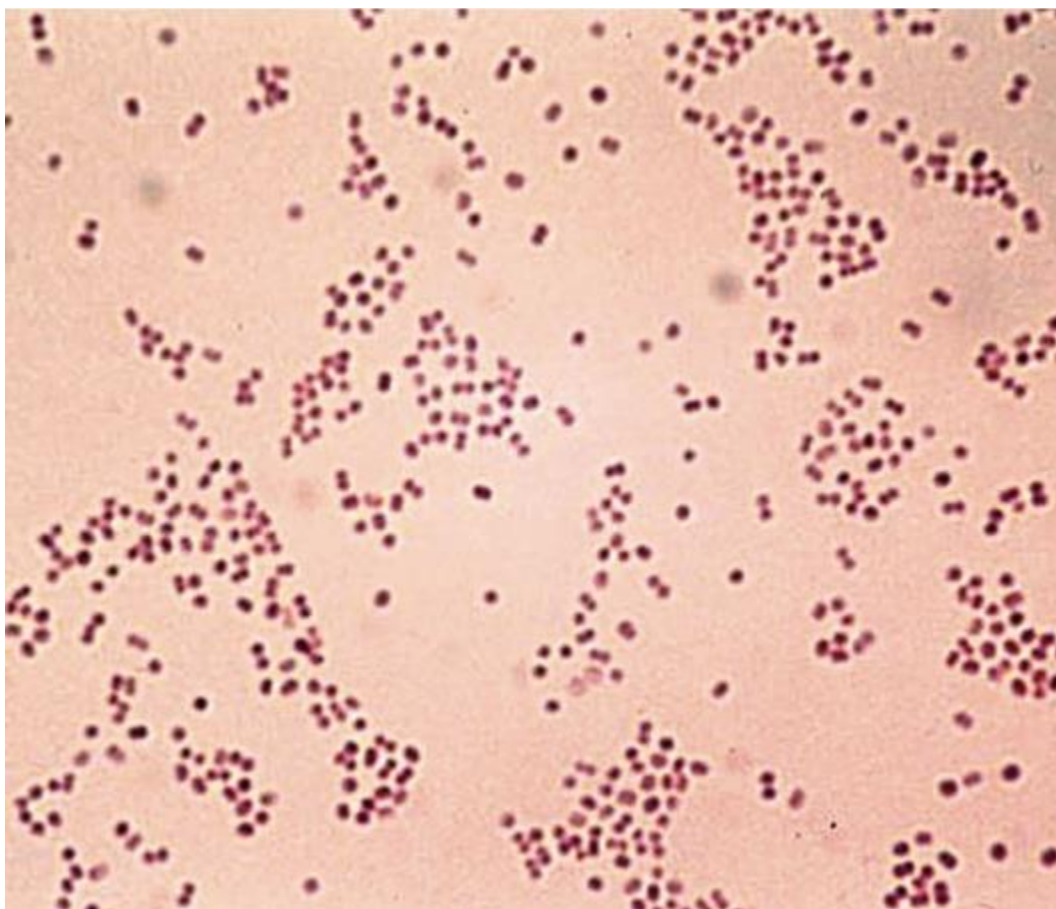


Рис. 12.5. *N. meningitidis* (окраска по Граму)

N. meningitidis - строгие аэробы, культивируются на сложных питательных средах с добавлением сыворотки или крови, образуя мелкие прозрачные колонии. На полужидкой питательной среде (0,1% полужидком сывороточном агаре) менингококки вызывают интенсивное помутнение в верхней части столбика среды. На шоколадном агаре образуют нежные, полупрозрачные сероватые колонии с ровными краями, блестящей поверхностью, размером 1-2 мм, имеют маслянистую консистенцию, не меняют цвет среды, не имеют запаха. Растут при температуре 37 °С; 5% CO₂ стимулирует их рост. На кровяном агаре не дают гемолиза. Биохимическая активность низкая, ферментируют мальтозу и глюкозу. Протеолитическими свойствами не обладают. Имеют ферменты каталазу и оксидазу. Антигенная структура сложная. По капсульным антигенам выделяют 13 серогрупп. По белковым антигенам внутри серогрупп выделяют 20 сероваров.

Эпидемический цереброспинальный менингит вызывают чаще менингококки серогруппы А.

Факторы патогенности - капсула, пили 4-го типа, белки наружной мембраны, эндотоксин, факторы персистенции (АЛА), ферменты гиалуронидаза, нейраминидаза, фибринолизин. Источник инфекции - больной человек или бактерионоситель. Заболевание передается воздушно-капельным путем. Менингококковая инфекция протекает в двух формах - локализованной и генерализованной:

- при *локализованной форме* менингококки проникают в клетки слизистой оболочки носоглотки и могут вызывать назофарингит;
- *генерализованные формы* инфекции:
 - менингококкемия (сепсис);
 - эпидемический цереброспинальный менингит, менингоэнцефалит;
 - эндокардит.

Микробиологическую диагностику эпидемического цереброспинального менингита проводят бактериоскопическим, бактериологическим и серологическим методами.

Материалы для исследования при менингитах - спинномозговая жидкость и кровь. Для выявления менингококкового носительства исследуют носоглоточную слизь. Материал следует доставлять в лабораторию при температуре 37 °С.

Бактериоскопический метод

- Прямая бактериоскопия мазка из исследуемого материала, окрашенного по Граму, - выявляют грамотрицательные диплококки бобовидной формы.
- Бактериоскопия нативной спинномозговой жидкости или препарата крови толстой капли (окраска водно-спиртовым раствором метиленовой сини): на голубом фоне обнаруживают морфологически четко окрашенные в темно-синий цвет диплококки, напоминающие кофейные зерна или семена бобов, прилегающие друг к другу вогнутыми сторонами; иногда выявляют капсулу. Бактериальные клетки могут располагаться как вне-, так и внутрилейкоцитарно.

Бактериологический метод

Первичный бактериологический посев спинномозговой жидкости на чашку с кровяным или сывороточным агаром выполняют непосредственно у постели больного в стационаре после пункции.

Носоглоточную слизь засевают путем втирания тампона на четверть чашки. Оставшуюся часть агара на чашке засевают штриховым методом с помощью стерильной бактериологической петли.

В бактериологической лаборатории посевы инкубируют при температуре 37 °С в течение 24-48 ч в атмосфере, содержащей 5-10% CO₂.

Далее изучают культуральные, морфологические и тинкториальные свойства. Чистую культуру идентифицируют по способности ферментировать мальтозу и глюкозу, наличию ферментов каталазы и оксидазы.

Проводят серологическую идентификацию с набором агглютинирующих серогрупповых антисывороток и определяют чувствительность к антибиотикам.

Экспресс-диагностика

- Латекс-агглютинация - выявляют специфический антиген в спинномозговой жидкости.

- Встречный иммуноэлектрофорез (ВИЭФ) - позволяет выявлять полисахаридный антиген возбудителя в спинномозговой жидкости и сыворотке крови больного.

Серологический метод

Исследуют нарастание титра антител в парных сыворотках в РНГА (РПГА). Четырехкратное нарастание титра специфических антител в процессе болезни служит подтверждением диагноза.

12.2. ДИАГНОСТИКА НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ИНФЕКЦИЙ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ

Неспецифические инфекции дыхательных путей могут быть вызваны *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*.

12.2.1. Бактериологическая диагностика неспецифических инфекций органов дыхания

Материал для исследования - мокрота, а также бронхиальная и плевральная жидкости. Материал собирают в стерильную посуду. При сборе мокроты больному накануне рекомендуют принять отхаркивающие препараты, а перед сбором материала - прополоскать рот стерильным физиологическим раствором для уменьшения попадания в исследуемый материал микрофлоры полости рта.

В лаборатории мокроту растирают в ступке с песком, после гомогенизации из нее готовят мазок, который окрашивают по Граму. Микроскопия мазка позволяет поставить ориентировочный диагноз и наметить схему бактериологического исследования.

При бактериологическом исследовании необходимо учитывать следующее.

- Неспецифические инфекции дыхательных путей могут быть вызваны различными бактериями (см. табл. 12.1), а также грибами, поэтому посев материала проводят на среды, позволяющие выделить всех возможных возбудителей:

- агар Сабуро - для выделения грибов;
- среду Эндо - для выделения клебсиелл;
- желточно-солевой агар или среду № 10 - для выделения стафилококков;
- кровяной агар - для выделения бактерий рода *Streptococcus*;
- шоколадный или кровяной агар с диском, пропитанным сапонином, - для выделения бактерий рода *Haemophilus*.

- С учетом того что возбудители неспецифических заболеваний дыхательных путей могут входить в состав микрофлоры ротоглотки и верхних дыхательных путей, исследуемый материал необходимо подвергнуть разведению, так как количественное преобладание того или иного вида бактерий может служить доказательством его этиологической роли.

- Следует иметь в виду, что инфекция может иметь ассоциативный характер, т.е. быть вызвана несколькими видами бактерий.

Разведение мокроты проводят сахарным бульоном, согласно приказу Минздрава России № 758, по следующей схеме:

- 0,5 мл мокроты добавляют в 4,5 мл сахарного бульона (разведение 1:10);
- из этого разведения делают высевы в объемах 0,1 мл на среды Сабуро и Эндо;
- из разведения 1:10 отбирают 0,1 мл, перенося в пробирку с сахарным бульоном в объеме 9,9 мл (разведение 1:1000);

- из разведения 1:1000 также отбирают 0,1 мл и переносят в пробирку с 9,9 мл сахарного бульона, делая разведение 1:105.

Из разведений 1:10³ и 1:10⁵ делают высевы на кровяной агар, а из разведения 1:10⁵ делают также высеивание в объеме 0,1 мл на желточно-солевой агар (агар № 10). Чашки со средами Сабуро, Эндо и желточно-солевым агаром помещают в термостат при температуре 37 °С. На чашки с кровяным агаром помещают диски, пропитанные сапонином, который вызывает гемолиз эритроцитов, в результате чего происходит выделение гемина (фактора X) и НАД (никотинамидадениндинуклеотида - фактора V), необходимых для роста гемофильных палочек. Чашки с кровяным агаром инкубируют при температуре 37 °С в СО₂-инкубаторе. Атмосфера СО₂ необходима для более обильного роста бактерий рода *Streptococcus*. Через 24 ч инкубации просматривают результаты посева.

В случае обнаружения на чашке с желточно-солевым агаром (агаром № 10) роста колоний золотистого цвета, окруженных радужным венчиком, проводят исследование по выделению чистой культуры стафилококка (см. модуль 13).

При обнаружении на среде Эндо роста крупных слизистых лактозоположительных или лактозоотрицательных колоний из них готовят два мазка, которые окрашивают по Граму и Бурри-Гинсу, а также суспензию в физиологическом растворе. Из суспензии делают посев на среду Клиглера для накопления чистой культуры и проводят идентификацию до рода и вида с помощью энтеротестов или набора дифференциальных сред (см. модуль 13). Результаты посева на среду Сабуро подвергают микробиологическому исследованию.

Учитывая результаты посева на кровяной агар, проводят первичную идентификацию по типу гемолиза и по потребности в факторах роста X и V (рост колоний в зоне гемолиза, вызванного сапонином).

Бактерии, выросшие вне зоны гемолиза, вызванного сапонином, рассматривают как представителей рода *Streptococcus*, и у них определяют тип гемолиза.

Мелкие колонии, вокруг которых образовалась зона полного гемолиза, рассматриваются как *S. pyogenes*. Для подтверждения их вида проводят их пересев на чашку с кровяным агаром, на который помещают диск, пропитанный антибиотиком бацитрацином, к которому чувствителен *S. pyogenes*. При росте *S. pyogenes* вокруг диска с бацитрацином образуется зона ингибиции роста.

Мелкие колонии, вокруг которых образуется зона зеленого гемолиза, рассматривают как *S. pneumoniae*. Из этих колоний готовят мазок, окрашивают по Граму, а также пересевают на чашку с кровяным агаром, на который помещают диски с желчью и оптохином для подтверждения видовой принадлежности. При наличии зоны лизиса вокруг диска с желчью больше 2 мм и вокруг диска с оптохином больше 20 мм выделенную культуру относят к *S. pneumoniae*.

Выделенные культуры (*S. pyogenes* и *S. pneumoniae*) типизируют с помощью реакции агглютинации и определяют их чувствительность к антибиотикам.

Следует также обращать внимание на крупные непрозрачные колонии, окруженные зоной гемолиза, особенно в случае обнаружения роста на желточно-солевом агаре. Этими колониями могут быть бактерии вида *S. aureus*, поэтому их необходимо исследовать по схеме выделения чистой культуры стафилококков.

В случае роста колоний внутри зоны гемолиза, вызванного сапонином, их ресуспендируют в сахарном бульоне и отсеивают на шоколадный агар для определения чувствительности к антибиотикам, а также на кровяной агар, на который помещают диски, пропитанные гемином (фактором X) и НАД (фактором V) как совместно, так и в

отдельности. Это необходимо для определения вида, так как для роста *H. parainfluenzae* достаточно только фактора V. Подробно диагностика *H. influenzae* описана ниже.

Бактерии рода *Haemophilus* - мелкие грамотрицательные коккобактерии, рост которых зависит от наличия в среде экзогенных факторов роста × (гемина) и V (НАД). Наиболее патогенный вид - *Haemophilus influenzae*, который обладает полисахаридной капсулой. Капсула является антигеном, который подразделяют на 6 сероваров - от a до f; наиболее патогенный серовар b. Помимо капсулы, возбудитель продуцирует IgA-протеазу, эндотоксин. *H. influenzae* культивируют на сложных питательных средах - шоколадном агаре *Haemophilus* с добавлением бацитрацина. Капсульные штаммы *H. influenzae* формируют слизистые M-колонии (сочные, сероватые, с радужными переливами) либо полупрозрачные блестящие S-колонии диаметром 3-4 мм. Некапсулированные штаммы *H. influenzae* на твердых питательных средах формируют более мелкие зернистые R-колонии с неровным краем, серовато-белого цвета. Биохимическая активность *H. influenzae* слабая - они ферментируют глюкозу, имеют ферменты каталазу и оксидазу. Инфекции обычно возникают у детей дошкольного возраста и характеризуются гнойным менингитом, гнойным воспалением надгортанника, септициемией. Штаммы, не обладающие капсулой, считают представителями нормальной микрофлоры носоглотки, они могут быть причиной возникновения неспецифических инфекций дыхательных путей. Основные факторы патогенности *H. influenzae* - капсула, затрудняющая поглощение бактерий фагоцитами и пили, облегчающие адгезию к слизистой оболочке верхних отделов дыхательных путей. *H. influenzae* проникают в подслизистую оболочку, вызывая воспалительную реакцию. Высоковирулентные штаммы могут мигрировать в лимфо- и кровотоки.

12.2.2. Лабораторная диагностика инфекций, вызванных бактериями рода *Haemophilus*

Основу диагностики *H. influenzae* составляют выделение и идентификация возбудителя. Материалы для исследования - слизь из зева, спинномозговая жидкость, гнойное отделяемое, мокрота и др. Посевы обычно проводят на шоколадный агар *Haemophilus* и среду с сердечно-мозговой вытяжкой. Типичные колонии пересевают, выявляют наличие капсул (в реакции иммунного набухания Найфельда) и исследуют биохимические свойства. Антигены бактерий выявляют с помощью РП в агаре.

Для быстрой идентификации *H. influenzae* в спинномозговой жидкости используют методы прямой иммунофлюоресценции и встречного иммуноэлектрофореза. Важную информацию может дать анализ потребности в факторах × и V.

- Прямой метод диагностики *H. influenzae*. Выполняют газонный посев культуры на твердую питательную среду. Полоски бумаги, пропитанные факторами × и V, накладывают на поверхность агара. Рост бактерий вокруг полосок, а не на других участках среды подтверждает принадлежность к виду палочки *H. influenzae*.

- Для идентификации палочки *H. influenzae* также применяют тест сателлитных колоний («бактериальную кормилку»). На кровяной агар засевают исследуемую культуру, а через центр чашки (по диаметру - штрихом) засевают золотистый стафилококк. Последний синтезирует фактор V, а также высвобождает фактор X, разрушая эритроциты. Около зоны роста стафилококка *H. influenzae* образует более крупные колонии.

12.3. ДИАГНОСТИКА ЛЕГИОНЕЛЛЕЗОВ И АТИПИЧНЫХ ПНЕВМОНИЙ

12.3.1. Легионеллез

Легионеллез - острое инфекционное заболевание, проявляющееся интоксикацией, лихорадкой, поражением дыхательных путей, пневмонией. Возбудители - *Legionella pneumophila*, относят к роду *Legionella*, который включает 50 видов. Легионеллы - грамотрицательные палочки, спор и капсул не образуют, подвижны. Требовательны к условиям культивирования, растут на сложных питательных средах с аминокислотами и железом в атмосфере 5% CO₂ в течение 7 дней или в желточном мешке куриного эмбриона. На тирозинсодержащих средах образуют водорастворимый пигмент коричневого цвета, диффундирующий в питательную среду. Не ферментируют углеводы.

Легионеллы населяют естественные водоемы, фонтаны, системы водоснабжения и кондиционирования воздуха, в которых они находятся в ассоциации с амебами и сине-зелеными водорослями. В организм человека возбудитель проникает при вдыхании инфицированного легионеллами водного аэрозоля. Легионеллы - факультативные внутриклеточные паразиты: они способны сохраняться и размножаться в макрофагах. Это связано с наличием факторов патогенности, подавляющих фагоцитарную активность, - цитотоксина, супероксиддисмутазы, цитолизина, фермента металлопротеазы. Легионеллез протекает в двух основных клинических формах:

- как тяжелая очаговая пневмония (болезнь легионеров);
- острое респираторное заболевание без пневмонии (лихорадка Понтиак).

Легионеллы поражают легочную ткань. У иммунодефицитных лиц легионеллы вызывают пневмонию с тяжелым течением, развитием дыхательной недостаточности.

Лабораторная диагностика. Выделение культур легионелл сопряжено со значительными трудностями и продолжительно по времени, поэтому в диагностической практике предпочтение отдают экспресс-методам обнаружения возбудителя.

Прямой метод РИФ. На приготовленный из нативного материала и фиксированный в ацетоне мазок наносят каплю легионеллезной люминесцирующей сыворотки и инкубируют во влажной камере 15-20 мин при температуре 37 °С. После промывки в фосфатном буфере мазок просматривают в люминесцентном микроскопе. В положительных случаях обнаруживают специфическое изумрудно-зеленое свечение легионеллезных бактерий.

Иммуноферментный анализ позволяет определить легионеллезный антиген в клиническом материале, включая мочу; представляет собой прямой (сэндвич) вариант ИФА. В лунки сенсibilизированных легионеллезными иммуноглобулинами планшетов вносят разведения исследуемого материала (антигена) и инкубируют в течение 1 ч при температуре 37 °С. После отмывки вносят конъюгат (легионеллезные иммуноглобулины с ферментом). Инкубируют в течение 1 ч, отмывают, вносят субстрат (индикаторный раствор) и после инкубации в течение 30 мин фотометрически учитывают реакцию.

Реакция коаггутинации - специфический и чувствительный метод определения антигенов легионелл в материале различного происхождения. При постановке реакции используют диагностикум - взвесь стафилококков, меченных легионеллезными иммуноглобулинами, которые добавляют в полистироловые лунки с раститрованным испытуемым материалом. После инкубирования в течение 2 ч учитывают результат. Появление выраженного агглютината свидетельствует о положительном результате.

Непрямой метод РИФ (реакция непрямой иммунофлюоресценции). В качестве антигена используют убитую кипячением культуру *L. pneumophila*, которую после нанесения на предметное стекло и фиксации обрабатывают двукратными разведениями сыворотки больного, начиная с 1:32. После инкубации в течение 15 мин наносят

люминесцирующий иммуноглобулин против глобулинов человека, повторно инкубируют, промывают в фосфатном буфере и микроскопируют. Максимальное разведение сыворотки, в котором обнаруживают специфическое свечение, - титр специфических антител. Минимальный диагностический титр при использовании этого метода составляет 1:64.

Проводят также серологическое исследование в комплексе с другими возбудителями атипичных пневмоний.

12.3.2. Ку-лихорадка

Возбудители ку-лихорадки - бактерии вида *Coxiella burnetii*, которые относятся к классу *Gammaproteobacteria*, порядку *Legionellales*, семейству *Coxiellaceae*, роду *Coxiella*. Коксииеллы - короткие грамотрицательные палочки, облигатные внутриклеточные паразиты. Культивируются в культурах клеток и куриных эмбрионах. В клетках размножаются в цитоплазматических вакуолях, могут размножаться в фаголизосомах. Устойчивы в окружающей среде. Устойчивость к высоким температурам и низким значениям рН связана со способностью образования эндоспороподобных форм. Коксииеллы также подвержены фазовым вариациям, которые различаются морфологией и антигенной специфичностью. Коксииеллы, находящиеся в 1-й фазе, имеют в клеточной оболочке структурный полисахарид, гидрофильны, обладают большей иммуногенностью, не поглощаются фагоцитами при отсутствии антител.

Резервуар коксииелл в природе - крупный и мелкий рогатый скот. У этих животных заболевание протекает бессимптомно, возбудитель выделяется в больших количествах с мочой, испражнениями, околоплодными водами, молоком. Человек в основном заражается, вдыхая аэрозоли мочи испражнений зараженных животных, а также употребляя молоко от зараженных животных, зараженную воду. Возможно заражение через поврежденную кожу при контакте с зараженными околоплодными водами животных при родах. Заболевание сопровождается лихорадкой, головной болью, симптомами острого респираторного заболевания, которое протекает как атипичная пневмония.

Лабораторную диагностику проводят серологическим методом исследования одновременно с диагностикой других атипичных пневмоний (хламидиозной, легионеллезной и микоплазменной этиологии). Следует учитывать, что в начале заболевания в крови появляются антитела к 2-й фазе, а в разгаре заболевания у реконвалесцентов обнаруживают антитела к 1-й фазе.

12.3.3. Респираторный хламидиоз

Респираторный хламидиоз - инфекционная болезнь, характеризуемая пневмонией, бронхитом и общей интоксикацией. Возбудители - *C. pneumoniae*. По современной классификации, хламидии относятся к типу *Chlamydiae*, классу *Chlamydiae*, семейству *Chlamydiaceae*, роду *Chlamydia*. Вид *C. pneumoniae* имеет три биовара, из которых штаммы биовара TWAR являются возбудителями заболеваний дыхательных путей человека.

Хламидии - абсолютные внутриклеточные энергетические паразиты. В отличие от других бактерий, хламидии обладают разобщенным репродуктивным циклом. Клеточная стенка хламидий напоминает таковую грамотрицательных бактерий, но отличается отсутствием мурамовой кислоты. Хламидии обладают родоспецифическим полисахаридным антигеном и видоспецифическим антигеном белковой природы.

C. pneumoniae обладают выраженным тропизмом к эпителию дыхательных путей. Хламидии могут вызывать фарингиты, ларингиты, бронхиты, а также тонзиллиты, синуситы, отиты. Инкубационный период - 7-10 дней. Внедряясь в легочную ткань и размножаясь там, хламидии вызывают гибель клеток и тяжелое воспаление легких.

Развитие хронических заболеваний, вызванных *C. pneumoniae*, объясняют персистенцией возбудителя в организме, в результате которой развиваются иммунопатологические процессы, в развитии которых принимает участие белок теплового шока (HSP).

Для диагностики используют серологический метод исследования, необходимое условие которого - использование диагностикума из видоспецифического антигена, в противном случае будут получены ложноположительные результаты с сыворотками лиц, инфицированных *C. trachomatis* (см. модуль 15).

12.3.4. Орнитоз

Орнитоз - инфекционная болезнь, характеризуемая первичным поражением органов дыхательных путей, а также нервной системы, паренхиматозных органов, с явлениями общей интоксикации, которая развивается в результате инфицирования человека *Chlamydia psittaci* (8 сероваров) от птиц (от греч. *psittakos*- «попугай», лат. *ornis* - «птица»). Источник инфекции - дикие, домашние и декоративные птицы - инфицированные или бессимптомные бактерионосители. От человека к человеку заболевание передается очень редко. Механизм заражения - респираторный, пути заражения - воздушно-пылевой при вдыхании пыли, зараженной выделениями больных птиц.

Входные ворота для возбудителя - слизистые оболочки дыхательных путей. Возбудитель размножается в эпителии бронхиального дерева, альвеолярном эпителии, а также в макрофагах. Развивается воспаление, происходит разрушение клеток, возникают бактериемия, токсинемия, аллергизация макроорганизма, поражение паренхиматозных органов. Возможны осложнения со стороны сердечно-сосудистой системы, ЦНС, развитие генерализованной формы хламидийной инфекции. Иммуитет имеет нестерильный характер, преимущественно клеточный. Возможны повторные случаи заболевания. Длительно может сохраняться гиперчувствительность к антигенам возбудителя, которые выявляют при постановке внутрикожных проб.

Лабораторную диагностику проводят серологическим методом в комплексе с диагностикой атипичных пневмоний другой этиологии.

12.3.5. Респираторный микоплазмоз

Респираторный микоплазмоз вызывают *M. pneumoniae*, которые относятся к роду *Mycoplasma*. Это короткие нитевидные микроорганизмы, у которых отсутствует клеточная стенка. Клетки обладают скользящей подвижностью. Размножаются путем бинарного деления и высвобождения элементарных телец из нитей. Микоплазмы растут на питательных средах с лошадиной сывороткой и дрожжевым экстрактом. Колонии появляются через 5-10 дней. *M. pneumoniae* обладают гемолитической активностью, цитотоксическим действием, вызывают агрегацию эритроцитов человека и животных.

Заболевание характеризуется поражением верхних, а также глубоких отделов дыхательных путей и входит в группу атипичных пневмоний бактериальной этиологии. Заболевание передается от человека к человеку воздушно-капельным путем. Инфекционный процесс начинается с прикрепления микроорганизма к рецепторам эпителиальных клеток дыхательных путей. Возбудитель поражает клетки реснитчатого эпителия. Адгезия микоплазм к эпителиальным клеткам приводит к инвагинации клеточных мембран и делает находящиеся в них микоплазмы недоступными для воздействия антител, комплемента и других защитных факторов. Инкубационный период составляет 1-3 нед, лихорадочный - до 4 нед. Особенности заболевания - относительно слабая контагиозность и высокая частота бессимптомных и легких форм инфекции. Возможны гематогенная диссеминация в суставы, костный мозг, мозговые оболочки, а

также развитие иммунопатологических процессов. После перенесенного заболевания формируется непродолжительный иммунитет.

Лабораторную диагностику проводят бактериологическим, серологическим методами и ПЦР. Материалы для исследования - мазки из носоглотки, мокрота, лаважная жидкость. Для обнаружения антигенов *M. pneumoniae* в исследуемом материале используют РИФ.

При бактериологическом исследовании материал для исследования засевают в жидкие среды с последующим субкультивированием на плотных средах или в двухфазную среду, на которых через 2-3 сут изучают выросшие колонии.

ПЦР используют для подтверждения диагноза.

Серологический метод используют как основной при диагностике атипичных пневмоний неясной этиологии. Диагноз ставят на основании определения титров антител в сыворотке больного в реакциях ИФА или РСК. Для исследования берут парные сыворотки, в которых определяют 4-кратное увеличение титра антител. В качестве антигена в РСК используют гликолипиды, а в ИФА - белковый антиген.

Вопросы для самоконтроля

Составьте пары «вопрос-ответ».

1. Среда Борде-Жангу	А. Выделение возбудителя дифтерии
2. Среда Левенштейна-Йенсена	Б. Выделение возбудителя коклюша
3. Среда Клауберга	В. Выделение возбудителя туберкулеза
4. Шоколадный агар	Г. Выделение гемофильной палочки

5. Основной метод диагностики атипичных пневмоний - ...
6. Серологический метод при диагностике дифтерии используют для .
7. Реакцию Манту ставят для .
8. При диагностике неспецифических инфекций дыхательных путей мокроту перед посевом необходимо .

МОДУЛЬ 13. ВОЗБУДИТЕЛИ РАНЕВОЙ ИНФЕКЦИИ: ОСНОВНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, ПРИНЦИПЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Цели модуля

- Знать: этиологическую структуру раневой гнойно-септической инфекции и методы ее диагностики.
- Уметь: подбирать питательные среды для выделения возбудителей раневой инфекции и схемы их выделения и идентификации.
- Владеть: методами забора, транспортировки и хранения материала для исследования из очага воспаления.

Возбудители гнойно-воспалительных, гнойно-септических раневых инфекций распространены повсеместно и встречаются очень часто. Особую проблему, в отличие от спорадических случаев, представляют гнойно-септические инфекции, которые возникают в стационарах и осложняют течение послеоперационного периода, заживление ожогов, послеродовой период у родильниц. Наибольшее разнообразие клинических форм гнойно-септических инфекций наблюдают в отделениях новорожденных.

Раневая инфекция характеризуется образованием гнойного или серозно-гнойного экссудата. Она может иметь различную локализацию и характеризуется полиэтиологичностью. Возбудителями могут быть грамотрицательные факультативно-анаэробные (ферментирующие) и аэробные (неферментирующие) палочки, стафилококки и стрептококки, неспорообразующие анаэробы и клостридии, а также грибы (табл. 13.1).

Патологические процессы, связанные с поражением определенных участков тела человека, вызываются определенными микроорганизмами: кожи - стафилококками; мочевыводящих путей - кишечными бактериями, псевдомонадами. При этом наблюдают особенности тканевых реакций, вызываемых отдельными возбудителями. Так, стафилококки вызывают быстрый некроз и раннее нагноение с большим количеством гноя, бета-гемолитические стрептококки группы А быстро распространяются по тканям, вызывая массивный отек и эритему. Анаэробные бактерии - причина некроза и большого количества коричневого гноя с неприятным запахом.

Основной метод диагностики - бактериологический.

Таблица 13.1. Этиологическая структура раневых аэробных и анаэробных инфекций

Аэробы и факультативные анаэробы			Анаэробы	
грамположительные кокки	граммотрицательные палочки		спорообразующие палочки клостридии (грамположительные)	неспорообразующие бактерии
	энтеробактерии	неферментирующие бактерии		
<i>Staphylococcus spp.</i> (<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> и др.). <i>Streptococcus spp.</i> (<i>S. pyogenes</i> , <i>S. agalactiae</i> и др.). <i>Enterococcus spp.</i> (<i>E. fecalis</i> , <i>E. fecium</i>)	<i>E. coli</i> . <i>Proteus spp.</i> <i>Klebsiella spp.</i> <i>Enterobacter spp.</i> <i>Citrobacter spp.</i> <i>Erwinia spp.</i> <i>Serratia spp.</i> <i>Providencia spp.</i> и др.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> . <i>Acinetobacter spp.</i> <i>Kingella spp.</i> <i>Moraxella spp.</i> и др.	Возбудители газовой гангрены: <ul style="list-style-type: none"> • <i>C. perfringens</i>; • <i>C. septicum</i>; • <i>C. histolyticum</i>; • <i>C. ramosum</i> и др. 	Грамотрицательные и грамположительные палочки и кокки: <ul style="list-style-type: none"> • <i>Bacteroides spp.</i>; • <i>Porphyromonas spp.</i>; • <i>Fusobacterium spp.</i>; • <i>Peptococcus spp.</i>; • <i>Peptostreptococcus spp.</i>; • <i>Veillonella spp.</i> и др.
				Возбудитель столбняка - <i>C. tetani</i>

13.1. ДИАГНОСТИКА РАНЕВОЙ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ КИСЛОРОДОРЕЗИСТЕНТНЫМИ БАКТЕРИЯМИ

Основные возбудители - грамотрицательные факультативно-анаэробные (ферментирующие) и аэробные (неферментирующие) палочки, стафилококки и стрептококки.

Ранее единственным патогенным видом стафилококков считали *S. aureus*, для быстрой идентификации которого используют тест на плазмокоагулазу. В настоящее время известно 36 видов и около 30 подвидов стафилококков, которые все считаются условно-патогенными. Исследования последних лет показали, что коагулазоотрицательные стафилококки, которые долгое время считали нормальными обитателями кожи и слизистых оболочек, проявляют себя как возбудители внутрибольничных инфекций. При этом выделенные штаммы содержат R-плазмиды и продуцируют бета-лактамазу. В этом случае эпидермальный стафилококк является источником R-плазмиды для приобретения устойчивости золотистым стафилококком. Также известно, что 90% госпитальных штаммов *S. aureus* обладают резистентностью к пенициллину в результате продукции бета-лактамазы. Наряду со штаммами, продуцирующими бета-лактамазу, в стационарах циркулируют метициллинорезистентные стафилококки. Такие штаммы резистентны ко всем бета-лактамам препаратам, включая цефалоспорины, а также одновременно могут быть устойчивыми к эритромицину, тетрациклину, клиндамицину, хлорамфениколу (левомицетину[⚡]) и аминогликозидным препаратам. *S. saprophyticus* - возбудитель инфекций мочевыводящей системы.

К роду *Pseudomonas* относят возбудителей, обитающих в окружающей среде и при определенных условиях способных вызывать заболевание у человека. Наиболее патогенная бактерия - *Pseudomonas aeruginosa* (синегнойная палочка) - грамотрицательная подвижная палочка, широко распространенная в окружающей среде. Возбудитель не образует спор, образует большое количество слизи, имеет пили 4-го типа, которые участвуют в формировании биопленки на медицинских инструментах. *Pseudomonas aeruginosa* обладает оксидазной активностью, сахара окисляет, но не ферментирует с образованием кислот и газа. Обладает протеолитической активностью: вырабатывает пигмент пиоцин, имеющий сине-зеленый цвет (рис. 13.1), и бактериоцины.

Источником *Pseudomonas aeruginosa* могут быть любые предметы - умывальные раковины, водопроводные краны, медицинский инструментарий. Культуры синегнойной палочки сохраняют жизнеспособность даже в растворах дезинфицирующих веществ [нитрофурале (фурацилине[⚡])], предназначенных для хранения катетеров и медицинских инструментов, промывания ран.



Рис. 13.1. Продукция пигмента *P. aeruginosa*

Это связано с ограниченной потребностью возбудителя в питательных веществах. *Pseudomonas aeruginosa* вырабатывает токсины (цитотоксин А, экзотоксины S), ферменты патогенности (гемолизины, эластазу, фосфолипазу С, нейраминидазу), обладает секреторной системой 3-го типа. Возбудитель проникает в организм обычно через поврежденные ткани; прикрепляясь, заселяет раневую или ожоговую поверхность, слизистые оболочки и размножается. При отсутствии у человека иммунной реакции процесс принимает генерализованное течение с образованием вторичных гнойных очагов инфекции. *Pseudomonas aeruginosa* вызывает гнойно-воспалительные заболевания различной локализации - раневую и ожоговую инфекции, инфекции мочевыводящей системы, менингиты, пневмонию и др. Тяжелые осложнения - синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания, шок, респираторный дистресс-синдром.

Acinetobacter spp. - мелкие грамотрицательные коккобациллы, обитающие в окружающей среде и обладающие природной устойчивостью к большинству антибиотиков. Возбудитель колонизирует предметы в местах высокой влажности и вызывает вспышки мультирезистентных инфекций, протекающих в виде пневмоний, менингита и инфекций мочевыводящих путей. В группу риска входят пациенты, принимающие антибиотики, у которых установлены катетеры.

Лабораторную диагностику проводят бактериологическим методом. Материал от больного следует забирать до назначения антибактериальной терапии. Если лечение уже

начато, материал забирают не ранее чем через 4-6 ч после последнего введения антибиотика.

Перед взятием материала из очага воспаления необходимо обработать антисептиком прилежащие участки кожи вокруг раны, чтобы предотвратить его контаминацию микроорганизмами нормальной микрофлоры.

Материал лучше забирать шприцем, так как использование тампона не позволяет взять большого количества отделяемого. Тампон для взятия гноя может быть использован в виде исключения, когда имеется очень малое его количество или когда экссудат отбирают из такой деликатной анатомической области, как, например, из глаза. При этом с помощью тампона следует собрать как можно больше экссудата и затем поместить тампон в стерильную пустую пробирку или флакон с транспортной средой.

Посев исследуемого материала следует проводить непосредственно у постели больного. При невозможности посева у постели больного исследуемый материал отбирают в стерильную посуду (пробирку или флакон с транспортной средой) и немедленно доставляют в лабораторию. Для сохранения анаэробов исследуемый материал доставляют в шприце с резиновой пробкой, надетой на иглу. Алгоритм исследования показан на рисунке 13.2.

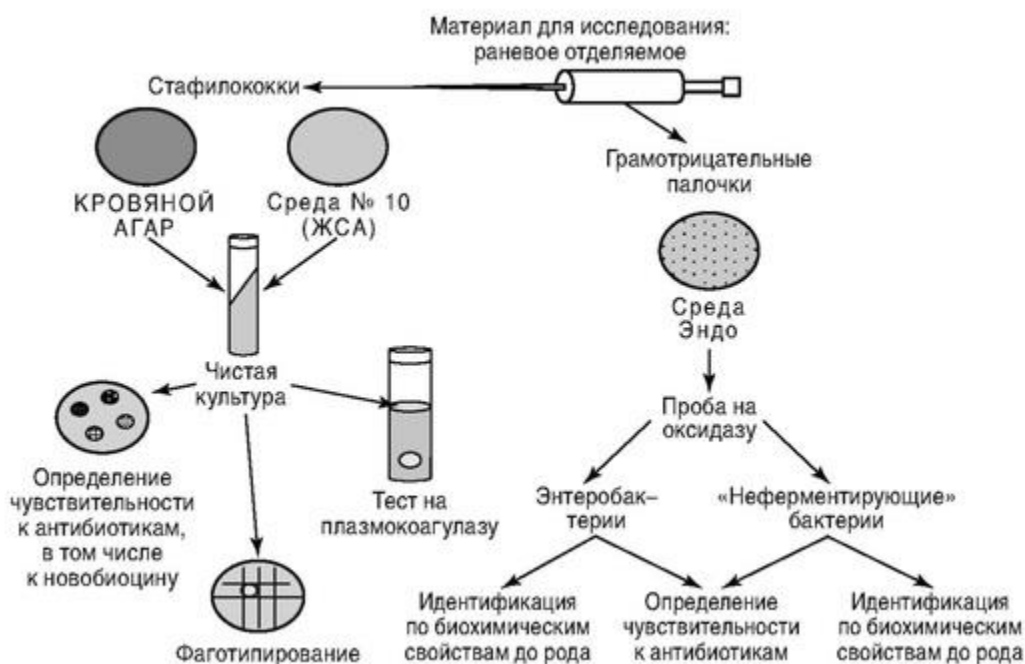


Рис. 13.2. Алгоритм диагностики раневой инфекции

Микроскопическое исследование доставленных в лабораторию образцов позволяет наметить схему дальнейшего бактериологического исследования, провести правильный подбор питательных сред для посева исследуемого материала. В качестве питательных сред используют кровяной агар, среду № 10 (для выделения стафилококков; см. приложение), среды для выделения грамотрицательных палочек семейства *Enterobacteriaceae* и псевдомонад - Эндо, Левина и др. После посева чашки Петри помещают в термостат при температуре 37 °С на 18 ч. По истечении срока инкубации оценивают рост колоний на питательных средах, проводят микроскопию выросших колоний, по результатам культуральных и морфологических характеристик проводят идентификацию и определение чувствительности к антибиотикам. Этапы исследования представлены в таблице 13.2.

Таблица 13.2. Этапы микробиологического исследования раневого отделяемого

Этап	Ход исследования	Результат
I	<ul style="list-style-type: none"> • Микроскопия мазка из отделяемого раны. • Посев отделяемого раны на питательные среды, выбранные по результату микроскопии 	
II	<ul style="list-style-type: none"> • Микро- и макроскопическое исследование выросших колоний. • Подбор схемы идентификации возбудителя. • Приготовление суспензии в физиологическом растворе выросшей колонии. • Посев на выбранные для идентификации среды. • Посев бактериальной суспензии на питательный агар для определения чувствительности к антибиотикам 	
III	<ul style="list-style-type: none"> • Идентификация выделенной чистой культуры с использованием схемы или таблицы. • Определение чувствительности к антибиотикам. • Проведение при необходимости внутривидовой идентификации 	
Заключение		

Для биохимической идентификации грамотрицательных палочек обязательно ставят тест на оксидазу, результат которого определяет дальнейший ход идентификации. При положительном результате теста дальнейшую идентификацию проводят по схеме неферментирующих грамотрицательных палочек. При отрицательном результате теста идентификацию проводят по схеме идентификации бактерий семейства *Enterobacteriaceae*. Для этого используют среду Клиглера, цитратный агар Симмонса, среду с добавлением триптофана, среду с мочевиной. Идентификацию можно проводить в соответствии с рисунком 13.3. По схеме определяют таксономическое положение выделенной чистой культуры, при необходимости проводят ее серотипирование.

Для идентификации стафилококка делают посев на кровяной агар, на поверхность которого помещают диск с новобиоцином, а также на среды Гиса с маннитом и определяют активность плазмокоагулазы. Для этого в пробирку с 1 мл цитратной плазмы кролика вводят 2-3 петли культуры стафилококка, пробирку помещают в термостат, проверяют образование сгустка. Посевы помещают в термостат, после чего проводят учет биохимической активности выделенной чистой культуры.

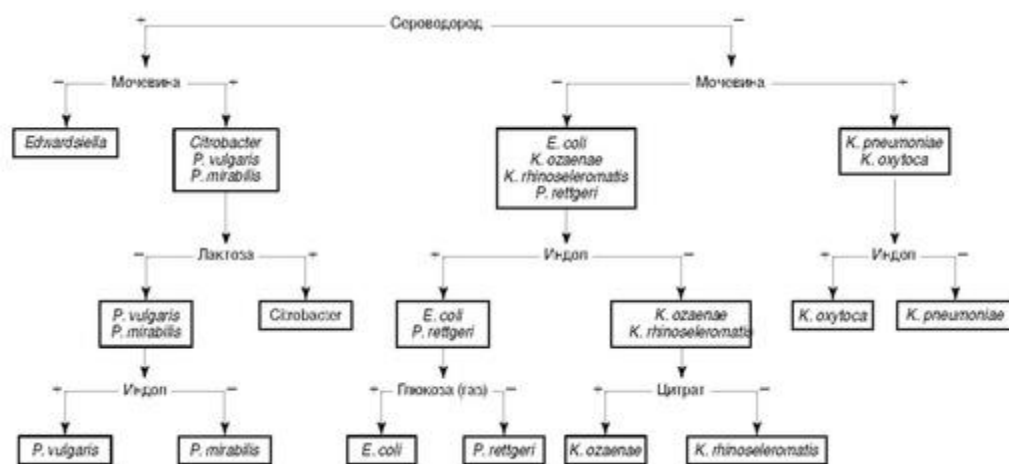


Рис. 13.3. Схема биохимической идентификации грамотрицательных оксидазонегативных палочек

Идентификацию стафилококка проводят, используя таблицу 13.3.

Таблица 13.3. Дифференциация стафилококков

Признак	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. saprophyticus</i>
Плазмокоагулаза	+	-	-
Гемолиз	+	+/-	-
Расщепление маннита	+	-	-
Чувствительность к новобицину	Чувствительны	Чувствительны	Резистентны

13.2. ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗВАННЫХ НЕСПОРООБРАЗУЮЩИМИ АНАЭРОБНЫМИ БАКТЕРИЯМИ

Неспорообразующие анаэробы формируют основную биомассу нормальной микрофлоры организма человека. Они присутствуют в кишечнике, ротовой полости, на слизистых оболочках половых органов, коже. Среди них выделяют грамотрицательные палочки (группу *Bacteroides fragilis*, представителей родов *Prevotella*, *Porfiromonas*, *Fusobacterium*), грамположительные бактерии (родов *Peptostreptococcus*, *Peptococcus*).

Инфекции, вызванные анаэробными неспорообразующими бактериями, носят эндогенный характер. Они возникают при попадании микрофлоры организма в стерильные полости и органы (например, при перфорации кишечника). Условия, необходимые для их роста, возникают в условиях ишемии, например, при ущемлении грыжи. При развитии анаэробной инфекции их рост стимулируют выделяемые ими продукты метаболизма. Кроме того, интоксикация организма факторами воспаления приводит к усилению повреждения тканей в очаге воспаления и способствует дальнейшему распространению инфекции. При отсутствии лечения анаэробный сепсис быстро прогрессирует, развивается септикопиемия. Внутривентриальный анаэробный сепсис возникает в результате спонтанной перфорации стенки кишечника или повреждения ее во время хирургических операций, приводя к формированию абсцессов. Дисбаланс микрофлоры влагалища у женщин приводит к бактериальному вагинозу. Анаэробные инфекции могут возникать на фоне аспирационной пневмонии, при этом возникают абсцессы легкого. Абсцесс мозга как осложнение гнойного синусита может

развиться вследствие анаэробной инфекции. Анаэробы могут размножаться в хронических кожных язвах нижних конечностей.

Bacteroides fragilis - возбудитель тяжелых анаэробных инфекций, обладает рядом факторов патогенности - капсулой с антифагоцитарной активностью, вырабатывает гепариназу, нейраминидазу, ДНКазу, протеазу. Чаще всего он становится причиной осложнений после хирургических вмешательств на органах брюшной полости, малого таза, а также входит в состав микрофлоры, выделяемой при абсцессах мозга, печени, легких. Бактерии родов *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium* локализуются в ротовой полости и на слизистых оболочках половых органов. Они вызывают гингивит, абсцессы полости рта, воспаление околоносовых пазух, абсцессы мозга и легкого. Фузобактерии совместно с *Treponema viscentii* вызывают язвенно-пленчатую ангину Венсана.

Лабораторная диагностика. Анаэробные бактерии требовательны к условиям культивирования, кислород для них губителен, поэтому забор материала осуществляют шприцем с притертым поршнем, из которого удален воздух. Транспортировку материала следует осуществлять в шприце, надев на иглу стерильную резиновую пробку, или в пробирке со специальной транспортной средой, герметично закрытой резиновой пробкой.

- 1-й этап - посев материала на плотные среды для получения отдельных колоний в анаэробных условиях (анаэробный бокс). Анаэробная инкубация (анаэроостат, анаэробный бокс) - 24-72 ч при температуре 37 °С.

- 2-й этап:

- макро- и микроскопическое изучение выросших колоний;

- параллельный посев изолированных колоний на две чашки Петри с кровяным агаром для бактероидов (кровяной агар с добавлением дрожжевого экстракта, цистеина, гемина, неомидина). Первую чашку инкубируют в анаэробных условиях в течение 24-72 ч при температуре 37 °С; вторую чашку инкубируют в аэробных условиях (строгие анаэробы не дают роста).

- 3-й этап - биохимическая идентификация колоний, выросших в анаэробных условиях.

- 4-й этап - учет результатов.

13.3. ДИАГНОСТИКА КЛОСТРИДИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Клостридии - грамположительные спорообразующие палочки, анаэробы. Нормальная их среда обитания - почва, вода, кишечник человека и животных. Заболевание у человека развивается в результате продукции бактериями токсинов.

C. perfringens, а также *C. septicum*, *C. novyi*, *C. histolyticum*, *C. sordelii* - возбудители газовой анаэробной инфекции. *C. perfringens* обладает капсулой и образует ряд токсинов, наиболее важный из которых альфа-токсин (лецитиназа С). В анаэробной среде возбудители начинают активно размножаться, продуцируя токсины, которые вызывают дальнейшее повреждение тканей. Гангрена развивается примерно в течение 3 дней от момента инфицирования. В области входных ворот наблюдается болевой синдром, кожа напряжена, синюшного оттенка, отмечаются крепитация при пальпации, неприятный запах. Диагностику проводят бактериологическим методом, а также с помощью постановки биопробы, газожидкостной хроматографии.

Лабораторная диагностика. Материалы для исследования - раневое отделяемое, кровь, кусочки поврежденных тканей, секционный, перевязочный и шовный материалы.

- На первом этапе исследования проводят микроскопию нативного материала, посев для выделения чистой культуры, ставят биопробу.

— Для микроскопирования тампонами из исследуемого материала готовят несколько мазков, которые окрашивают по Граму, Цилю-Нильсену (для выявления спор) и Бурри (для выявления капсулы).

— Посев нативного материала проводят на сахарно-кровяной агар, среды тиогликолевую и Китта-Тароцци, инкубируют в анаэроостате при температуре 37 °С. Кровь засевают в жидкую среду в соотношении 1:10.

— Биопробу ставят на белых мышах и морской свинке, вводя 0,5 мл материала в бедро задней лапки. У погибших животных исследуют ткань из места заражения и внутренние органы - кровь, печень, селезенку. В случае наличия в материале *C. tetani* у животных развивается клиническая картина восходящего столбняка.

• На втором этапе изучают результаты посева. На кровяном агаре клостридии растут в виде крупных плоских колоний, вызывающих гемолиз. Из выросших колоний готовят мазки, которые окрашивают по Граму, делают пересев в глубину среды для контроля стерильности, проводят тест на аэротолерантность, для чего колонии засевают на двух чашках кровяного агара секторами: одну из чашек культивируют в анаэроостате, другую - в кислородных условиях.

• На третьем этапе проводят идентификацию выделенной чистой культуры, определяют тип токсина в реакции нейтрализации на мышах или серологическими методами. Для проведения реакции нейтрализации центрифугат, содержащий экзотоксин из выделенной чистой культуры возбудителя, смешивают с антитоксическими сыворотками и после экспозиции 40 мин вводят мышам. Первичный учет результата проводят через 6 ч, окончательный - через 4 сут. Идентификация клостридий по биохимическим свойствам представлена в таблице 13.4.

Таблица 13.4. Идентификация бактерий рода *Clostridium* по биохимическим свойствам

Вид	Капсула	Лецитиназа	Индол	Подвижность	Лактоза	Сахароза	Маннит
<i>C. perfringens</i>	+	+	-	-	+	+	+
<i>C. novyi</i>	-	+	-	+	-	-	-
<i>C. septicum</i>	-	-	-	+	+	-	-
<i>C. tetani</i>	-	-	+	+	-	-	-

Экспресс-диагностика позволяет дать предварительный ответ через 3 ч. Для этой цели используют РИФ и газожидкостную хроматографию (ГЖХ). Диагностика с помощью ГЖХ основана на обнаружении в исследуемом материале летучих жирных кислот - продуктов метаболизма клетки клостридий. Каждый вид клостридий вырабатывает определенный спектр жирных кислот.

Метод ускоренной бактериологической диагностики включает посев исследуемого материала на среду Вильсона-Блера и лакмусовое молоко. Предварительный ответ можно получить через 4-6 ч после посева. На среде Вильсона-Блера наблюдают почернение и разрыв среды в результате газообразования; лакмусовое молоко створаживается (рис. 13.4).

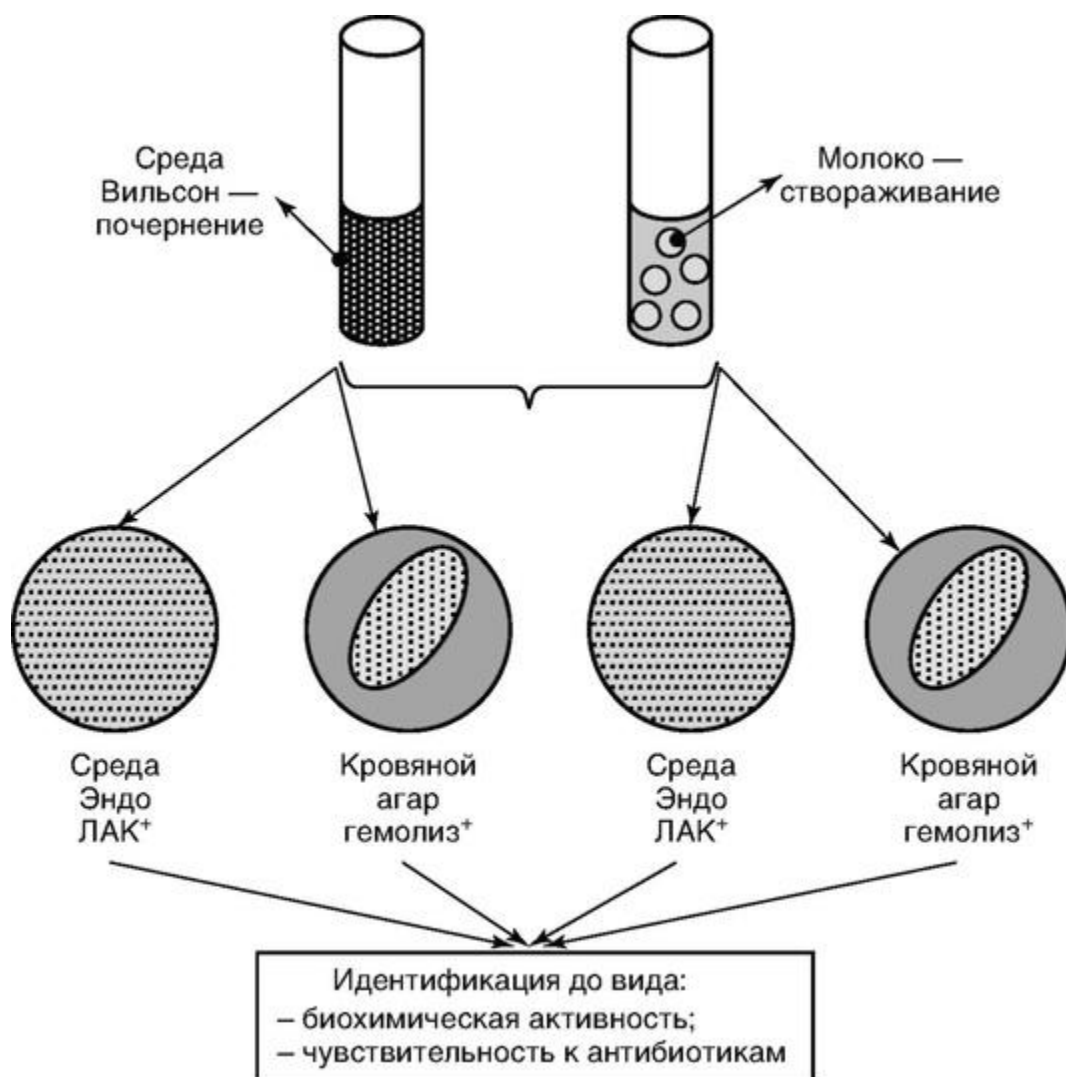


Рис. 13.4. Схема ускоренной бактериологической диагностики кластридиальной инфекции

Вопросы для самоконтроля

Составьте пары «вопрос-ответ».

1. Среда № 10	А. Выделение грамотрицательных кислородорезистентных палочек
2. Среда Вильсона-Блера	Б. Выделение кластридий
3. Среда Эндо	В. Выделение неспорообразующих анаэробов
4. Кровяной агар для бактериоидов	Г. Выделение стафилококков

5. Обязательный тест для дифференциации стафилококков -

6. Обязательный биохимический тест при дифференциации грамотрицательных палочек - .

7. Биопробу ставят при диагностике .

МОДУЛЬ 14. ВОЗБУДИТЕЛИ ЗООНОЗНЫХ ИНФЕКЦИЙ (ЧУМЫ, ТУЛЯРЕМИИ, СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ): ОСНОВНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, ПРИНЦИПЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Цели модуля

- Знать: основные свойства возбудителей зоонозных бактериальных инфекций и методы диагностики вызываемых ими заболеваний.
- Уметь: выбирать материал для исследования и метод исследования.
- Владеть: методами оценки результатов проведенных лабораторных исследований.

14.1. ДИАГНОСТИКА ЧУМЫ

Чума - острая, особо опасная, сопровождаемая высокой летальностью инфекционная болезнь, общая для людей и животных. Постоянный резервуар инфекции в природе представлен определенными видами грызунов и зайцеобразными.

Возбудитель чумы - *Yersinia pestis* - короткая грамотрицательная палочка овоидной формы, неподвижная, не образующая спор, образует нежную капсулу. При выращивании на жидких питательных средах возбудитель чумы образует поверхностную пленку, от которой спускаются нити и придонный осадок, оставляя среду прозрачной. На твердых питательных средах возбудитель первоначально растет в виде кружевных платочков, в центре которых в последующем образуется уплотнение, формирующее выпуклый зернистый центр колонии, окруженный светлой зоной. Рост возможен при температуре 2-40 °С, оптимальная температура 28 °С. *Yersinia pestis* ферментирует до кислоты глюкозу, декстрин и ряд других сахаров. Не ферментирует сахарозу и рамнозу, не расщепляет мочевины, не разжижает желатин, не продуцирует индол.

Обладает факторами патогенности, определяющими его антифагоцитарные и инвазивные свойства. Антифагоцитарные свойства обеспечиваются капсульным F₁-антигеном, эффекторными белками III типа секреторной системы (VW-антигенами), ферментами аденилатциклазой и супероксиддисмутазой. Инвазивные свойства связаны с фибринолизинном и плазмокоагулазой, активирующей плазминоген протеазу. Обладает термолабильным F₁-антигеном, соматическим O-антигеном, VW-антигенами. Патогенез чумы тесно связан со способностью возбудителя быстро размножаться после проникновения в организм, накапливаться в барьерных системах и вызывать сепсис, ведущий к летальному исходу.

Лабораторная диагностика. Для лабораторной диагностики чумы используют бактериоскопический, бактериологический, биологический, серологический и молекулярно-генетические методы. В качестве экспресс-методов используют РИФ и ПЦР. Диагноз чумы у людей ставят на основании выявления у них возбудителя - выделения и идентификации культуры, обнаружения специфического для чумного микроорганизма F₁-антигена и специфических антител к F₁-антигену в сыворотках больных и переболевших. Все исследования проводят в соответствии с требованиями санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности».

Материалы для исследования - мокрота, пунктат бубона, кровь, моча, кал, отделяемое язв, спинномозговая жидкость.

• На первом этапе исследования из материала готовят мазки, которые окрашивают по Граму, Романовскому-Гимзе и обрабатывают чумным люминесцирующим иммуноглобулином. Проводят исследование нативного материала методом ПЦР, определение в нем F₁-антигена методом РПГА или ИФА и выполняют посев на

питательные среды, содержащие стимуляторы роста (сульфит натрия, гемолизированную кровь) и генцианвиолет (в качестве ингибитора посторонней микрофлоры). Также ставят пробу с диагностическими бактериофагами на плотной питательной среде.

Предварительный результат получают через 2-5 ч на основании наличия в мазках биполярно окрашенных грамотрицательных овоидных палочек (рис. 14.1), их специфического свечения при постановке РИФ, положительной ПЦР, положительной реакции обнаружения F₁-антигена.

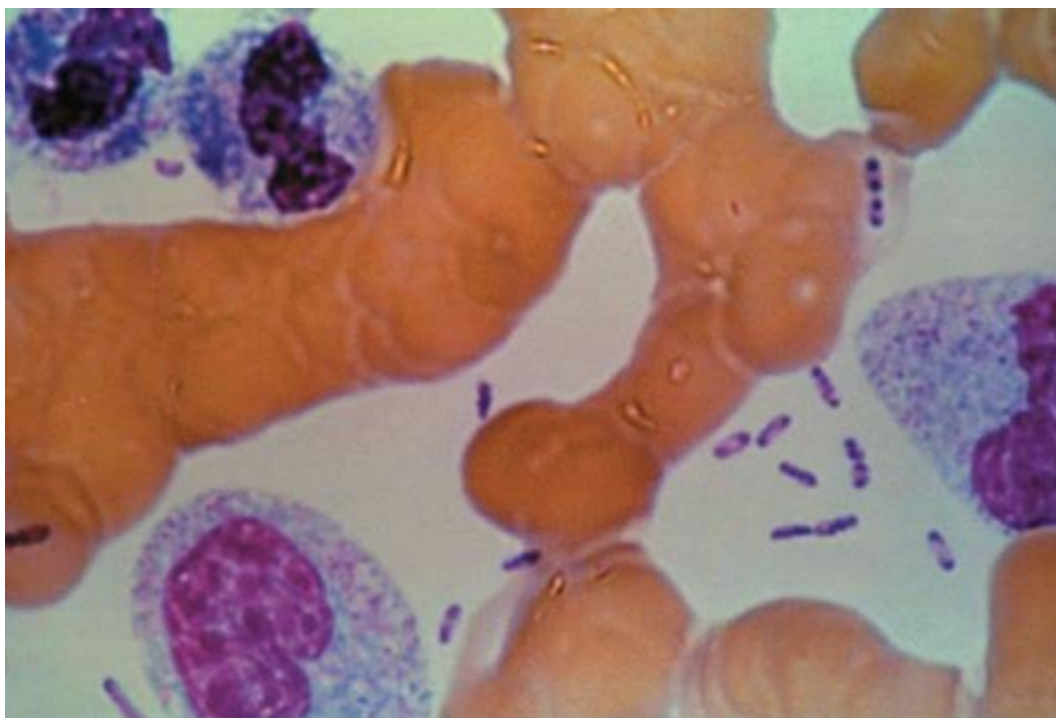


Рис. 14.1. *Y. pestis* в бубоне

- На втором этапе исследования через 24-48 ч получают подтверждение предварительного положительного ответа на основании характерного роста на питательных средах, наличия в мазках из этих сред грамотрицательных овоидных палочек с биполярным окрашиванием, положительной пробы с бактериофагами (лизис культуры чумными бактериофагами Л-413С). Проводят пересев на агар, содержащий 5% дефибринированной крови для определения продукции F₁-антигена при температуре 37 °С и проводят идентификацию по биохимическим свойствам. Также определяют плазмидный профиль выделенной культуры возбудителя.

Окончательный положительный ответ получают на основании выделения чистой культуры *Yersinia pestis* из посевов нативного материала, его идентификации по морфологическим, культуральным, биохимическим признакам, чувствительности к диагностическим бактериофагам, наличия специфических плазмид.

Биопробу проводят для выделения чистой культуры из материала, загрязненного посторонней микрофлорой. Материал при этом втирают морской свинке в выбритый участок области живота. После гибели животных проводят вскрытие и высевают из крови и всех органов.

Серологическое исследование проводят путем определения нарастания титра антител в парных сыворотках методами ИФА и РПГА к антигену.

14.2. ДИАГНОСТИКА ТУЛЯРЕМИИ

Туляремия - системное природно-очаговое заболевание человека и животных, вызываемое *Francisella tularensis*. Возбудитель представляет собой мелкие, неспорообразующие неподвижные грамотрицательные палочки. В мазках из патогенного материала, окрашенных по Романовскому-Гимзе, выявляют нежную капсулу. *Francisella tularensis* - аэроб, не растет на простых питательных средах. Его культивируют на средах, содержащих яичный желток, на кровяном агаре с добавлением глюкозы и цистеина, на глюкозо-сывороточном агаре. Растет в течение 2-5 сут, оптимальная температура роста 37 °С. Обладает слабой ферментативной активностью (утилизует до кислоты на специальных средах немногие углеводы - глюкозу, декстрин; продуцирует сероводород). Имеет два антигена - О и Vi; О-антиген имеет родство с антигенами бруцелл. Факультативный внутриклеточный паразит, избегающий переваривания в фагоците, способный размножаться в нем, что составляет основу патогенеза. Патогенен для теплокровных животных с размножением в паренхиматозных органах и развитием геморрагической септицемии.

Вид *Francisella tularensis* подразделяют на четыре подвида - *Holarctica*, *Tularenis*, *Mediaasiatica*, *Novicida*, которые различаются по ареалу их циркуляции, антигенной структуре, патогенности для человека и животных, биохимическим свойствам (подвид *Novicida* не имеет большого значения в патологии человека).

Лабораторная диагностика. Диагностические исследования на туляремию проводят в лабораториях диагностики особо опасных инфекций в соответствии с требованиями, регламентирующими безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности.

Для лабораторной диагностики туляремии у человека применяют серологический метод, кожно-аллергическую пробу и биопробу. Непосредственное выделение возбудителя из материала от больного (крови, пунктата бубона, мокроты, отделяемого конъюнктивы) удается редко, поэтому выделение возбудителя из материала от больного проводят постановкой биопробы. Для этого проводят подкожное заражение белых мышей или внутрибрюшинное заражение морских свинок материалом от больного. Животные обычно погибают в течение 3-5 сут. При отсутствии гибели животных выдерживают до 25 сут, после чего забивают. Из погибших животных выделяют печень и селезенку, которые засевают на специальные (обычно желтоксодержащие) среды, на которых уже через 24 ч появляется рост возбудителя. Идентификацию выросшей культуры проводят по морфологическим, культуральным, биохимическим и антигенным свойствам. Внутривидовую идентификацию проводят по тестам, приведенным в таблице 14.1.

Таблица 14.1. Внутривидовая идентификация *Francisella tularensis*

Признак	Подвид			
	<i>Holarctica</i>	<i>Tularenis</i>	<i>Mediaasiatica</i>	<i>Novicida</i>
Ферментация глицерина	-	+	+	+
Цитруллинуреидазная активность	-	+	+	+
Вирулентность для кролика	-	+	-	-
Ферментация сахарозы	-	-	-	+

На территории стран СНГ в основном циркулирует подвид *Holarctica*, который разделяют на два биовара, различающиеся по чувствительности к эритромицину, - ery(s) и ery(r). Для их определения используют диск, содержащий 15 мкг эритромицина. Биовар

ery(s) вокруг диска образует зону ингибиции роста 20-30 мм, биовар ery(r) дает ровный рост.

Серологические методы диагностики туляремии включают реакции, направленные как на выявление антигенов возбудителя туляремии в исследуемом материале [прямой метод РИФ, реакция нейтрализации антител (РНат)], так и реакции, предназначенные для определения антител к возбудителю (РА, РПГА, непрямой метод РИФ).

РПГА - наиболее чувствительный метод определения антител. Она становится положительной в конце первой недели заболевания. Испытуемую сыворотку разводят физиологическим раствором в соотношении 1:25, инактивируют в течение 30 мин при температуре 56 °С, затем сыворотку разводят 1:50 и далее.

Оценка результатов исследования в РПГА у людей:

- титр 1:50 - реакция сомнительная;
- титр 1:100 и выше - реакция положительная.

РА (реакция агглютинации) служит для установления диагноза у больного и переболевшего (ретроспективный диагноз) и может быть использована при изучении иммунологического состояния организма, привитого против туляремии. Появление агглютининов у больных отмечается через 10-15 дней, при этом титр не превышает 1:50-1:100, но далее нарастает, достигая на 4-6-й неделе болезни 1:400-1:800. Антигеном для постановки РА служит туляремийный диагностикум, представляющий собой убитую формалином взвесь туляремийных бактерий вакцинного штамма.

Прямой метод РИФ эффективен при исследовании патологического материала от больных людей и животных. В качестве объектов, подвергаемых исследованию на обнаружение возбудителя туляремии у человека с помощью РИФ, используют мазки, приготовленные из кожного аффекта, пунктата бубона, отделяемого слизистой оболочки глаза. Для обнаружения возбудителя туляремии применяют люминесцирующие туляремийные иммуноглобулины.

Для постановки кожно-аллергической пробы применяют тулярин - взвесь туляремийных бактерий вакцинного штамма, убитых нагреванием в течение 1 ч при температуре 70 °С. Взвесь готовят в физиологическом растворе, содержащем 3% глицерина. В 1 мл препарата содержится 500 млн убитых бактерий. Через 24 часа проводится учет реакции. Реакцию считают положительной при наличии инфильтрата и гиперемии на месте введения тулярина, диаметром не менее 0,5 см. Проба дает положительный результат, начиная с 3-5-го дня болезни; также она положительна у переболевших и вакцинированных людей.

Молекулярно-биологические методы. В последние годы используют метод определения ДНК возбудителя туляремии в различных объектах с помощью ПЦР. Метод превышает по чувствительности как бактериологические, так и серологические методы, а также позволяет выявлять некультивируемые, или покоящиеся, формы, что важно для определения потенциальной эпидемической опасности природных очагов. При диагностике туляремии у людей определяют ДНК в сыворотке крови, спинномозговой и синовиальной жидкостях. Все исследования проводят в соответствии с требованиями санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности».

14.3. ДИАГНОСТИКА СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ

Сибирская язва - острое антропозоонозное инфекционное заболевание, которое характеризуется тяжелой интоксикацией, поражением кожи, лимфатических узлов и других органов и высокой летальностью.

Возбудители сибирской язвы - *Bacillus anthracis* в зависимости от стадии развития культуры, а также условий окружающей среды могут существовать в трех формах: в виде бескапсульных вегетативных палочек, инкапсулированных палочек и спор. В мазках из культур, выросших на питательных средах, палочки расположены длинными цепочками, с обрубленными концами, которые напоминают бамбуковую трость (рис. 14.2).

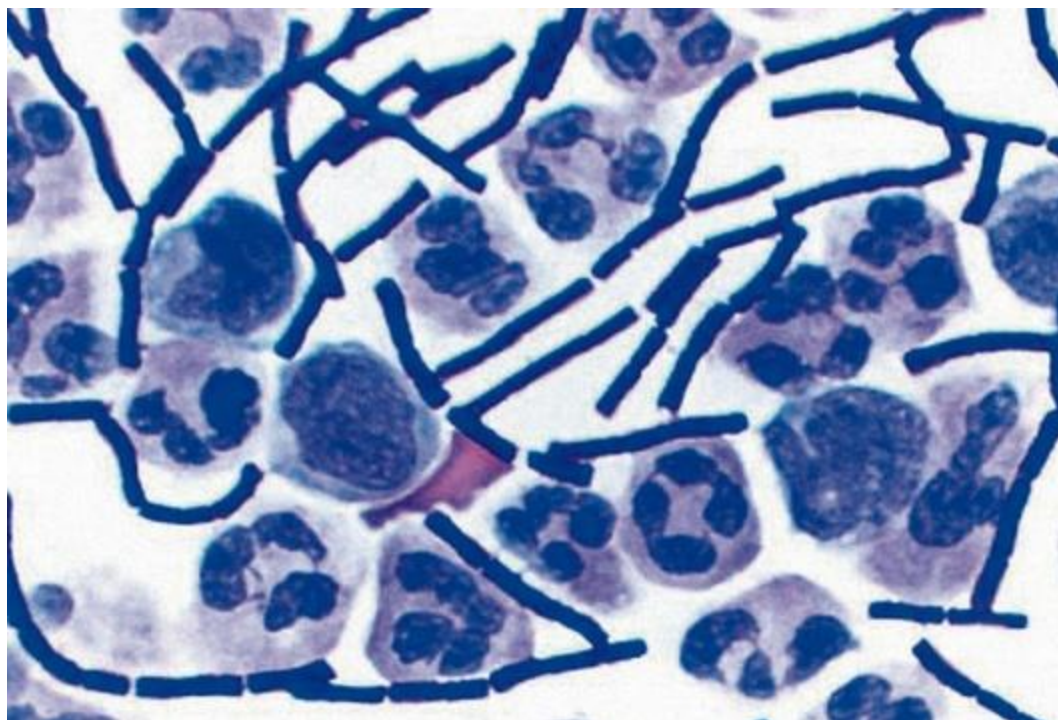


Рис. 14.2. *B. anthracis*

В мазках из клинического материала палочки расположены поодиночке, попарно или короткими цепочками, окружены хорошо выраженной капсулой. Возбудитель сибирской язвы - факультативный анаэроб, неподвижный, хорошо растет на простых питательных средах, оптимальная температура роста составляет 34-37 °С. При посевах на чашки Петри с питательным агаром после суточной инкубации формирует крупные, шероховатые сухие матовые колонии в R-форме, с неровными краями и хорошо отходящими от них волнистыми отростками, при малом увеличении микроскопа напоминающими львиную гриву. В жидкой среде в ходе роста образует придонный рост, похожий на комочки ваты, бульон остается прозрачным. *Bacillus anthracis* способны ферментировать глюкозу, мальтозу, сахарозу с образованием кислоты; лактозу они не расщепляют. В отличие от сапрофитных представителей рода *Bacillus*, которые полностью разжижают желатину в короткие сроки, при посеве уколом в столбик 10% мясо-пептонного желатина при температуре 22 °С вначале проводят разжижение желатины в формы перевернутой елочки, и только на 3-5-е сутки желатина разжижается в форме воронки. Также, в отличие от сапрофитных представителей рода *Bacillus*, не вызывает гемолиз на кровяном агаре, не образует фермент лецитиназу, обладает низкой фосфатазной активностью.

Важнейшие факторы патогенности - капсула и экзотоксины. Капсула образуется в организме больных людей и животных, а также при культивировании на 1% бикарбонатно-сывороточном агаре в атмосфере 5% CO₂, обладает антифагоцитарными свойствами. Экзотоксин играет ведущую роль в патогенезе сибиреязвенной инфекции и формировании специфического иммунитета. Его компоненты - отечный фактор, протективный антиген, летальный фактор. Токсино- и капсулообразование детерминировано плазмидами pXO1 и pXO2.

Лабораторная диагностика сибирской язвы включает бактериоскопию мазков из исследуемого материала, выделение чистой культуры и ее идентификацию, обнаружение антигенов в исследуемом материале с помощью РИФ, постановку ПЦР, биопробы и реакции по Асколи. У человека также ставят кожно-аллергическую пробу с сибирезавенным антигеном.

Материалы для исследования - содержимое карбункулов, мокрота, испражнения, кровь и моча, патоморфологический материал. По эпидемиологическим показаниям исследуют объекты окружающей среды, шерсть и щетину животных. Все исследования проводят в соответствии с требованиями, регламентирующими безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности.

- На первом этапе исследования из поступившего патологического материала для исследования готовят несколько мазков, которые подсушивают на воздухе и фиксируют в спирте с добавлением 3% перекиси водорода в течение 30 мин, после этого окрашивают по Граму, Романовскому-Гимзе (для выявления капсулы) и обрабатывают диагностическим сибирезавенным люминесцирующим иммуноглобулином. В мазках при микроскопии сибирезавенные бациллы расположены короткими цепочками, попарно или поодиночке, окружены розовой капсулой. Споры и вегетативные клетки, окрашенные люминесцирующим иммуноглобулином, вызывают специфическое для этого вида яркое свечение периферии клеток.

- Для проведения ПЦР используют тест-системы для выявления ДНК *Bacillus anthracis*, позволяющие проводить учет результатов методами электрофореза в агарозном геле или методом ПЦР в режиме реального времени. Работу проводят в соответствии с инструкциями к соответствующим тест-системам и методическими указаниями МУ 1.3.1794-03 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами I-II групп патогенности».

- Для выделения чистой культуры исследуемый материал засевают на чашки с МПА, агаром Хоттингера, пробирки с мясопептонным бульоном (МПБ) и селективную дифференциально-диагностическую среду с 0,01% раствором натрия фенолфталеина. Посевы проводят с помощью шпателя, методом истощения, распределяя материал с переносом шпателя на 2-3 чашки.

- На втором этапе исследования через сутки инкубации из бульонной культуры готовят мазки, окрашивают их по Граму и исследуют под микроскопом. Для получения чистой культуры делают пересев на плотные среды. На плотных средах отмечают рост матовых шероховатых колоний, которые трудно снимаются петлей с поверхности агара. Посевы на среде с фенолфталеином обрабатывают парами аммиака. Для этого чашки ставят дном вверх, на крышку помещают фильтровальную бумагу, пропитанную 29% раствором водного аммиака. При этом колонии сибирезавенного микроорганизма в силу слабого образования фосфатазы (в отличие от колоний сапрофитных бацилл, которые розовеют) не меняют окраску колоний. Из всех отобранных колоний делают мазки, которые окрашивают по Граму и обрабатывают сибирезавенной люминесцирующей сывороткой. Для идентификации отбирают те колонии, которые состоят из характерных для сибирезавенного микроорганизма палочек; их отсевают секторами на агар Хоттингера.

- На третьем этапе выросшую чистую культуру идентифицируют:
 - по способности вызывать гемолиз, проводя посев на кровяной агар;
 - на подвижность (высевают в полужидкий агар);
 - на лецитиназную активность (проводят посев на агар Хоттингера с добавлением желтка);

— на тест «жемчужное ожерелье».

Для этого в бульон Хоттингера с 20% инaktivированной лошадиной сывороткой добавляют 0,5 ЕД/мл пенициллина и засевают одну петлю агаровой или 2-3 мл бульонной культуры. После инкубации в течение 3 ч при температуре 37 °С готовят мазки, которые окрашивают метиленовым синим и микроскопируют (рис. 14.3).

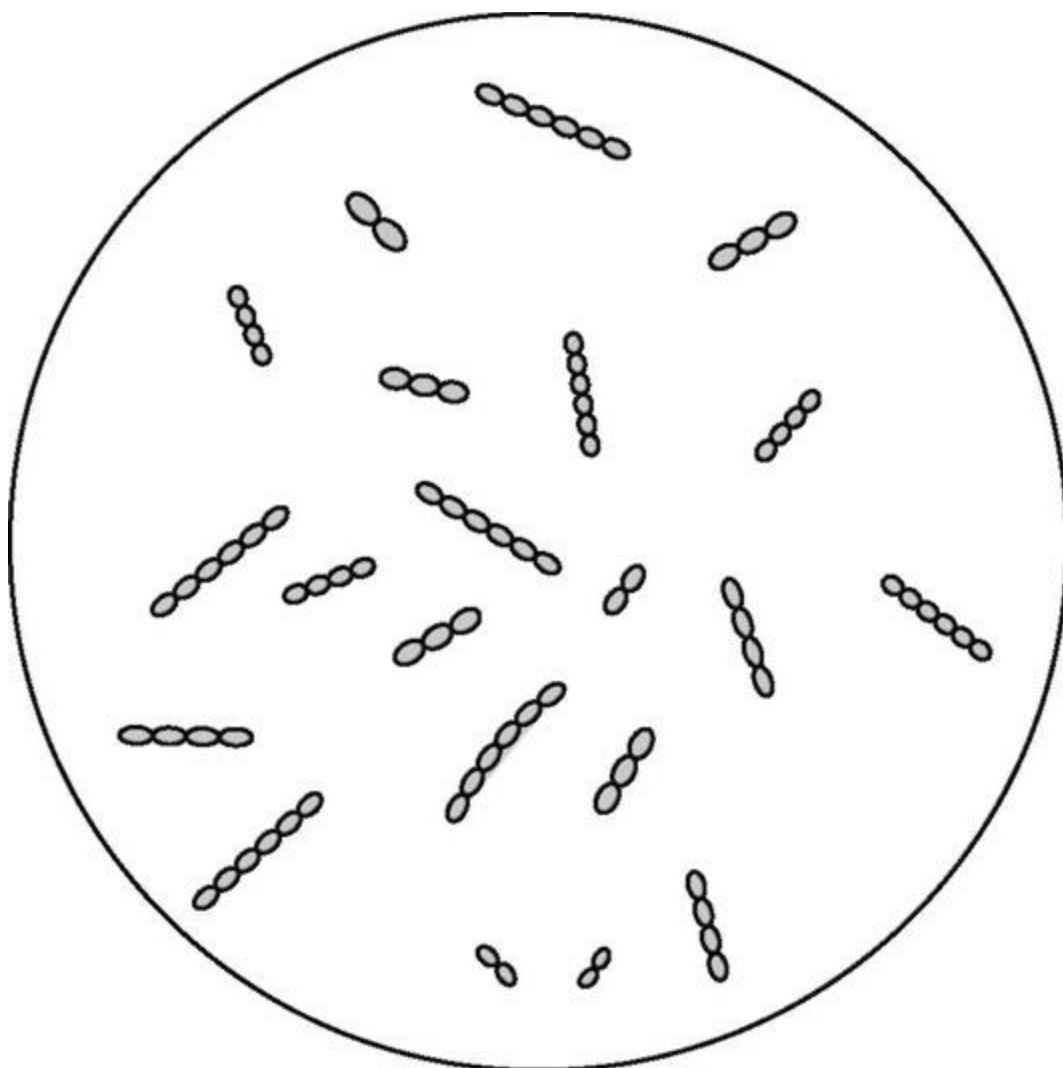


Рис. 14.3. Тест «жемчужное ожерелье»

Реакция преципитации по Асколи позволяет в короткие сроки обнаружить сибиреязвенный антиген в экстрактах из струпов язв больных, органов умерших от сибирской язвы животных и людей, шкур и органов павших животных. Для постановки реакции необходимы преципитирующая сибиреязвенная сыворотка, экстракт из исследуемого материала и сибиреязвенный антиген для контроля.

Для получения экстракта материал измельчают, заливают физиологическим раствором с 0,3% раствором карболовой кислоты в соотношении 1:10 и кипятят в течение 30-40 мин; полученный экстракт фильтруют. В узкие пробирки наливают по 0,2-0,3 мл преципитирующей сыворотки, а затем пастеровской пипеткой осторожно наслаивают такое же количество полученного экстракта. При положительной реакции на границе соприкосновения жидкостей не позднее чем через 15 мин появляется мутно-белое кольцо. Одновременно ставят четыре контроля:

- преципитирующая сыворотка + коммерческий стандартный сибиреязвенный антиген;
- преципитирующая сыворотка + 0,9% раствор хлорида натрия;

- нормальная лошадиная сыворотка + стандартный сибирезвенный антиген;
- нормальная лошадиная сыворотка + исследуемый материал.

Все контроли, кроме первого, должны быть отрицательными.

В день поступления материала одновременно с бактериоскопией и посевами на питательные среды для выделения чистой культуры в обязательном порядке проводят биологическую пробу, заражая белых беспородных мышей, морских свинок подкожно. Гибель животных наступает в течение 1-3 сут. Из тканей и органов павших животных делают мазки-отпечатки, посевают на МПА или агар Хоттингера и селективную среду.

Кожно-аллергическую пробу ставят с антраксином. У большинства больных эта реакция бывает положительной уже на первой неделе заболевания. Антраксин вводят с соблюдением всех правил асептики строго внутрикожно в количестве 0,1 мл в нижней трети левого предплечья на внутренней стороне. В месте введения антраксина через 8-24 ч учитывается наличие гиперемии и инфильтрата. Диагноз сибирской язвы подтверждается при наличии положительной антраксиновой пробы с оценкой диаметра гиперемии и инфильтрата от 2 см до 4 см.

При необходимости определяют наличие противосибирезвенных антител методом непрямой РИФ. Диагностическими считают титры 1:16-1:32 и 4-кратное нарастание титров при использовании парных сывороток, взятых с интервалом 5-7 сут.

14.4. ДИАГНОСТИКА БРУЦЕЛЛЕЗА

Бруцеллез - острое или хроническое инфекционно-аллергическое заболевание, общее для человека и животных, которое характеризуется интоксикацией и преимущественным поражением опорно-двигательного аппарата, мочеполовой, нервной и сердечно-сосудистой систем, затяжным течением. Возбудители бруцеллеза принадлежат к роду *Brucella*, который состоит из десяти самостоятельных видов, различающихся по биохимическим, метаболическим, антигенным и вирулентным свойствам. Заболевание у людей вызывают преимущественно *B. melitensis* (3 биовара; поражают коз и овец, возможна миграция на крупный рогатый скот и свиней), *B. abortus* (7 биоваров; вызывают аборт и орхиты у крупного рогатого скота), *B. suis* (5 биоваров; поражают свиней); реже *B. canis* (поражают собак). Бруцеллез у человека протекает в виде системного поражения с вовлечением в процесс многих органов и широким спектром симптомов. Болезнь склонна к хронизации и появлению осложнений в виде артритов, спондилитов, эндокардитов, менингитов, нейропатий, нефритов, васкулитов, лимфаденопатий.

Большинство случаев заражения людей бруцеллезом происходит при непосредственном контакте с инфицированными животными или употреблении в пищу молочных продуктов, контаминированных бруцеллами. Возможен воздушно-пылевой механизм заражения путем вдыхания загрязненных бактериями пылевых частиц с шерсти, навоза, земли. Больной бруцеллезом человек как источник инфекции опасности не представляет. Основной источник инфекции - животные, у которых возбудитель выделяется с испражнениями, мочой, молоком, околоплодными водами.

Бруцеллы всех видов не отличаются друг от друга по морфологическим признакам. Это грамотрицательные мелкие палочки (рис. 14.4) или шаровидной формы бактерии, которые не образуют спор, неподвижны.

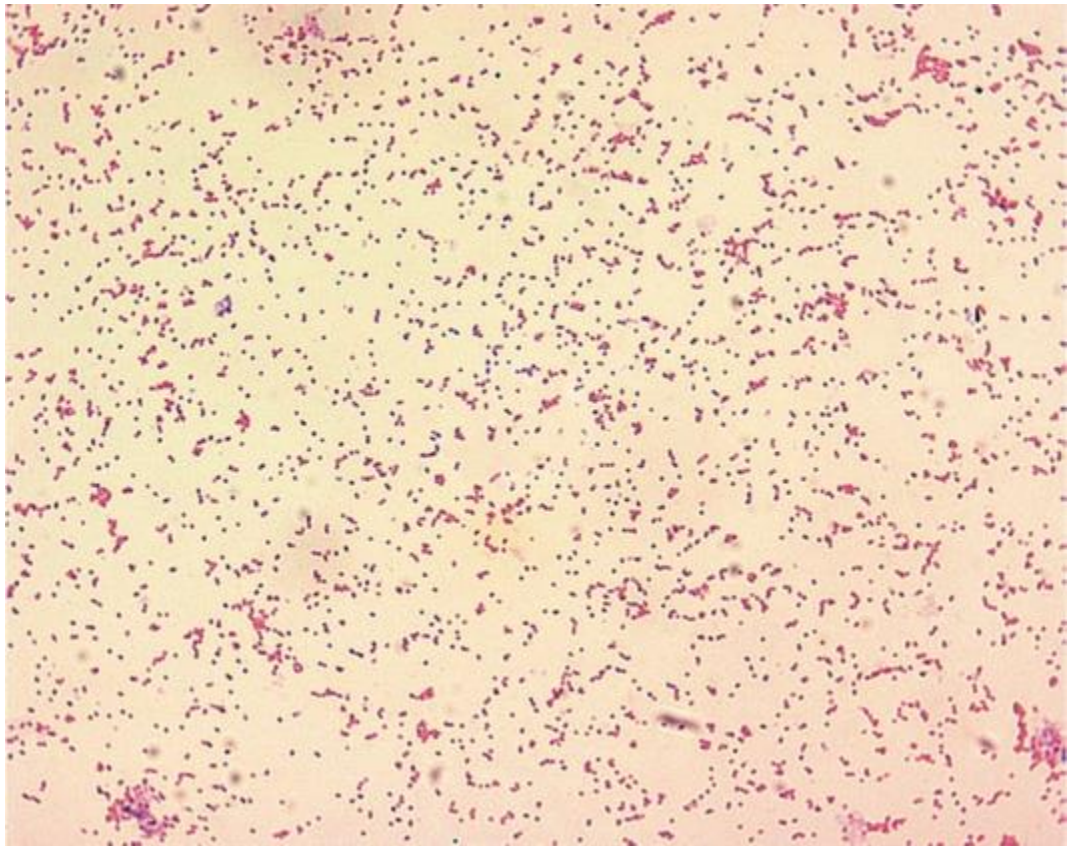


Рис. 14.4. *Brucella* spp.

Бруцеллы обладают высокой инвазивностью и могут проникать через неповрежденные кожные покровы, относятся к факультативным внутриклеточным паразитам, размножаются в полиморфноядерных лейкоцитах и макрофагах. Основные факторы патогенности - эндотоксин; секреторная система IV типа, обеспечивающая внутриклеточное проникновение возбудителя; низкомолекулярные протеины, обеспечивающие фагосома-лизосомальное фаголизосомальное слияние; гиалуронидаза и уреаза.

Бруцеллы нуждаются в сложных обогащенных питательных средах, характеризуются замедленным ростом, особенно в первых генерациях (до 20-30 сут). Бруцеллы - аэробы, отдельные биовары *B. abortus* при культивировании испытывают потребность в 10-20% CO₂.

Для дифференциации используют способность некоторых биоваров вырабатывать сероводород, а также чувствительность к бактериостатическому действию красителей (основного фуксина и тионина). Антигенная структура сложная и близкая для разных видов бруцелл. Два главных поверхностных антигена - А и М - имеют количественные видовые различия. Их соотношение для *B. melitensis* составляет 1:20, а для *B. abortus* и *B. suis* - 2:1.

Лабораторная диагностика. Для лабораторной диагностики заболевания у людей проводят выделение возбудителя, выявление ДНК и антигенов бруцелл, определение антител, постановку биопробы, кожно-аллергическую пробу (пробу Бюрне).

Материалы для исследования - кровь, спинномозговая, синовиальная жидкости, моча, желчь, пунктаты костного мозга и лимфатических узлов (для выделения возбудителя в чистую культуру); для определения ДНК и антигенов используют кровь, сыворотку крови, пунктат из лимфатических узлов, сыворотку крови. Исследования проводят в соответствии с требованиями правил безопасности работы с микроорганизмами I-II групп патогенности.

- На первом этапе исследования проводят посев исследуемого материала в две емкости с бифазной средой для выделения гемокультуры, одну из которых помещают в CO₂-инкубатор. Инкубацию проводят при температуре 37 °С до 30 сут. Проводят ПЦР с пробами из нативного материала и ИФА для выявления специфических антигенов. Заражают биопробных животных (белых мышей, морских свинок) подкожно в паховую область или внутрибрюшинно при исследовании крови, спинномозговой жидкости, костного мозга. Серологическое исследование проводят комплексом серологических реакций - Хеддельсона, Райта (диагностический титр 1:100), РПГА (диагностический титр 1:100), Кумбса.

- Реакцию Хеддельсона проводят для ускоренной серологической диагностики. Реакция ставится с неразведенной сывороткой больного и концентрированным антигеном-диагностикумом, окрашенным метиленовым синим на стеклянной фотопластинке, которую расчерчивают на шесть квадратов, в которые добавляют ингредиенты согласно схеме (табл. 14.2). Реакция считается положительной при наличии агглютинации на «2+ - 4+» во всех дозах сыворотки

- Реакция Кумбса позволяет выявить заболевание на ранних этапах инфекции и в период ремиссии при хронической форме заболевания.

- При острой форме заболевания наблюдается высокий титр антител, выявляемых в реакциях Райта, РПГА, ИФА.

- Высокие титры антител в реакции Кумбса свидетельствуют о том, что заболевание протекает в хронической форме или в форме инapparантной инфекции.

- На втором этапе исследования при наличии роста культуры на бифазной среде и на плотных средах после пересева с жидкой среды проводят отбор колоний, из которых готовят мазок, окрашивают его по Граму и обрабатывают специфическим люминесцирующим иммуноглобулином. Ставят ПЦР и реакцию слайд-агглютинации с поливалентной бруцеллезной диагностической сывороткой, делают пересев для накопления чистой культуры, с которой проводят межвидовую дифференциацию:

- по отношению к повышенной концентрации CO₂;
- способности образовывать сероводород;
- редуцирующей активности в отношении красителей (тионина и основного фуксина) (табл. 14.3);
- агглютинации моноспецифическими бруцеллезными сыворотками (*anti-abortus* и *anti-melitensis*);
- чувствительности к бруцеллезному бактериофагу Тб.

- На третьем этапе проводят идентификацию возбудителя. Зараженных животных вскрывают (белых мышей - через 20-25, морских свинок - через 30-35 сут), отбирают патологический материал (лимфатические узлы, кусочки печени, селезенки), проводят его посев на питательные среды с последующей идентификацией чистой культуры. Готовят мазки-отпечатки, которые исследуют с помощью РИФ, ПЦР.

Таблица 14.2. Реакция Хеддельсона

Ингредиенты, мл	Номер квадрата					
	№ пробы	1	2	3	4	5
	опытные варианты			контрольные варианты		

Сыворотка больного		0,04	0,02	0,01	0,02	-
Диагностикум		0,03	0,03	0,03	-	0,03
Физиологический раствор		-	-	-	0,03	0,03
Результаты						

Таблица 14.3. Дифференциация возбудителей бруцеллеза

Возбудитель	Источник инфекции	Продукция	Потребность CO ₂	Рост в присутствии окрасителей	
				фуксина	тионина
<i>B. melitensis</i>	Мелкий рогатый скот	-	-	+	-
<i>B. abortus</i>	Крупный рогатый скот	+	+	+	-
<i>B. suis</i>	Свиньи	-	-	-	+

Вопросы для самоконтроля

Составьте пары «вопрос-ответ».

1. Диагностика чумы	А. Тест «жемчужное ожерелье»
2. Диагностика туляремии	Б. Нарастание титра антител к F1-антигену
3. Диагностика сибирской язвы	В. Реакция Хеддельсона
4. Диагностика бруцеллеза	Г. Выделение возбудителя путем биопробы

5. Определение хронической формы бруцеллеза возможно постановкой ...
6. Тулярин используют для постановки ...
7. Тест на отсутствие гемолитических свойств и продукции фосфатазы используют для .
8. Рост в виде кружевных платочков характерен для ...

МОДУЛЬ 15. ВОЗБУДИТЕЛИ ИНФЕКЦИЙ МОЧЕПОЛОВОЙ СИСТЕМЫ: ОСНОВНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, ПРИНЦИПЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Цели модуля

- Знать: этиологическую структуру инфекций мочеполовой системы и методы их диагностики.
- Уметь: проводить исследование мочи на бактериурию, диагностику острой гонореи.
- Владеть: методами оценки результатов проведенных исследований.

Инфекционные процессы в органах мочеполовой системы, в зависимости от причины их возникновения, путей передачи и возбудителей, разделяют на инфекции, передаваемые половым путем (ИППП), и инфекции мочевыводящей системы, которые могут быть результатом как эндоинфекции, так и приобретенной госпитальной инфекции (табл. 15.1).

Таблица 15.1. Этиологическая структура возбудителей урогенитальной инфекции

Возбудители инфекций	
передаваемых половым путем	мочевыводящей системы
	<i>E. coli</i>
	<i>S. saprophyticus</i>
<i>T. pallidum</i>	<i>E. faecales</i>
<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<i>M. genitalium</i>	<i>M. hominis</i>
<i>U. urealyticum</i>	<i>Candida</i>
<i>C. trachomatis</i>	<i>Proteus</i>
<i>H. ducreyi</i>	<i>Serratia</i>
	<i>K. oxytoca</i>
	<i>K. pneumoniae</i>

15.1. ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИЙ МОЧЕВЫВОДЯЩЕЙ СИСТЕМЫ

В норме почки, мочеточники, мочевого пузыря и моча стерильны. Микрофлора, входящая в состав уретры, представлена кислородочувствительными грамотрицательными палочками родов *Prevotella*, *Porphyromonas* и кислородорезистентными грамположительными бактериями *S. epidermidis*, *Corynebacterium*, *M. smegmatis*. Основные возбудители инфекций мочевыводящей системы представлены в таблице 15.1. Они вызывают развитие воспалительных процессов, протекающих в форме цистита, пиелонефрита, простатита как последствия эндоинфекции или госпитальной инфекции в результате контаминирования при врачебных манипуляциях. Диагностику этих процессов проводят, определяя степень бактериурии.

Микробиологическое исследование мочи

- Взятие материала. Исследуют среднюю порцию свободно выпущенной мочи, взятой в количестве 3-5 мл в стерильную посуду после тщательного туалета наружных половых органов. Катетеризацию мочевого пузыря не применяют, так как она может привести к инфицированию мочевыводящих путей. Поскольку моча служит хорошей питательной средой для бактерий, которые могут начать размножаться при комнатной температуре, срок от момента взятия мочи до начала исследования не должен превышать 1-2 ч при хранении материала при комнатной температуре и не более 24 ч - в холодильнике.

- Определение степени бактериурии. Степень бактериурии определяют количеством колониеобразующих единиц в 1 мл мочи (КОЕ/мл). Определять степень бактериурии можно прямым посевом мочи в определенном объеме и методом секторных посевов по Голду.

Для посева мочи по Голду используют петлю диаметром 2 мм (емкость - 0,005 мл). Для этого чашку с питательной средой разделяют на четыре сектора - А, 1, 2, 3. Петлей проводят посев штрихом (30-40 штрихов) в секторе А. Затем петлю прожигают и делают посев (4 штриха), захватывая материал из сектора А в сектор 1. Петлю снова прожигают, делая аналогичный посев из сектора 1 в сектор 2 и таким же образом делают посев из сектора 2 в сектор 3. Чашки Петри с посевами помещают в термостат для инкубации при температуре 37 °С в течение 18-24 ч, после чего подсчитывают количество колоний, выросших на разных секторах. Определение степени бактериурии по количеству выделенных колоний проводят согласно таблице 15.2.

Таблица 15.2. Определение степени бактериурии по количеству выделенных колоний

Количество колоний в секторе				Степень бактериурии, КОЕ/мл
А	1	2	3	
1-6	-	-	-	<1000
8-20	-	-	-	3000
20-30	-	-	-	5000
30-60	-	-	-	10 000
70-80	-	-	-	50 000
100-150	5-10	-	-	100 000
Не сосчитать	20-30	-	-	500 000
Не сосчитать	40-60	-	-	1 млн
Не сосчитать	100-140	10-20	-	5 млн
Не сосчитать	Не сосчитать	30-40	-	10 млн
Не сосчитать	Не сосчитать	60-80	Единичное количество	100 млн

При посеве определенного объема мочу взбалтывают, отбирают пробу объемом 50 мкл (0,05 мл), которую засевают на питательные среды и незамедлительно (во избежание впитывания в агар) тщательно растирают шпателем по всей поверхности чашки. Если в качестве питательной среды используют кровяной агар, сначала растирание проводят на нем, а затем на других средах. После посева чашки помещают в термостат и после инкубации при температуре 37 °С в течение 18-24 ч производят подсчет колоний, определяя КОЕ/мл (число выросших колоний умножают на 20).

В качестве сред для посева используют среды для выделения энтеробактерий (Эндо, Мак-Конки) и 5% кровяной агар для выделения кокков. В настоящее время разработана новая специальная среда - CLED-агар (электролит-дефицитный агар с добавлением цистина и лактозы) для выделения и подсчета микроорганизмов из мочи. Отсутствие в среде натрия хлорида предотвращает роение протей. Предварительный учет результатов можно проводить, учитывая характер роста различных возбудителей на этой среде:

- *E. coli* - крупные желтые колонии;

- *Klebsiella* - крупные, желтые, выпуклые слизистые колонии;
- *Proteus* - синие, слегка выпуклые колонии;
- *Pseudomonas* - сине-зеленые колонии, зеленый агар;
- *E. faecales* - мелкие желтые колонии;
- стафилококки - небольшие интенсивно-желтые колонии.

Учет результатов. При отсутствии роста или очень низкой степени бактериурии (менее 200 КОЕ/мл), свидетельствующей о контаминации, чашки с кровяным агаром оставляют в термостате еще на сутки, поскольку может наблюдаться замедленный рост стрептококков. При отсутствии роста стрептококка исследование заканчивают (отрицательный результат).

- При бактериурии в пределах 200-1000 КОЕ/мл идентификацию проводят лишь в случае хронической инфекции (на фоне лечения при повторных анализах).
- Бактериурия менее 1000 КОЕ/мл обычно является результатом контаминации.
- Бактериурию 10 000 КОЕ/мл расценивают как сомнительный результат, что требует повтора анализа.
- Бактериурия 100 000 КОЕ/мл или выше указывает на наличие воспалительного процесса.

При трактовке результатов следует также учитывать повторность выделения одного и того же вида бактерий: повторное выделение одного вида, типа, варианта свидетельствует об инфекционном процессе.

При острых воспалительных процессах чаще выделяют монокультуру, поэтому при методике посева с 0,05 мл мочи в случае высокой бактериурии и очень густом росте бактерий можно пренебречь единичными колониями другого вида, рассматривая их как контаминирующую микрофлору.

Ассоциация микроорганизмов чаще встречается при хронических процессах (коррелируя с низкой степенью бактериурии).

15.2. ДИАГНОСТИКА БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ, ПЕРЕДАВАЕМЫХ ПОЛОВЫМ ПУТЕМ

Этиологическая структура ИППП представлена в таблице 15.3.

Таблица 15.3. Этиологическая структура инфекций, передаваемых половым путем

Возбудитель	Заболевание	Возбудитель	Заболевание
<i>Treponema pallidum</i>	Сифилис	<i>Chlamydia trachomatis</i> D-K	Воспалительные процессы уrogenитального тракта
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Гонорея	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	
<i>Haemophilus ducreyi</i>	Мягкий шанкр	<i>Mycoplasma genitalium</i>	
<i>Chlamydia trachomatis</i> L ₁ -L ₃	Венерическая лимфогранулема	-	-

15.2.1. Диагностика сифилиса

Возбудитель сифилиса - *Treponema pallidum* - микроорганизм спиралевидной формы с 8-12 завитками, слабо воспринимает окраску (не окрашивается по Граму, а по Романовскому-Гимзе окрашивается в бледно-розовый цвет), окрашивается серебрением по Морозову. Самый лучший способ микроскопии - исследование в живом состоянии в темнопольном или фазово-контрастном микроскопе, что позволяет наблюдать движение микроорганизма.

T. pallidum - микроаэрофил, на искусственных питательных средах практически не растет. Возможно культивирование при заражении кролика в яичко.

Антигенная структура сложная. Выявлены белковый (термолабильный), полисахаридный (термостабильный) и липоидный антигены. Липоидный антиген идентичен по своим свойствам липоидному экстракту бычьего сердца.

При неблагоприятных условиях существования в организме (наличии антител, антибиотиков и др.) бледная трепонема способна образовывать цисты, не пропускающие ЛС. В форме цист трепонемы могут существовать в организме, не оказывая выраженного патогенного действия. Под влиянием ЛС образуются L-формы. Существование цист и L-форм - одна из причин скрытого длительного течения заболевания, а также затрудненной лабораторной диагностики.

В организме образуются антитела, которые являются свидетелями инфекционного процесса, но не несут защитной функции. Вначале появляются антитела к липоидному антигену, титр которых зависит от количества трепонем в крови. Антитела к белковому антигену появляются позже и сохраняются длительное время.

Лабораторную диагностику сифилиса проводят микроскопическим, серологическим методами и ПЦР в зависимости от стадии заболевания.

Микроскопический метод позволяет обнаружить *T. pallidum* в содержимом:

- твердого шанкра в первичном периоде;
- высыпаний во время вторичного периода.

Наилучшие результаты получают при микроскопии нативных препаратов в темном поле зрения или при фазово-контрастной микроскопии.

Наиболее широкое применение имеет серологический метод исследования, представленный комплексом серологических реакций (КСР).

КСР включает реакции, которые подразделяют на отборочные (скрининговые) и диагностические.

Отборочные реакции направлены на определение антител к неспецифическому кардиолипиновому антигену. Антитела на этот антиген появляются первыми, и их титр снижается в процессе уменьшения в организме количества трепонем. Исторически эти антитела называют реакинами, они не обладают специфичностью, их используют для массового обследования населения на сифилис и для оценки эффективности лечения. К отборочным реакциям относят:

- реакцию микропреципитации (МП) и ее аналоги (VDRL - *Veneral Disease Research Laboratory*; RPR - *Rapid Plasma Reagin*);
- РСК (реакцию Вассермана);
- флокуляционные тесты.

Диагностические реакции ставят со специфическим белковым антигеном *T. pallidum*. Антитела на него появляются позже и длительно сохраняются независимо от

присутствия трепонем в организме. Это высокочувствительные и высокоспецифичные реакции, к которым относят:

- ИФА;
- РПГА;
- РИФ (непрямой метод);
- РИТ (реакцию иммобилизации трепонем).

В связи с длительностью сохранения в организме антител на белковый специфический антиген диагностические реакции не могут быть использованы для оценки эффективности лечения.

Также для диагностики сифилиса в настоящее время используют ПЦР.

Реакция микропреципитации. Для постановки реакции микропреципитации используют специально приготовленный кардиолипиновый антиген. Для этого 1 мл кардиолипинового антигена смешивают с 1 мл физиологического раствора, оставляют на 30 мин при комнатной температуре, центрифугируют при 1000-2000 об./мин в течение 15 мин. Надосадочную жидкость сливают. К осадку добавляют 3 мл 10% хлористого холина, растворенного в физиологическом растворе. Раствор хранят при температуре 4 °С.

Постановка реакции:

- 0,2 мл исследуемой сыворотки вносят в лунку пластины из органического стекла;
- добавляют 0,1 мл эмульсии кардиолипинового антигена;
- перемешивают, покачивая пластинку;
- добавляют 0,1 мл физиологического раствора;
- перемешивают (покачивая), оставляют на 5 мин.

Параллельно в качестве контроля ставят реакцию с заведомо положительной и заведомо отрицательной сыворотками. При положительном результате наблюдают появление хлопьев крупных и средних размеров.

Следует учитывать, что в случае повышенного содержания в сыворотке антител реакция может быть ложноотрицательной вследствие образования так называемой прозоны (преобладания антител над антигенами), поэтому рекомендуют разводить сыворотку и ставить реакцию с каждым из разведений.

В реакции VDRL используют антиген, состоящий из кардиолипина, лецитина и холестерина. В реакции RPR частицы иммуносорбента (уголь) нагружены кардиолипином.

Схема постановки реакции Вассермана приведена в таблице 15.4.

Реакцию считают положительной при полной или значительной задержке гемолиза, слабоположительной - при частичной или незначительной задержке гемолиза. При полном гемолизе во всех пробирках реакцию считают отрицательной. При положительной реакции сыворотки необходимо повторное исследование, при котором определяют титр антител к трепонемному и кардиолипиновому антигенам.

Таблица 15.4. Схема постановки реакции Вассермана

Ингредиенты, мл	1-я пробирка	2-я пробирка	3-я пробирка
Сыворотка больного (1:5)	0,25	0,25	0,25
Изотонический раствор натрия хлорида	0,25 (контроль сыворотки)	-	-

Трепонемный антиген	-	0,25	-
Кардиолипидный антиген	-	-	0,25
Комплемент (в рабочей дозе)	0,25	0,25	0,25
37 °С 45 мин			
0,5	Гемолитическая система	0,5	0,5
37 °С 45 мин			

Диагностические тесты со специфическим белковым трепонемным антигеном используют для подтверждения клинического диагноза, это высокочувствительные и высокоспецифичные реакции:

- ИФА;
- РПГА;
- РИФ (непрямой метод);
- реакция иммобилизации трепонем (РИТ).

15.2.2. Диагностика гонореи

Возбудители гонореи - *Neisseria gonorrhoeae* - грамотрицательные диплококки, которые имеют форму кофейных зерен, неподвижны, спор не образуют, имеют нежную капсулу и пили. Гонококки - наиболее прихотливые бактерии. Растут на средах с содержанием нативного сывороточного белка в атмосфере 3-10% CO₂. На плотной среде образуют мелкие бесцветные колонии. Имеют низкую сахаролитическую активность - ферментируют только глюкозу; оксидазо- и каталазоположительны.

Антигенной специфичностью обладают пили, пориновый белок, белки наружной мембраны. Структура гонококкового липоолигосахарид (ЛОС), входящего в состав клеточной стенки, напоминает структуру цитоплазматической мембраны человека, поэтому присутствие на поверхности микроорганизма ЛОС мимикрирует его, позволяя избегать иммунного распознавания.

Основные факторы патогенности - капсула, пили IV типа, эндотоксин, белки наружной мембраны, секретлируемые факторы персистенции, бактериоцины, ферменты. Эндотоксин гонококков - комплекс белка и липоолигосахарид - участвует в деструктивном действии патогена на эпителий слизистых оболочек.

Лабораторную диагностику острой гонореи проводят бактериоскопическим методом. Для этого из исследуемого материала (гнойных выделений, экссудата, осадка центрифугата первой порции утренней мочи) готовят два мазка, один из которых окрашивают по Граму, другой - простым методом (рис. 15.1).

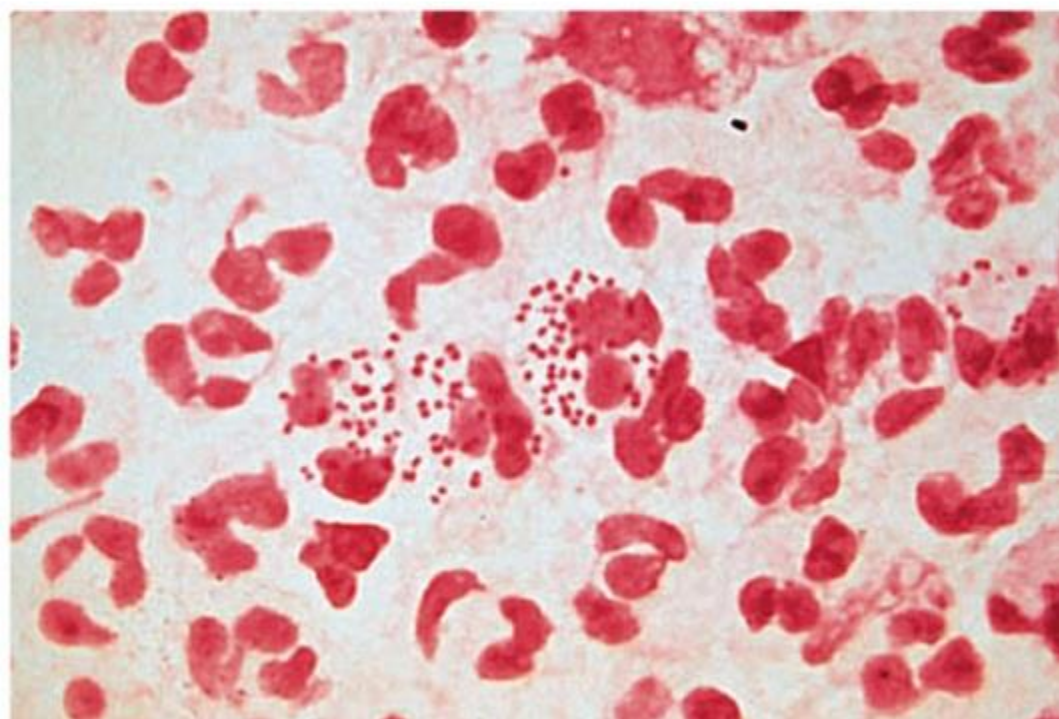
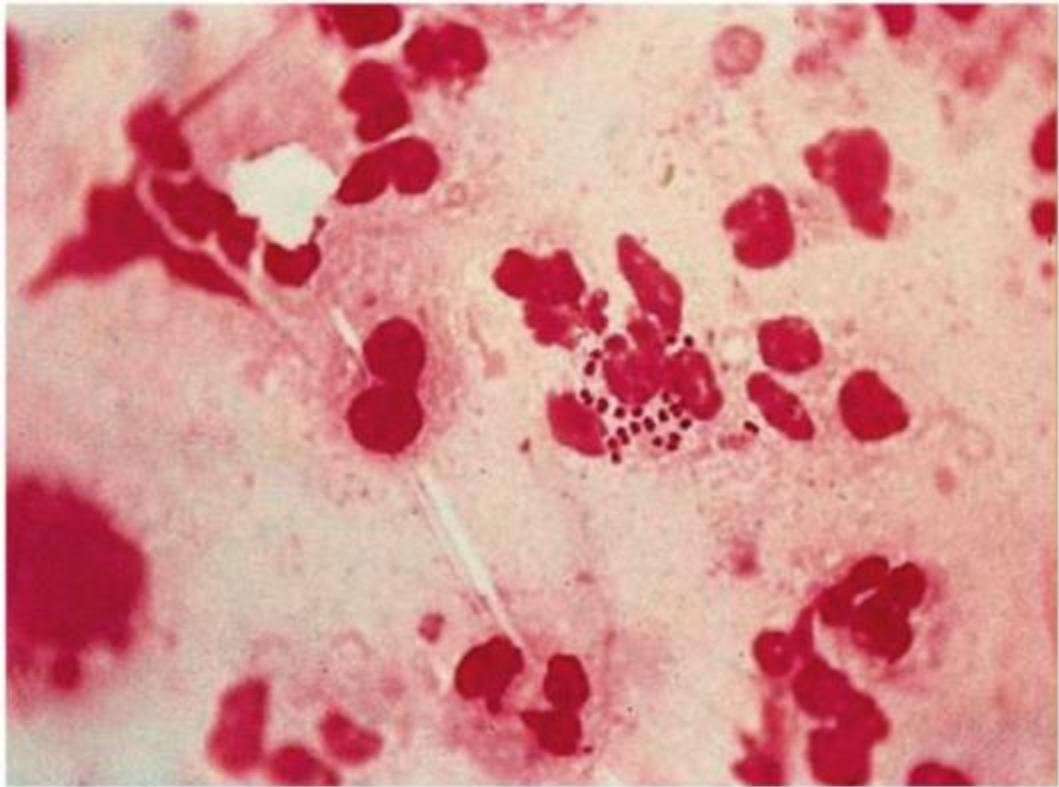


Рис. 15.1. *N. gonorrhoeae* в гное

Хроническую гонорею диагностируют серологическим методом, постановкой РСК, в которой в качестве антигена используют взвесь убитых нагреванием гонококков. Используют также бактериологический метод (после провокации гоновакциной) и ПЦР.

В случае локализации инфекционного процесса в ротовой полости, прямой кишке или наличия «гонококкового локтя» проводят бактериологическое исследование путем посева исследуемого материала на сыровоточный, кровяной или шоколадный агар с использованием крови человека и добавлением антибиотиков (полимиксина,

ванкомицина, амфотерицина). Культивирование проводят при температуре 37 °С в СО₂-инкубаторе.

15.2.3. Диагностика мягкого шанкра

Возбудитель заболевания - *Haemophilus ducreyi* - грамотрицательная короткая палочка, спор и капсул не образует, жгутиков не имеет. Факультативный анаэроб, растет на средах с содержанием белка, биохимическая активность невысокая.

Для микробиологической диагностики на исследование берут отделяемое язвы, окрашивают по Граму или метиленовым синим и микроскопируют. Возможны постановки ИФА, ПЦР с материалом от больного. Бактериологический метод применяют редко.

15.2.4. Лабораторная диагностика урогенитальных хламидиозов

Хламидии - мелкие грамотрицательные кокковидные, облигатно-паразитические бактерии. Не образуют спор, не имеют капсулы и жгутиков, неподвижны. Основным методом выявления хламидий - окраска по Романовскому-Гимзе.

Хламидии обладают уникальным (двухфазным) циклом развития, который характеризуется чередованием двух различных форм существования:

- инфекционной - элементарные тельца (ЭТ);
- вегетативной - ретикулярные, или инициальные, тельца (РТ).

ЭТ не способны к делению, могут проникать в чувствительную клетку, где и происходит цикл развития. РТ, подвергаясь делению, обеспечивают репродукцию хламидий. Хламидии - облигатные внутриклеточные энергетические паразиты и на искусственных питательных средах не размножаются, их можно культивировать только в живых клетках. Хламидии культивируют в культуре клеток *Hela*, *McCoy*, в желточных мешках, куриных эмбрионах, организме чувствительных животных при температуре 35 °С. Факторы патогенности хламидий представлены белками наружной мембраны клеток, эндотоксинами (ЛПС) и секреторной системой III типа.

Хламидии обладают общим родоспецифическим полисахаридным антигеном, который выявляют в РСК. Кроме того, у них имеются видоспецифические антигены белковой природы, а у *C. trachomatis* - белковые типоспецифические антигены, по которым происходит подразделение на 18 сероваров.

Патология мочеполовой системы связана с видом *Chlamydia trachomatis*, серовары L₁-L₃ которой вызывают венерическую гранулему, а серовары D-K - негонококковый уретрит.

Диагностика венерической лимфогранулемы

Венерическая лимфогранулема характеризуется поражением половых органов и регионарных лимфатических узлов и симптомами генерализации инфекции.

Лабораторную диагностику проводят микроскопией мазков-отпечатков. Материалы для исследования - гной из лимфатических бубонов, биоптат лимфатических узлов. Применяют также серологический метод, определение антител в реакции микроиммунофлюоресценции и постановку кожно-аллергической пробы (пробы Фрея).

Диагностика урогенитального хламидиоза (негонококкового уретрита)

Урогенитальный хламидиоз (негонококковый уретрит) - острое или хроническое инфекционное заболевание, передаваемое половым путем, поражающее мочеполовую систему, характеризуется малосимптомным течением с последующим развитием бесплодия.

C. trachomatis, серовары D-K, помимо патологии урогенитального тракта, способны вызывать поражения глаз (конъюнктивит с включениями), а также синдром Рейтера (триада - уретрит, конъюнктивит, артрит).

Лабораторную диагностику урогенитального хламидиоза проводят культуральным, серологическим (определение антигена хламидий и антител), экспресс-методами и ПЦР.

- Выделение *C. trachomatis* сероваров D-K на культурах клеток. Метод называют «золотым стандартом», так как он наиболее достоверный, однако трудоемкий и дорогой. В лабораторной практике в РФ не используют.

- Обнаружение антигена *C. trachomatis* D-K:

- ориентировочные методики (можно проводить непосредственно в кабинете врача) - метод иммунохроматографии и ферментоспецифическая реакция;

- РИФ и ИФА - их результаты имеют достоверное подтверждающее значение.

Для вышеуказанных методик исследуемый материал должен содержать соскобы слизистых оболочек уретры, цервикального канала и конъюнктивы глаза.

Для получения материала используют специальные одноразовые зонды (уретральные и цервикальные). Зонды состоят из ватного дакронового тампона, обладающего повышенной адсорбционной способностью, и транспортной пробирки, позволяющей сохранить влажность материала.

Взятие материала проводят со слизистых оболочек уретры и парауретральных ходов. Тампон в уретру мужчин вводят на 2,5-3 см, у женщин - на глубину 0,5-1 см. Материал собирают вращательным движением в течение 15 с.

При взятии материала из цервикального канала предварительно ватным тампоном удаляют слизистую пробку, после чего материал собирают вращательным движением в течение 15 с. Следует избегать соприкосновения тампона со слизистой оболочкой влагалища.

При взятии материала с конъюнктивы глаза предварительно удаляют возможную слизь. Клеточный материал берут с нижнего века вращательным движением тампона. После взятия материала тампон сразу же помещают в пробирку с транспортной средой. Образцы материала хранят при температуре 4 °С не более 24-48 ч.

Взятый материал можно использовать для культивирования хламидий в культуре клеток, обнаружения специфического антигена методами РИФ, ИФА, иммунохроматографии, ферментоспецифической реакции, а также для постановки молекулярно-биологических методов исследования (ПЦР, транскрипционно-опосредованной амплификации - ТОА).

Метод иммунохроматографии. При внесении образца клинического материала в специальный планшет антигены хламидий взаимодействуют со специфическими антителами, ковалентно связанными с цветным латексом. Образовавшийся комплекс «антиген-антитело-латекс» движется по полоске нитроцеллюлозной мембраны, формируя окрашенную зону.

Ферментоспецифическая реакция. При наличии в исследуемом материале специфической пептидазы хламидий синтетический субстрат расщепляется непосредственно на тампоне, а продукт реакции после добавления проявляющегося реагента окрашивается в пурпурный цвет.

Обнаружение антигена методом РИФ основано на окрашивании мазков-отпечатков биоматериала специфическими антителами:

- непосредственно конъюгированными с флюоресцентным красителем - прямой метод;

- обрабатываемыми сначала специфической кроличьей антисывороткой против *S. trachomatis*, а затем антисывороткой против глобулинов кролика, меченной флюорохромом (ФИТЦ), - непрямым методом.

При микроскопии полученных препаратов эпителиальные клетки окрашены в красный цвет. Элементарные тельца хламидий, расположенные внеклеточно, представлены в виде ярко-зеленых образований округлой формы. Ретикулярные тельца видны как образования зеленого цвета, расположенные внутри клеток. Результат считают положительным, если в препарате удастся обнаружить не менее 10 телец хламидий. Этот метод субъективен в отношении полученных результатов.

Обнаружение антигена методом ИФА. Для этой цели выпускают специальные тест-системы для выделения антигена *S. trachomatis*. С помощью этого метода можно обнаружить не только сами бактерии, но и их растворимые антигены, которые накапливаются в жидкостях инфицированного организма: отделяемое уретры, цервикального канала, конъюнктивы глаза. Автоматизация проведения исследования исключает субъективизм полученных результатов.

Серологический метод исследования основан на проведении твердофазного ИФА. Для этой цели используют тест-системы, содержащие видовой белковый антиген *S. trachomatis* (в противном случае будут получены ложноположительные результаты с сыворотками лиц, инфицированных *S. pneumoniae*). При серологическом исследовании целесообразно выявлять в сыворотке отдельные классы специфических иммуноглобулинов - IgM, IgG, IgA. Это позволяет оценить стадию, характер течения заболевания, контролировать эффективность лечения:

- при остром инфекционном процессе в сыворотке обнаруживают антитела IgM в титрах 1:50-1:3200;
- при хроническом течении инфекции в сыворотке определяют IgA в титрах 1:50-1:400;
- у больных с бессимптомным течением заболевания антитела IgA в низких титрах определяют на протяжении многих недель, что свидетельствует о персистенции возбудителя.

При оценке результатов лечения используют метод парных сывороток, определяя динамику снижения титров антител: снижение титров IgG и IgA в 2-3 раза свидетельствует об успешно проведенной терапии.

Молекулярно-биологические методы исследования. Для постановки молекулярно-биологических тестов в качестве исследуемого материала, помимо соскобов со слизистой оболочки, можно использовать мочу. Молекулярно-биологические методы включают постановку ПЦР.

15.2.5. Диагностика микоплазмозов

Микоплазмы - самые мелкие свободноживущие бактерии, размером 0,15-1,0 мкм, не имеющие клеточной стенки и окруженные только цитоплазматической мембраной, содержащей стеролы. Микоплазмы способны проходить через мембранные бактериальные фильтры. Заболевания, вызываемые микоплазмами, называют микоплазмозами. Микоплазмы входят в класс *Mollicutes*, включающий 4 семейства, 6 родов и 150 видов, из которых 15 имеют человеческое происхождение, а остальные изолированы от животных и растений. В патологии человека основная роль принадлежит четырем видам - *M. pneumoniae*, *M. hominis*, *M. genitalium*, *U. urealyticum*.

В связи с отсутствием ригидной клеточной стенки микоплазмы высокоплеоморфны; имеют нитевидную, колбовидную и кокковидную формы. Устойчивы к ЛС, подавляющим синтез клеточной стенки (пенициллинам, цефалоспорином и др.),

осмочувствительны, грамтрицательны, не образуют спор. Предполагают наличие микрокапсулы или капсулоподобной оболочки.

Микоплазмы - факультативные анаэробы. Очень требовательны к питательным средам, растут медленно, в течение 49-96 ч, на сложных средах, содержащих дрожжевой экстракт, а также экстракты сердца и мозговой ткани, сыворотку. В среду обязательно добавляют холестерин, а при выделении уроплазм - мочевины. На плотных средах микоплазмы образуют мелкие круглые колонии с приподнятым центром, напоминающие яичницу-глазунью. На жидких средах помутнение может не наблюдаться, поэтому наличие роста микоплазм оценивают путем субкультивирования на плотных средах или микроскопией осадка после центрифугирования среды. Возможно культивирование на клеточных культурах и куриных эмбрионах. В клеточных культурах микоплазмы растут на поверхности клеток. Рост ингибируют специфические иммунные сыворотки.

Биохимическая активность микоплазм низкая, некоторые виды способны ферментировать углеводы с образованием кислоты. Микоплазмы обладают видоспецифическими антигенами гликолипидной и белковой природы.

Патогенные микоплазмы имеют колбообразную и филаментозную формы со специфическими полярными концевыми структурами, которые обеспечивают прикрепление микроорганизма к клетке хозяина. Микоплазмы прикрепляются к гликолипидной природы рецепторам, расположенным на мембране клетки хозяина. Образование мико-плазмами перекиси водорода и перекисных радикалов вызывает повреждение мембраны клетки хозяина, что способствует более тесному слиянию мембран при прикреплении микоплазм. При этом происходит подавление защитной функции мерцательного эпителия.

Микоплазмы - мембранные паразиты. Прикрепляясь к клетке хозяина, они могут длительное время размножаться и персистировать в макроорганизме, изменяя метаболизм инфицированных клеток и оказывая на них цитотоксическое и цитолитическое действие.

• *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma genitalium* относят к возбудителям урогенитальных микоплазмозов. Источник инфекции - инфицированный человек. Микоплазмы, вызывающие урогенитальные заболевания, передаются половым путем.

• *Mycoplasma genitalium* вызывает негонококковый уретрит у мужчин. У женщин этот возбудитель связывают с развитием цервицита, эндометрита, сальпингита.

• *Ureaplasma urealyticum* связывают с развитием в 10% случаев негонококкового уретрита у мужчин.

• *Mycoplasma hominis* ассоциирована с развитием у женщин сальпингитов и возникновением послеродовой и постабортальной лихорадки.

• *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum*, входящие в микрофлору влагалища, способны инфицировать плод во время прохождения через родовые пути, вызывая развитие пневмоний у новорожденных.

Иммунитет после перенесенной инфекции, вызванной микоплазмами, не формируется. Гуморальные антитела, образующиеся в низких титрах, не являются протективными.

Лабораторную диагностику проводят серологическим и бактериологическим методами.

Материалы для исследования - соскобы со слизистых оболочек уретры, влагалища, моча. При выделении микоплазм используют количественный метод посева, причастность к развитию воспалительного процесса устанавливают, если есть титр 10^4 КОЕ/мл.

Антигены микоплазм можно обнаружить в РИФ. Для определения антител в сыворотке крови используют серологические методы исследования - РПГА и ИФА. Также возможна постановка ПЦР.

Вопросы для самоконтроля

1. Бактериурию подтверждают концентрацией бактерий в моче, составляющей .
2. При постановке отборочных реакций для диагностики сифилиса используют . антиген.
3. Для диагностики острой гонореи используют .
4. Кожно-аллергическую пробу используют для диагностики ...
5. Негонококковый уретрит у мужчин вызывают .

МОДУЛЬ 16. ВОЗБУДИТЕЛИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КРОВЯНЫХ ИНФЕКЦИЙ: ОСНОВНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, ПРИНЦИПЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Цели модуля

- Знать: основные свойства возбудителей кровяных бактериальных инфекций и методы диагностики вызываемых ими заболеваний.
- Уметь: выбирать материал для исследования и методы исследования.
- Владеть: методами оценки результатов проведенных лабораторных исследований.

16.1. ДИАГНОСТИКА РИККЕТСИОЗОВ

Риккетсиозы - группа острых трансмиссивных заболеваний человека, вызываемых бактериями рода *Rickettsia*, протекающих с развитием выраженной интоксикации, генерализованного панваскулита, поражения ЦНС, внутренних органов и характерных высыпаний на теле. По современной классификации, род *Rickettsia* входит в порядок *Rickettsiales*, семейство *Rickettsiaceae*.

Основные свойства бактерий рода *Rickettsia*

- Морфологически представлены грамтрицательными палочками или плеоморфной формы бактериями.
- Не культивируются на искусственных питательных средах.
- Абсолютные внутриклеточные паразиты, так как не способны продуцировать достаточно энергии.
- Делятся бинарным делением.
- Могут размножаться как в цитоплазме (*R. prowazekii*), так и ядре клеток (*R. sibirica*).
- Неустойчивы в окружающей среде.
- Поражают эндотелий сосудов с развитием васкулитов (появлением сыпи, геморрагий).
- Факторы патогенности - пили и белки клеточной стенки, обеспечивающие прикрепление бактерий к эндотелиальной клетке-мишени; фосфолипаза A2, разрыхляющая мембрану клетки; микрокапсула; токсические субстанции

(липополисахариды, фосфолипиды). Токсичность риккетсий и их пирогенное действие связаны преимущественно с поражением эндотелиальных клеток сосудистого русла.

- Обладают термостабильным группоспецифическим антигеном, выявляемым в РСК, и видоспецифическими белковыми антигенами. Липополисахариды (ЛПС) некоторых риккетсий (Провачека) имеют общие антигены с протеем.

В составе рода выделяют две группы - клещевой пятнистой лихорадки и сыпного тифа.

- В группу сыпного тифа входят:

- *R. prowazekii* - возбудитель эпидемического (передаваемого вшами) сыпного тифа и болезни Брилля;

- *R. typhi* - возбудитель эндемического (крысиного или блошиного) сыпного тифа.

- В группу клещевой пятнистой лихорадки (КПЛ) входят 18 видов, в том числе и возбудитель клещевого сыпного тифа.

Среди перечисленных риккетсиозов эпидемический сыпной тиф - чисто антропонозная инфекция, возбудитель которой циркулирует между человеком и его специфическими эктопаразитами - вшами. Другие риккетсиозы - зоонозные инфекции, при которых возбудители циркулируют между домашними или дикими животными и кровососущими членистоногими, способными заражать риккетсиями человека.

Микробиологическая диагностика. Основные методы диагностики - серологический (РСК, РНГА, РНИФ, ИФА) и молекулярно-генетический (ПЦР), поскольку методы выделения и последующей идентификации риккетсий требуют соблюдения режимных требований (возбудители II группы патогенности).

Обнаружение возбудителей в снятых с человека переносчиках проводят с помощью экспресс-методов (РИФ, ИФА, РПНГА) с иммуно-глобулиновыми диагностикумами для выявления антигенов риккетсий.

Диагностику сыпного тифа осуществляют комплексом серологических реакций (КСР), включающим постановку реакции агглютинации риккетсий (РАР), РНГА, РСК и ИФА. Использование КСР позволяет провести ретроспективную диагностику, осуществить динамику инфекционного процесса, а также дифференцировать сыпной тиф от других риккетсиозов и болезни Брилля.

- Реакция агглютинации риккетсий (РАР). Сыворотку больного разводят от 1:25 до 1:800. Диагностический титр реакции - 1:100. Агглютинины появляются на 3-5-е сутки заболевания, достигают максимального титра к 20-м суткам; у реконвалесцентов сохраняются в течение 3 мес. РАР позволяет проследить за динамикой инфекционного процесса. Для дифференциации риккетсиозов не применяют.

- Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА). Сыворотку больного разводят от 1:10 до 1:1280. Диагностический титр реакции - 1:160. РНГА позволяет выявить не только суммарный титр антител, но и их принадлежность к классам Ig. При сыпном тифе с 5-7-го дня заболевания в диагностическом титре выявляют IgM. Антитела достигают максимального титра к 15-20-м суткам заболевания (1:1280 и более). С 3-й недели заболевания начинают преобладать IgG. В период реконвалесценции титр антител снижается и через 6 мес его не обнаруживают. РНГА используют для дифференциации эпидемического сыпного тифа и болезни Брилля, а также для оценки динамики инфекционного процесса. Для дифференциации риккетсиозов не применяют.

- Реакция связывания комплемента (РСК). Сыворотку больного разводят от 1:20 до 1:2560. Диагностический титр реакции - 1:80. Комплементсвязывающие антитела

появляются на 6-8-е сутки заболевания, достигают максимальных титров к 15-м суткам, сохраняясь в диагностических титрах на протяжении 2 лет. Низкий титр РСК, не достигающий диагностического и не имеющий тенденции к нарастанию, рассматривают как анамнестический. РСК используют для дифференциации эпидемического и эндемического сыпного тифа, болезни Брилля и ретроспективной диагностики. Для дифференциации эпидемического и эндемического сыпного тифа РСК ставят в двух рядах пробирок, параллельно с антигенами *R. prowazekii* и *R. typhi*.

У больных болезнью Брилля с первых дней болезни и в более высоких титрах выявляют антитела, принадлежащие к классу IgG. Дифференцирование IgG- и IgM-антител основано на их различной чувствительности к действию редуцирующих веществ, содержащих свободные сульфгидрильные группы (2-меркаптоэтанол). Эти вещества вызывают разрыв дисульфидных связей в молекуле IgM и их распад на субъединицы, лишенные активности антител; IgG при этом не изменяются. РСК и РНГА в данном случае ставят в двух параллельных рядах: в одном ряду - с нативной сывороткой, в другом - с сывороткой, обработанной 2-меркаптоэтанолом.

В случае первичного (эпидемического) сыпного тифа, для которого характерно преобладание IgM-антител, наблюдают снижение титра антител в обработанной сыворотке не менее чем в 4 раза по сравнению с необработанной исходной сывороткой.

В случае болезни Брилля или при повторном сыпном тифе, где преобладают IgG, титр антител в обеих сыворотках должен быть одинаковым (допускают снижение титра не более чем в 2 раза).

ВОЗ рекомендует использовать непрямую реакцию иммунофлюоресценции, которая позволяет дифференцировать антитела, появляющиеся при возникновении заболевания (IgM), от циркулирующих после перенесенного сыпного тифа (IgG).

Кожно-аллергическая проба с антигеном риккетсий Провачека - чувствительный тест для выявления сенсibilизации организма человека после перенесенного заболевания; ее можно использовать для определения структуры населения в отношении переболевших сыпным тифом.

16.2. ДИАГНОСТИКА БОРРЕЛИОЗОВ

Боррелиозы - группа заболеваний, вызываемых спирохетами рода *Borrelia*, передаваемых человеку через укусы членистоногих.

Род *Borrelia* включает более 30 видов спирохет. Патогенные виды рода *Borrelia* вызывают как антропонозные (возвратный тиф), так и зоонозные (эндемический возвратный тиф, болезнь Лайма) инфекционные заболевания с трансмиссивным путем передачи возбудителей через клещей и вшей. Боррелии - тонкие спирохеты размером 0,3-0,6x20 мкм, имеют 3-10 крупных завитков. Двигательный аппарат состоит из 15-20 фибрилл. Возбудители хорошо воспринимают анилиновые красители, по Романовскому-Гимзе окрашиваются в сине-фиолетовый цвет. Боррелии могут культивироваться на сложных питательных средах, содержащих сыворотку, асцит, тканевые экстракты, при температуре 28-35 °С в атмосфере 5-10% CO₂, а также в куриных эмбрионах при заражении в желточный мешок. Вызывают два типа заболеваний - возвратные тифы и клещевой иксодовый боррелиоз (болезнь Лайма).

Возвратные тифы - группа острых инфекционных заболеваний, вызываемых боррелиями, характеризуемых острым началом, приступообразной лихорадкой, интоксикацией. Различают эпидемический и эндемический возвратные тифы.

• *Эпидемический возвратный тиф* - антропонозная инфекция, возбудителем которой является *B. recurrentis*. Единственный источник возбудителя - лихорадящий

больной, в периферической крови которого находятся боррелии. Переносчики возбудителя - вши (лобковые, платяные, головные), реже клопы.

• *Эндемический (клещевой) возвратный тиф* - зоонозное природно-очаговое заболевание. Возбудители представлены более 20 видами боррелий, циркулирующих в различных природных очагах тропиков и субтропиков различных стран: *B. persica* - в Азии, *B. caucasica* - на Кавказе, Украине, в Закавказье. Резервуар в природе - грызуны, ряд других животных, а также аргасовые клещи, у которых возбудитель передается трансвариально. Человек заражается через укусы клещей рода *Ornithodoros*.

Патогенез и клиническая картина обоих типов возвратного тифа схожи. Попавшие в организм боррелии внедряются и захватываются клетками лимфоцитарно-макрофагальной системы, размножаются в них и попадают в большом количестве в кровь, вызывая лихорадку (повышение температуры тела до 39-40 °С), головную боль, озноб. Каждая такая атака заканчивается подъемом титра антител. Взаимодействуя с ними, боррелии образуют агрегаты, которые нагружаются тромбоцитами, вызывая закупорку капилляров, вследствие чего происходит нарушение кровообращения в органах. Под влиянием антител большая часть боррелий погибает. Однако в течение инфекции антигены боррелий подвергаются изменениям, а поскольку антитела выработаны против одного типа антигенов, новые антигенные варианты боррелий появляются снова, вызывая рецидив заболевания (это повторяется до 3-20 раз). Иммуитет к возвратным тифам гуморальный, непродолжительный.

Лабораторная диагностика. Основной метод диагностики возвратных тифов - микроскопическое исследование крови больного в препарате толстой капли и в обычном мазке. Для дифференциации эпидемического и эндемического возвратных тифов используют биологическую пробу на морских свинках.

Для бактериоскопического исследования у больного берут кровь из пальца во время лихорадки, изготавливают препарат толстой капли и мазок. Высушенную толстую каплю не фиксируют. Мазок фиксируют смесью Никифорова. На толстую каплю наносят краситель Романовского сначала на 5 мин, для того чтобы прошел гемолиз, затем его заменяют свежим и выдерживают еще 40 мин. Препарат осторожно промывают водой, высушивают, микроскопируют под иммерсионным объективом. Боррелии возвратного тифа окрашиваются в сине-фиолетовый цвет (рис. 16.1).

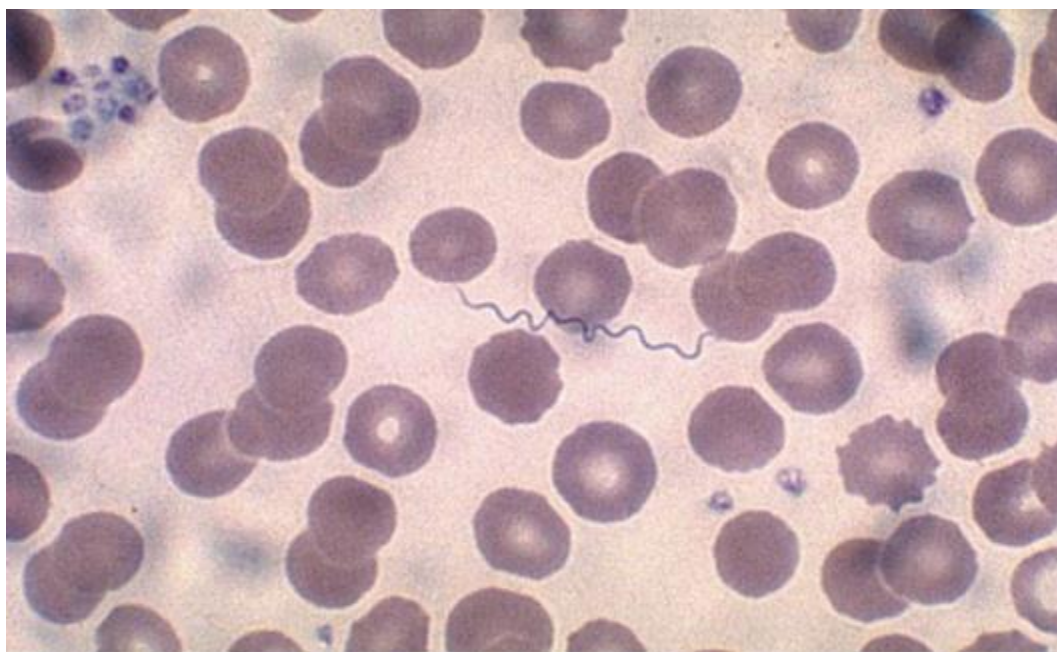


Рис. 16.1. Возбудитель возвратного тифа в крови

При заражении кровью больных морские свинки нечувствительны к *B. recurrenti*, но чувствительны к возбудителям клещевых боррелиозов.

Болезнь Лайма (хроническая мигрирующая эритема, клещевой иксодовый боррелиоз) - хроническая инфекция с поражением кожи, сердечной и нервной систем, суставов. Возбудитель болезни Лайма в Северной Америке - вид *B. burgdorferi*, на евроазиатском континенте - *B. garini*, *B. afzelii*, которые различаются между собой по антигенной структуре. К настоящему времени выделено более 10 близких видов боррелий, циркулирующих в различных очагах на территории различных стран. Они представляют собой типичные по морфологическим и тинкториальным свойствам боррелии, которые хорошо культивируются на питательных средах при выделении из клещей. Боррелии обладают сложной антигенной структурой. Антигенами являются белки флагелл и цитоплазматического цилиндра, однако антитела к ним не обладают защитными свойствами (защитные свойства имеют антитела к интегральным белкам наружной мембраны). Данные антигены вариабельны, видоспецифичны, изменяются в процессе жизненного цикла боррелий.

Липидомодифицированные белки наружной мембраны обеспечивают способность боррелий прикрепляться и проникать в клетки хозяина, а также индуцировать иммунопатологический процесс в организме человека и вызывать воспалительную реакцию. Резервуар возбудителей в природе - мелкие млекопитающие. Заболевание передается человеку через укусы клещей рода *Ixodes* и распространено в ареале обитания этих клещей. Патогенез связан с распространением возбудителя из места укуса с током крови к различным органам, особенно к сердцу, ЦНС, суставам. Заболевание сопровождается развитием аутоиммунных и иммунопатологических процессов. Клиническую картину подразделяют на три стадии:

- мигрирующую эритему;
- доброкачественные поражения сердца и ЦНС в виде миокардита и асептического менингита, появляющихся на 4-5-й неделе заболевания;
- поражения крупных суставов, возникающие через 6 нед и более от начала заболевания.

Иммунитет - гуморальный, видоспецифический к антигенам клеточной стенки боррелий.

Лабораторная диагностика. Для диагностики используют бактериоскопию, ПЦР и серологические методы исследования.

Прямая бактериоскопия позволяет обнаружить возбудителя в биоптатах кожи, крови, синовиальной жидкости, крови. При микроскопии биоптатов кожи часто используют метод импрегнации серебром. Однако концентрация боррелий в крови, СМЖ, биоптатах очень маленькая, поэтому бактериоскопический метод обладает низкой диагностической ценностью.

ПЦР позволяет определить наличие ДНК боррелий в каждом биоптате, крови, моче, СМЖ и суставной жидкости. Высокая чувствительность этого метода позволяет определить инфицированность пациента на 7-14-е сутки после присасывания клеща.

Серологические методы - основные в диагностике болезни Лайма. Антитела обнаруживают обычно на 3-6-й неделе от начала заболевания. Для серологического исследования используют непрямой метод РИФ и ИФА. Для более точной постановки диагноза в качестве подтверждающего теста рекомендуют постановку иммунного блоттинга, который обладает высокой чувствительностью и специфичностью, позволяя определить наличие специфических антител к определенным белкам возбудителя на конкретной стадии развития заболевания.

Вопросы для самоконтроля

1. Основной метод диагностики сыпного тифа - ...
2. Для дифференциации эпидемического и эндемического сыпных тифов используют .
3. Обработку сыворотки пациента с подозрением на сыпной тиф веществами, редуцирующими сульфгидрильные связи, перед постановкой серологической реакции проводят в целях .
4. Биопробу на морской свинке проводят для .
5. Основной метод диагностики болезни Лайма - ...

МОДУЛЬ 17. ВОЗБУДИТЕЛИ РЕСПИРАТОРНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ: ОСНОВНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, ПРИНЦИПЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Цели модуля

- Знать: свойства вирусов, возбудителей гриппа, краснухи, натуральной оспы.
- Уметь: подбирать материал для микробиологической диагностики.
- Владеть: методами оценки результатов проведенных лабораторных исследований.

17.1. ДИАГНОСТИКА ГРИППА

Вирус гриппа относят к семейству *Orthomyxoviridae*, из которого три рода составляют вирусы гриппа А, В, С: *influenza A virus*, *influenza B virus* и *influenza C virus*.

Возбудители гриппа - РНК-содержащие сложные (оболочечные) вирусы. Вирион имеет сферическую форму диаметром около 100 нм, встречаются и нитевидные формы. Нуклеокапсид со спиральным типом симметрии заключен в липопротеиновую оболочку с шипами на поверхности. Липопротеиновая оболочка (суперкапсид) имеет клеточное происхождение. Три вирусных белка пронизывают липидный слой и образуют внешнюю поверхность вириона, два из них - вирусные гликопротеины: гемагглютинин (НА) и нейраминидаза (НА), формирующие поверхность вириона. Внутренняя поверхность оболочки вирусов гриппа образована слоем белка М1. Вирион содержит также трансмембранные белки М2 (грипп А), NB, VM2, (грипп В), SM2 (грипп С).

Геном вируса гриппа представлен однонитевой РНК негативной полярности (минус-РНК), которая у вирусов гриппа А и В состоит из 8 фрагментов, а у гриппа С - из 7 фрагментов. Каждый фрагмент находится в комплексе с белком-нуклеопротеином (NP) и тремя белками полимеразного комплекса (PB1, PB2, PA). На основе каждого фрагмента создается комплементарная мРНК для синтеза вирусных белков.

- Три самых больших сегмента вирусной РНК кодируют белки полимеразного комплекса - PB1, PB2 и PA. Эти белки осуществляют транскрипцию и репликацию вирусного генома.
- Четвертый сегмент кодирует гемагглютинин (НА).
- Пятый сегмент кодирует NP-белок.
- Шестой сегмент у вирусов гриппа А и В кодирует нейраминидазу (а у вирусов гриппа В - также гликопротеин NB, участвующий в транспорте ионов).

- Седьмой сегмент РНК у вирусов гриппа А кодирует белки М1 и М2, а у вирусов гриппа В и С - белок МL1 и белки ВМ2 и СМ2 соответственно.

- Восьмой сегмент кодирует белки NS1 и NS2, которые защищают вирусы от воздействия интерферона (NS1) и участвуют в транспорте синтезированных в ходе репродукции вируса нуклеокапсидов из ядра клетки в цитоплазму (NS2).

Шипики на поверхности суперкапсида - выросты длиной около 10 нм, образованные гемагглютинином и нейраминидазой. Количество гемагглютинина в 5 раз больше, чем нейраминидазы. У вируса типа С нейраминидазы нет. На поверхности обоих гликопротеинов есть специальные области для связывания с рецепторами на чувствительных клетках. Для вирусов гриппа специфическими рецепторами являются соединения, содержащие сиаловую кислоту. Вирусные частицы связываются с чувствительной клеткой при участии гемагглютинина. Гемагглютинин вначале синтезируется в виде полипептидной цепи, а после химических модификаций расщепляется на две субъединицы - HA1 и HA2. В результате такого расщепления вирион приобретает способность сливаться с клеточной мембраной. Гемагглютинин обладает способностью склеивать (агглютинировать) эритроциты и является основным антигеном вируса гриппа. Нейраминидаза - фактор распространения вируса, так как расщепляет сиаловые кислоты и помогает вирусам преодолевать слизистый слой.

Антигенная структура вирусов гриппа разнообразна, имеются поверхностные и внутренние антигены:

- поверхностные антигены представлены гемагглютинином и нейраминидазой, структура которых постоянно изменяется; в настоящее время известно 16 подтипов HA и 9 подтипов NA;

- внутренние типоспецифические антигены представлены нуклеопротеином (NP-белком) и М-белками.

Вирусы гриппа характеризуются изменчивостью, причем наибольшей изменчивостью обладает вирус гриппа А; вирус гриппа В менее изменчив, а вирус гриппа С стабилен. Изменчивость приводит к появлению новых антигенных вариантов. Различают два вида изменчивости вируса.

- Антигенный дрейф - незначительные изменения структуры гемагглютинина и/или нейраминидазы, которые происходят часто и обусловлены точечными мутациями в участках генома вируса, отвечающих за синтез и структуру детерминант поверхностных антигенов. В результате в популяции вирусов постоянно появляются новые антигенные варианты, которые и обуславливают периодические эпидемии гриппа.

- Антигенный шифт - появление новой разновидности гемагглютинина и/или нейраминидазы, которое вызывает полную замену гена, кодирующего гемагглютинин или нейраминидазу. Шифт происходит редко, обычно является результатом рекомбинаций, возникающих при заражении одной клетки двумя разными вирусами одного и того же рода, и вызывает масштабные эпидемии или пандемии.

Репликация вируса гриппа происходит быстро (8-10 ч). Вирус адсорбируется на поверхности чувствительной клетки и прикрепляется к рецептору с помощью гемагглютинина. Нейраминидаза расщепляет сиаловую кислоту, и вирус проникает в клетку путем эндоцитоза. Транскрипция вирусной РНК и ее репликация происходят в ядре клетки. Вначале образуется плюс-нить РНК, затем на матрице образуется минус-нить РНК для дочерних вирусов. Полная сборка нуклеокапсида происходит в ядре, куда поступают синтезированные капсидные белки. Гемагглютинин и нейраминидаза синтезируются рибосомами, связанными с грубым цитоплазматическим ретикулумом, собираются в тримеры (NA) и тетрамеры (NA) и встраиваются в мембрану клетки хозяина. Вирусные частицы формируются на клеточных мембранах. Дочерние вирусы

выходят из клетки путем почкования, покрываясь оболочкой, содержащей НА, НА, М-белки.

В окружающей среде вирусы гриппа относительно устойчивы. Вирусы гриппа чувствительны к высоким температурам и УФ, жирорастворителям и дезинфектантам, могут некоторое время сохраняться при низких температурах. Вирус теряет инфекционность в 70% этаноле в течение 10 мин, в кислой среде и при высыхании.

Источник инфекции - больной человек, путь передачи - воздушно-капельный. Входные ворота инфекции - верхние дыхательные пути, однако вирус может проникнуть сразу в альвеолы, что вызывает развитие пневмонии. Первичная репродукция вирусов происходит в клетках эпителия дыхательных путей. Развиваются воспаление, отек, набухание базальной мембраны, происходит десквамация клеток поверхностного эпителия.

Вирус активирует систему протеолиза и повреждает эндотелий капилляров, что вызывает геморрагии, нарушение гемодинамики с расстройствами микроциркуляции. При гриппе развивается вторичный иммунодефицит, что предрасполагает к формированию вторичной бактериальной инфекции.

При гриппе А начало болезни острое, у больного наблюдаются интоксикация, высокая лихорадка с ознобом, суставные и мышечные боли, сильная головная боль, насморк. Часто возникают диспепсические нарушения. После перенесенного заболевания часто возникают осложнения (пневмония) и обострения хронических соматических болезней. Заболевания, вызванные вирусами гриппа В и С, протекают легче. После заболевания формируется видоспецифический иммунитет.

Лабораторную диагностику гриппа проводят вирусологическим и серологическим методами.

Материалы для исследования - носоглоточное отделяемое, мазки-отпечатки со слизистой оболочки носа, аутопсийный материал, кровь (для серологического метода).

- Материалом заражают куриные эмбрионы и культуры клеток (первичные или перевиваемые).

- Индикацию вирусов проводят по гибели, клиническим и патоморфологическим изменениям, цитопатическому действию, образованию бляшек, цветовой пробе, РГА и реакции гемадсорбции (РГАд).

- Идентификацию вирусов проводят по антигенной структуре с помощью РСК, РТГА, ИФА, РИФ.

- Иммунофлюоресцентный метод детекции вирусных антигенов - высокочувствительный тест быстрой дифференциальной диагностики гриппа. Суть метода заключается в специфической индикации вирусных антигенов в клиническом материале от больных с помощью специфических антител, меченных флюорохромом (например, флуоресцеин изотиоцианат - ФИТЦ). Образующийся при этом комплекс «антиген-антитело» обнаруживают по характерной ярко-зеленой флюоресценции в синевioletовых лучах люминесцентного микроскопа.

- Реакцию торможения гемагглютинации (РТГА) применяют для установления подтипа вируса, т.е. специфичности, а также для определения нарастания титров специфических антител. При наличии специфических антител в сыворотке наступает задержка агглютинации эритроцитов. За титр сыворотки принимают предельное разведение, вызывающее полную задержку гемагглютинации.

- Метод определения инфекционной активности вируса гриппа на куриных эмбрионах 10-12-дневного возраста. Вирус вводят в аллантоисную полость (0,2 мл вирусосодержащей жидкости из разведений от 10^{-5} до 10^{-7}), используя на каждое

разведение по четыре эмбриона. Эмбрионы инкубируют при температуре 35 °С в течение 48 ч для вируса гриппа А и 72 ч - для вируса гриппа В. По истечении срока инкубации отдельно из каждого эмбриона отбирают по 0,4-0,5 мл аллантоисной жидкости, которую помещают в четыре отдельные лунки плексигласовой пластинки. В каждую лунку добавляют по 0,4-0,5 мл 1% суспензии куриных эритроцитов. Через 30-40 мин контакта после оседания эритроцитов в контроле проводят учет гемагглютинации.

- Метод количественного определения гемагглютинина вируса гриппа в реакции одиночной радиальной иммунодиффузии (ОРИД). Гемагглютинин (ГА), диффундируя из лунок агарозного геля в радиальном направлении, реагирует со специфическими антителами сыворотки, находящейся в агарозе, и образует в геле зону преципитации. Размеры окружающей лунку зоны преципитации находятся в прямой зависимости от количества антигена, внесенного в лунку.

- Серологическое исследование проводят в целях подтверждения диагноза и выявления уровня специфических антител. Положительным считают результат нарастания титра антител не менее чем в 4 раза при заборе парных сывороток с интервалом 5-8 дней.

- Молекулярно-генетические методы исследования включают обнаружение вирусной РНК с помощью ПЦР.

- Иммунохроматографический экспресс-тест. Для определения наличия вирусов гриппа типов А и В в образцах назальных мазков используется иммунохроматографический экспресс-тест. Метод основан на обнаружении в исследуемом материале специфических нуклеопротеинов вирусов типа А и В при помощи моноклональных мышинных иммуноглобулинов. Для этой цели в наборе для проведения теста имеет 2 индикаторные палочки: одна для обнаружения наличия вируса типа А, другая-для определения вируса типа В.

17.2. ДИАГНОСТИКА КРАСНУХИ

Возбудителей краснухи - *Rubella virus* - относят к семейству *Togaviridae*, роду *Rubivirus*. Вирион имеет сферическую форму размером 60-70 нм. Геном вируса состоит из однонитчатой плюс-нитевой РНК, окруженной капсидом с кубическим типом симметрии, и суперкапсидом. В структуре вириона имеется три основных белка - С, Е1 и Е2, последние два из них - гликопротеины, входят состав суперкапсида. Также в его состав входят гемагглютинин и фермент нейраминидаза.

Краснуха - антропонозная острая вирусная инфекция, относящаяся к разряду детских инфекций и передаваемая воздушно-капельным путем. Инкубационный период составляет 14-21 день. Проявляется респираторными проявлениями, интоксикацией и специфической сыпью. Заболевание имеет особое значение при беременности, так как может вызывать тяжелые множественные пороки развития плода. Плод заражается трансплацентарным путем в период вирусемии у беременной (в течение 7 дней до появления сыпи и в период высыпаний). В случае если беременная заболевает краснухой на первой неделе беременности, поражение плода возникает в 80% случаев; на 2-4-й неделе - в 60%; на 5-8-й - в 30%; на 9-12-й неделе - в 10% случаев. У плода возникает патология органа зрения (катаракта, глаукома, помутнение роговицы), органа слуха (глухота), сердца (врожденные пороки). Очень часто (50-90% случаев) краснуха протекает бессимптомно, поэтому для постановки диагноза необходимо проведение лабораторных анализов. Выявление краснухи у беременных в I триместре - прямое показание к прерыванию беременности. Наличие заболевания в II и III триместре приводит к развитию врожденной краснухи.

В результате длительной персистенции вируса краснухи после перенесенной инфекции у человека может развиваться прогрессирующий краснушный панэнцефалит (ПКПЭ).

17.2.1. Лабораторная диагностика краснухи

При диагностике краснухи особое значение имеет выявление IgM, IgG, IgG с низкой авидностью и РНК вируса. Также используют ОТ-ПЦР (ПЦР с обратной транскрипцией) и выделение вируса.

- IgM организм человека вырабатывает в первые дни заболевания, на 2-3-й неделе их количество достигает максимального уровня и через 1-2 мес они исчезают. Их присутствие в крови свидетельствует о том, что заболевание находится острой фазе.

- IgG начинают вырабатываться на 2-3 дня позже, чем IgM, их количество нарастает до максимума к месяцу от начала заболевания. В отличие от IgM, IgG сохраняются в крови долгое время (чаще пожизненно) и обеспечивают иммунитет.

- Авидность IgG к вирусу краснухи. Авидность (от лат. *avidity* - «жадный») - оценка способности антител IgG связываться с вирусом краснухи для дальнейшей нейтрализации последнего. В самом начале заболевания IgG довольно слабо связываются с вирусом, т.е. обладают низкой авидностью. По мере развития иммунного ответа авидность антител IgG увеличивается.

При анализе результатов тестирования часто возникают затруднения в расшифровке полученных данных. Это может быть обусловлено парадоксально ранним появлением краснушных антител класса IgG, возможностью длительного персистирования антител класса IgM в периферической крови в течение многих месяцев и даже лет (особенно после вакцинации), а также наличием перекрестных, неспецифических реакций. В этих ситуациях применяют молекулярно-биологические методы (ПЦР), направленные на прямое обнаружение РНК вируса краснухи.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Обнаружение РНК вируса краснухи в крови достоверно свидетельствует об остром процессе (первичном заражении). Материалы для исследования - кровь, носоглоточная слизь, смывы, моча, СМЖ, отделяемое с конъюнктивы. Для диагностики краснухи используют следующие методы.

- Серологические методы (ИФА, РТГА), которыми выявляют:
 - IgM при первичной инфекции в течение 1-2 мес (отсутствуют при реинфекции);
 - низкоавидные IgG - до 25 дня при первичной инфекции (отсутствуют при реинфекции);
 - сероконверсию или нарастание титра IgG (4-кратного и более) при исследовании парных сывороток, полученных с интервалом 3-4 нед (при отрицательной второй сыворотке получают третью сыворотку через 2 нед после второй).

- Молекулярно-генетический метод (ОТ-ПЦР) - определение РНК вируса.

- Вирусологический метод - выделение вируса в чувствительных клеточных структурах (ВНК-21, *Vero* и др.), а также в первичных культурах клеток из тканей человеческого плода. Размножаясь в цитоплазме клеток, вирус вызывает очаговую деструкцию клеточного монослоя и образование цитоплазматических эозинофильных включений. К вирусу также чувствительны куриные и утиные эмбрионы. Вирусологический метод используют редко.

17.2.2. Лабораторная диагностика врожденной краснухи

Материалы для исследования - пуповинная кровь, кровь новорожденного, глоточная слизь, отделяемое конъюнктивы, моча, СМЖ.

Методы лабораторной диагностики:

- определение низкоавидных IgG в пуповинной крови (ИФА), крови новорожденного;
- определение РНК вируса (ПЦР);
- выделение вируса из клинических проб новорожденного в течение 6-12 мес (вирусологический метод).

17.2.3. Антенатальная диагностика краснухи

Проводят исследование:

- околоплодных вод, полученных при амниоцентезе на наличие в них РНК вируса (ОТ-ПЦР);
- пуповинной крови (полученной при кордоцентезе) на наличие к вирусу (ИФА) и обнаружение РНК вируса (ОТ-ПЦР).

Для диагностики краснухи возможно также использование ряда других реакций - ИБ, РИФ, РИА, РСК. Кроме того, существует несколько экономичных и ускоренных полуколичественных отборочных тестов - реакция латекс-агглютинации (РЛА), РПГА.

Интерпретацию полученных результатов проводят по таблицам 17.1, 17.2.

Таблица 17.1. Оценка результатов анализа на краснуху

IgM	IgG	Значение результатов
Нет	Нет	Краснухи нет и никогда не было (иммунитет отсутствует). При планируемой беременности необходимо провести вакцинацию против краснухи. Если анализ сделан в I триместре беременности, его необходимо повторить в II триместре (до 20-й недели)

Окончание табл. 17.1

Нет	Есть	Есть иммунитет к краснухе (либо заболевание перенесено ранее, либо была проведена вакцинация). После вакцинации от краснухи иммунитет сохраняется до 5 лет. После перенесенной краснухи иммунитет сохраняется пожизненно
Есть	Есть	Острая краснуха (начало заболевания). Необходимо воздержаться от беременности в течение 3 мес. При беременности необходимо провести исследование крови в ПЦР (или повторить ИФА через 10-14 дней на IgM- и IgG-антитела)
Есть	Есть	Острая краснуха (середина и конец заболевания). Необходимо провести ПЦР или повторить ИФА через 10-14 дней на IgM- и IgG-антитела

Таблица 17.2. Интерпретация результатов определения авидности антител

Авидность IgG, %	Интерпретация	Значение результатов
≤50	Низкоавидные	Острая инфекция. Заражение краснухой произошло до 3 мес назад.

		При беременности необходимо провести исследование крови с использованием ПЦР
51-69	Переходные	Результат недостоверный. Необходимо повторить исследование через 2 нед
≥70	Высокоавидные	Есть иммунитет. Заражение краснухой произошло более 5 мес назад

17.3. ДИАГНОСТИКА НАТУРАЛЬНОЙ ОСПЫ

Натуральная оспа - особо опасная инфекция, характеризующаяся тяжелым течением, высокой контагиозностью, лихорадкой и обильной пустулезно-папулезной сыпью на коже и слизистых оболочках. Натуральную оспу относили к конвенционным (карантинным инфекциям), в 1977 г. была ликвидирована на земном шаре. Впервые возбудителя обнаружил в световом микроскопе Е. Пашен (1906).

Вирус натуральной оспы входит в семейство *Poxviridae* (от англ. *pox* - «пустула» + вирусы), род *Orthopoxvirus*.

Вирус натуральной оспы - самый крупный вирус, имеет овоидную форму (230x400 нм). Состоит из оболочки, наружной мембраны и сердцевины (ДНК и белков), расположенной между боковыми телами. Геном вириона представлен двунитевой линейной ДНК. Наружная мембрана собирается вокруг сердцевины в цитоплазме, а оболочка приобретает форму при выходе из клетки. Вирус имеет более 30 структурных белков, а также невирионный гемагглютинин.

Вирус культивируется на хориоаллантоисной оболочке развивающихся куриных эмбрионов, в различных культурах клеток, на роговице глаза кролика, в организме обезьян.

Вирусы устойчивы к высушиванию, низким температурам, эфиру, длительно сохраняются в корочках оспенных пустул. Моментально погибают при нагревании до 100 °С, а при 60 °С - через 15 мин; при обработке хлорамином погибают через несколько часов.

Естественный резервуар - больной, а также умерший человек. Заболевший натуральной оспой человек заразен от начала болезни до полного освобождения от корок. Заражение происходит воздушно-капельным, воздушно-пылевым или контактно-бытовым путями; вирус может также передаваться внутриутробно. Наиболее заразителен период с 4-го по 9-й день болезни, когда во внешнюю среду при разговоре, кашле и чиханье больного с отделяемым слизистых оболочек полости рта и зева выделяется большое количество вируса. Источники вируса в дальнейшем - содержимое кожных элементов, контаминированный вирусом воздух, белье и предметы больного.

До глобальной ликвидации натуральная оспа была широко распространена в странах Азии, Африки, Южной Америки (XVI в. и позже) и Европы (VI в. и позже), унося в отдельные годы жизни до 2 млн человек. В 1958 г. ВОЗ по предложению СССР разработала программу ликвидации оспы в мире. Для осуществления программы СССР безвозмездно передал ВОЗ свыше 1,5 млрд доз оспенной вакцины. В результате глобальной противооспенной вакцинации населения натуральная оспа была ликвидирована в 1977 г.

В настоящее время заболевание может возникнуть только при искусственном заражении: в результате биотерроризма, внутрилабораторного инфицирования, вскрытия захоронений.

Вирус натуральной оспы проникает через слизистые оболочки верхних дыхательных путей, реже через кожу. После размножения в регионарных лимфатических узлах он попадает в кровь, из которой заносится в кожу, слизистые оболочки и другие ткани и органы, где происходит дальнейшая репликация вируса и формируются очаги поражения - характерные везикулезные и папулезные высыпания.

Инкубационный период составляет 7-17 дней, затем появляются высокая температура тела, рвота, головная и поясничная боль, сыпь, образуются пузырьки (везикулы) и гнойнички (пустулы), подсыхающие и превращающиеся в корки. После отпадения корок на коже (на 30-40-й день болезни) остаются рубцы (рябины). Различают тяжелую (со 100% летальностью), среднетяжелую и легкую формы оспы. Клиническую картину можно воспроизвести у обезьян.

У переболевших формируется стойкий пожизненный иммунитет, обусловленный появлением вируснейтрализующих антител.

Лабораторную диагностику осуществляют вирусоскопическим, вирусологическим, серологическим и молекулярно-биологическим методами с соблюдением правил предосторожности для особо опасных инфекций. Взятие проб осуществляют врачи-вирусологи, прошедшие специальную подготовку, а саму процедуру взятия проб выполняют в соответствии с правилами противоэпидемического режима. Упаковку и транспортирование проб с биоматериалом и все работы по исследованию материала проводят со строгим соблюдением санитарно-противоэпидемических требований.

Материалы для исследования - содержимое кожных поражений (в зависимости от стадии болезни - везикул, пустул, корочки, соскоб со дна пузырьков), мазки с задней стенки глотки и миндалин, кровь, а в случае смерти - кусочки органов (с видимыми невооруженным глазом поражениями) отдельно для вирусологического и патогистологического исследований.

Фактор времени при появлении оспы имеет огромное значение, поэтому обработку и исследование биопроб начинают немедленно после поступления материала в лабораторию всеми доступными методами (вирусоскопическими, вирусологическими, серологическими и молекулярно-генетическими).

Диагностика натуральной оспы в период эпидемии не представляет трудностей. При спорадических заболеваниях диагноз всегда труден и ответственен.

Вирусоскопический метод. Наиболее эффективной в настоящее время признана электронная микроскопия. Присутствие поксвируса устанавливают по характерной форме и размерам, однако его невозможно дифференцировать от других поксвирусов, поэтому необходимы выделение возбудителя и его дальнейшая идентификация. Электронная микроскопия, помимо быстроты ответа (менее 2 ч), позволяет обнаружить вирус, утративший способность к репродукции.

Световая микроскопия в окрашенных гистологическими методами мазках материалов от больных практически утратила диагностическое значение. В препаратах из содержимого пузырьков обнаруживают крупные клетки с тельцами Гварниери (цитоплазматические включения овальной формы около ядра клетки). В мазках, приготовленных из содержимого оспенных пузырьков и окрашенных по методу Морозова, обнаруживают тельца Пашена - вирионы оспы.

Специфический антиген вируса оспы может быть также обнаружен и идентифицирован в мазках-отпечатках из элементов сыпи и отделяемого носоглотки с помощью непрямой иммунофлюоресценции.

Вирусологический метод. Для индикации и накопления вируса используют заражение 12-14-дневных развивающихся куриных эмбрионов на хорион-аллантаоисную

оболочку. После инкубации в течение 48-72 ч при температуре 34,5-35 °С вирус индицируется появлением на оболочке мелких (до 1 мм в диаметре) белесых бляшек.

Применяют инокуляцию исследуемого материала в различные культуры клеток. При индикации ориентируются на цитопатический эффект, который вирус вызывает в монослое, а также на феномен гемадсорбции.

Возможно заражение кролика в роговицу глаза содержимым везикулы больного (проба Пауля), которая проявляется образованием папулы, а в них - крупных клеток с тельцами Гварниери.

Наличие вирусосодержащего материала обнаруживают в положительной РГА с эритроцитами кур, а его идентификацию - в РТГА или РБН по торможению прямого эффекта.

Серологический метод применяют в целях идентификации инфекционного агента путем выявления вирусных антигенов в различных биологических материалах и специфических антител в сыворотке крови обследуемого. Уже после первой недели заболевания удается обнаружить вируснейтрализующие, комплементсвязывающие антитела и гемагглютинины, титры которых нарастают в процессе болезни.

Наиболее чувствительным и производительным является ИФА, а технически простым методом - реакция микропреципитации и преципитации в агаровом геле с использованием гипериммунной противосспенной сыворотки.

Применяют также РПГА. Для обнаружения вирусного материала используют эритроциты барана, сенсibilизированные специфическими IgG, для обнаружения титров специфических антител - сенсibilизацию вирусными антигенами.

Молекулярно-генетический метод. Широкое применение нашла ПЦР, в том числе ее мультиплексный вариант (МПЦР), который обеспечивает не только идентификацию ДНК отдельных штаммов вируса оспы, но и дифференциацию ДНК вируса оспы от близкородственных патогенных для человека ортопоксвирусов.

Вопросы для самоконтроля

Составьте пары «вопрос-ответ».

1. Диагностика гриппа	А. Определение степени авидности антител
2. Диагностика краснухи	Б. Обнаружение телец Бабеша-Негри
3. Диагностика натуральной оспы	В. При заражении в аллантаоисную полость куриного эмбриона
	Г. Обнаружение телец Гварниери

4. При исследовании беременной обнаружены низкоавидные IgG к вирусу краснухи. Оцените результат и предложите методы исследования для уточнения диагноза.

МОДУЛЬ 18. ВОЗБУДИТЕЛИ ПОЛИОМИЕЛИТА: ОСНОВНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, ПРИНЦИПЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Цели модуля

- Знать: свойства вирусов - возбудителей полиомиелита, особенности его патогенеза и иммунного ответа.
- Уметь: подбирать материал и методы для микробиологической диагностики полиомиелита.
- Владеть: методами оценки результатов проведенных исследований Полиомиелит - острое лихорадочное заболевание, которое иногда сопровождается поражением серого вещества (от греч. *polios*- «серый») спинного мозга и ствола головного мозга, в результате чего развиваются вялые параличи и парезы мышц ног, туловища, рук.

Возбудителей полиомиелита - полиовирусов - относят к семейству *Picornaviridae*, роду *Enterovirus*, виду *Poliovirus*.

Полиовирусы - мелкие, просто организованные вирусы сферической формы, диаметром 17-30 нм. Геном представлен одноцепочечной плюс-нитевой РНК, которая обладает инфекционной активностью. РНК заключена в капсид, построенный по кубическому типу симметрии. Капсид включает 60 субъединиц, каждая из которых состоит из четырех белков. Вирусы не культивируются в куриных эмбрионах, не обладают гемагглютинирующими свойствами, хорошо репродуцируются в первичных и перевиваемых культурах клеток из тканей человека и приматов. Размножение вирусов сопровождается цитопатическим эффектом. В культурах клеток под агаровым покрытием энтеровирусы образуют бляшки. Различают три серотипа внутри вида (1, 2, 3), которые не формируют перекрестного иммунитета.

Лабораторная диагностика. Основа современной диагностики полиомиелита - выделение и характеристика полиовируса из клинических проб. Эффективность вирусологической диагностики зависит от правильного сбора материала и времени взятия проб, а также от соблюдения правил их транспортировки в лабораторию в оптимальных условиях, что требует тесного взаимодействия между вирусологами, эпидемиологами и клиницистами.

Поскольку большая часть случаев полиомиелита протекает с поражением мотонейронов передних рогов спинного мозга, наиболее пристальное внимание уделяют исследованию случаев острых вялых параличей (ОВП). При этом каждому случаю эпидемиолог присваивает эпидномер, который включают в национальный регистр случаев ОВП.

Диагноз ставят на основании клинических признаков, факта выделения вируса и возрастания титра антител к нему как минимум в 4 раза.

18.1. СБОР ПРОБ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ВИРУСА

Полиовирус размножается в кишечном тракте в течение нескольких недель после инфицирования организма, поэтому пробы фекалий наиболее пригодны для выделения вируса. Глоточные тампоны менее подходят для этой цели, вирус обнаруживается в глотке 7-10 дней после начала заболевания. Несмотря на нейротропность вируса, его редко обнаруживают в спинномозговой жидкости. В летальных случаях секционные пробы для выделения вируса должны быть взяты в первые часы после смерти.

Пробы фекалий от случаев полиомиелита должны быть взяты в ранние сроки после начала заболевания (до 7-14 дней). Поскольку вероятность наличия вируса в фекалиях может колебаться, берут две пробы объемом 2-4 г с интервалом 24-48 ч.

18.2. ВЫДЕЛЕНИЕ ПОЛИОВИРУСА ИЗ КЛИНИЧЕСКИХ ПРОБ

Все фекальные пробы обрабатывают хлороформом, к действию которого энтеровирусы устойчивы, что позволяет избавиться от контаминации пробы грибами, бактериями и потенциально токсичными липидами, а также разрушить вирусные агрегаты, способные влиять на выделение вируса.

Для выделения полиовируса, согласно рекомендациям ВОЗ, используют две линии клеток: RD (клетки рабдомиосаркомы человека) и L20B (генно-модифицированные L-клетки мыши, способные экспрессировать полиовирусный рецептор). L20B-клетки избирательно чувствительны к полиовирусам, вызывающим в них характерный цитопатический эффект (ЦПЭ).

Некоторые адено- и реовирусы могут размножаться в этих клетках, вызывая отличное по виду поражение клеток. Лишь некоторые энтеровирусы (например, Коксаки А) могут размножаться в L20B, вызывая типичный для энтеровирусов ЦПЭ. Использование этих двух линий клеток обеспечивает высокую чувствительность и специфичность при обнаружении полиовируса, а также позволяет унифицировать данные, полученные в лабораториях по всему миру.

Для выделения вируса клеточный монослой обеих линий клеток (RD и L20B) на 2-3-и сутки после посадки одновременно заражают фекальной суспензией и наблюдают в течение 5 сут до проявления характерного ЦПЭ. В случае отсутствия ЦПЭ проводят слепой пассаж в течение 5 сут в соответствующей линии клеток; в случае повторного отсутствия ЦПЭ пробу считают негативной. В случае наличия ЦПЭ проводят перекрестный пассаж в течение 5 дней в другую линию клеток. Таким образом, общее время наблюдения за клетками составляет как минимум 10 дней. В случае наличия ЦПЭ в клетках L20B на любой из стадий пробу считают положительной на наличие полиовируса и направляют на идентификацию выделенного полиовируса.

18.3. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВЫДЕЛЕННОГО ПОЛИОВИРУСА

Типирование выделенного полиовируса проводят в реакции нейтрализации инфекционности с помощью поликлональных кроличьих сывороток к типам 1, 2 и 3 полиовируса. Для этого вирус смешивают в равных объемах с отдельными моносыворотками (1, 2, 3) и их смесями (1+2, 1+3, 2+3, 1+2+3), выдерживают 1 ч при температуре 36 °С для нейтрализации вируса антителами, добавляют суспензию клеток, после чего реакцию наблюдают в течение 5 сут. В случае взаимодействия вируса и сыворотки ЦПЭ не проявляется. Сочетание лунок с ЦПЭ и без него позволяет типировать вирус и определить наличие смеси полиовирусов.

Все выделенные полиовирусы подвергают серотипированию и внутритиповой дифференциации (ВТД) в целях определения происхождения вируса (вакцинный, вакцинородственный или дикий). Для этого используют коммерческие наборы на основе ОТ-ПЦР с детекцией в реальном времени (например, *Poliovirus Diagnostic RT-PCR*, CDC) со специфическими праймерами:

- родовыми - panEV;
- полиовирусными - panPV;
- серотипирующими - PV1, PV2, PV3;

- к вакцинным штаммам Сэбина - Sab123.

Поскольку в настоящее время циркулирующими полиовирусами 2-го типа в мире являются только вакцинородственные, вирусы, дифференцированные как вакцинные полиовирусы 2-го типа, подлежат более детальному анализу. Например, проводят определение нуклеотидной последовательности капсидного белка VP1 для всех выделенных полиовирусов 2-го типа. В последующем анализе последовательности выявляют количество синонимических и несинонимических мутаций, позволяющих однозначно отнести полиовирус к вакцинному или вакцинородственному.

18.4. СЕРОКОНВЕРСИЯ

Серологическую диагностику проводят на основании анализа двух проб крови: первой - взятой как можно раньше, в первые 7 дней от начала заболевания, второй - 2-3 нед спустя. Определение титра нейтрализующих антител проводят в реакции нейтрализации инфекционности в культуре клеток против трех типов штаммов Сэбина.

Вопросы для самоконтроля

1. Что составляет основу диагностики полиомиелита?
2. Внутритиповую идентификацию вируса полиомиелита проводят ...
3. Для серологической диагностики полиомиелита используют реакцию .

МОДУЛЬ 19. ВОЗБУДИТЕЛИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ: ОСНОВНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, ПРИНЦИПЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

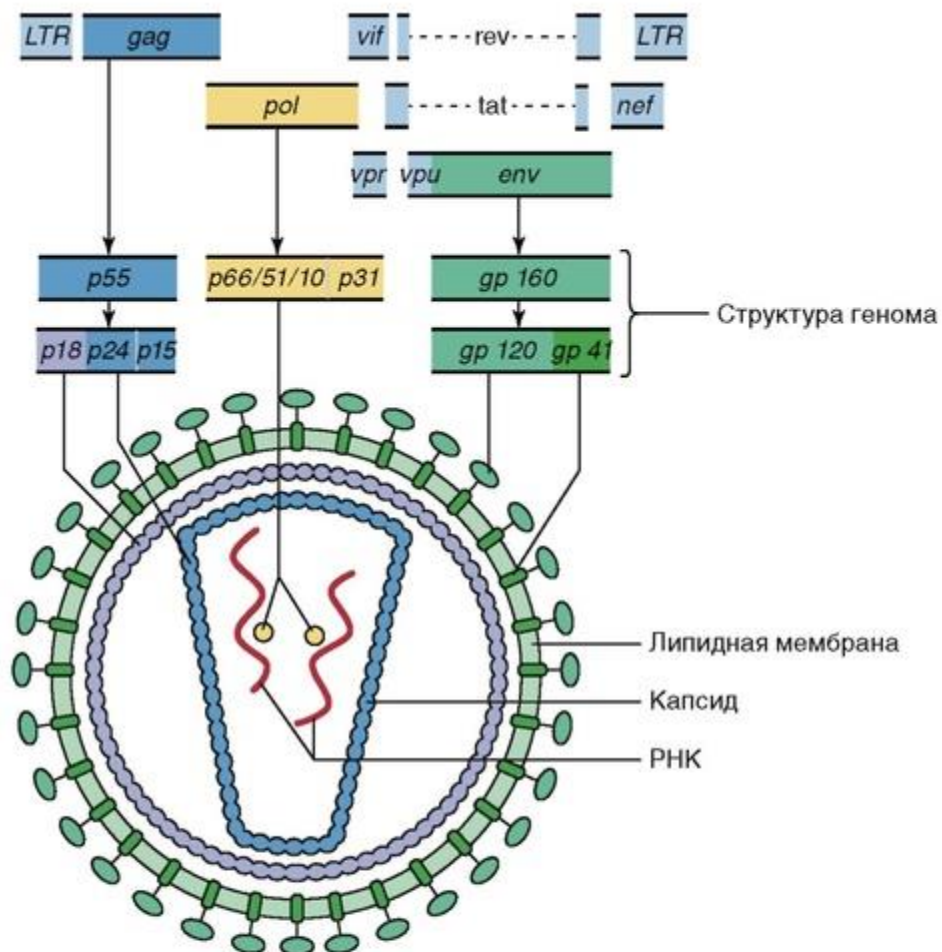
Цели модуля

- Знать: свойства возбудителей ВИЧ-инфекции, особенности патогенеза и иммунного ответа при ВИЧ-инфекции, методы диагностики ВИЧ-инфекции.
- Уметь: подбирать материал и методы исследования, оценивать результаты анализов на ВИЧ-инфекцию.
- Владеть: методами оценки результатов анализов на ВИЧ-инфекцию.

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) вызывает ВИЧ-инфекцию, заканчивающуюся синдромом приобретенного иммунодефицита (СПИД). СПИД характеризуется тяжелым поражением иммунной системы, длительным течением, полиморфностью клинических симптомов, абсолютной летальностью, быстрым эпидемическим распространением. ВИЧ-инфекция - типичный антропоноз.

ВИЧ - лимфотропный вирус, относят к семейству *Retroviridae*, роду *Lentivirus*. Выделяют два типа вируса - ВИЧ-1 и ВИЧ-2, которые отличаются по структурным и антигенным характеристикам. ВИЧ - сложно организованный вирус шарообразной формы, диаметром 100-150 нм. Капсид имеет форму усеченного конуса (рис. 19.1). В капсиде хранятся две молекулы плюс РНК, ферменты - обратная транскриптаза, интегразы и протеаза. Сам капсид состоит из 2000 копий белка р24. Капсид окружен матриксным белком р17, сверху находится наружная двухслойная липопротеиновая оболочка, пронизанная гликопротеиновыми шипами. Каждый шип состоит из трех молекул трансмембранного гликопротеина gp41 и поверхностного гликопротеина gp120.

СТРОЕНИЕ ГЕНОМА ВИЧ-1



Ген	Кодируемый белок	Функция
<i>gag</i>	<i>p55</i>	<i>p55</i> нуклеокапсид, предшественник <i>p18</i> , <i>p24</i> , <i>p15</i>
	<i>p18</i>	Матричный белок
	<i>p24</i>	Белок капсида
<i>pol</i>	<i>p66/51/10</i>	Полимеразная область Обратная транскриптаза/РНКаза/протеаза
	<i>p31</i>	Интеграза
<i>env</i>	<i>gp 160</i>	Гликопротеин, предшественник <i>gp120</i> , <i>gp41</i>
	<i>gp 120</i>	Поверхностный белок (связывается с CD4-молекулой клетки хояина)
	<i>gp 41</i>	Трансмембранный белок

Рис. 19.1. Схема строения вириона вируса ВИЧ-1 и его генома

Геном ВИЧ состоит из трех основных структурных генов (*gag*, *pol*, *env*) и семи регуляторных и функциональных генов. Ген *gag* (от англ. *group antigen* - «групповой антиген») кодирует матричные, капсидные, нуклеокапсидные белки. Ген *pol* кодирует ревертазу, интегразу, РНКазу и протеазу. Ген *env* кодирует поверхностный гликопротеин *gp120* и трансмембранный *gp41* (см. рис. 19.1) Функциональные гены выполняют регуляторные функции, обеспечивают процессы репродукции и участие вируса в инфекционном процессе. Геном обладает большой изменчивостью.

Основные антигены вируса - группоспецифический антиген *p24* и поверхностные гликопротеины *gp160*, *gp120*, *gp41*.

Поверхностный антиген gp120 содержит участок, ответственный за прикрепление вируса к клеточному рецептору CD4 и корецепторам. Вирус культивируется только в специальных культурах клеток.

Основные способы передачи ВИЧ-инфекции:

- гетеро- и гомосексуальные контакты;
- переливание крови и кровепродуктов;
- внутривенное употребление наркотиков;
- пересадка органов и тканей;
- вертикальная передача (от матери к ребенку во время беременности, родов, кормления грудью);
- профессиональные заражения (укол или порез инфицированными инструментами).

ВИЧ инфицирует клетки, несущие на своей поверхности CD4-рецептор и хемокиновые рецепторы. CD4-рецептором и хемокиновыми рецепторами обладают Т-хелперы, макрофаги, фолликулярные дендритные клетки, клетки островков Лангерганса, клетки микроглии мозга. В результате взаимодействия с ВИЧ гибнут Th-лимфоциты, клетки микроглии мозга. В-лимфоциты подвержены неспецифической поликлональной активации. При этом снижается количество Т4-лимфоцитов, а также соотношение Т4/Т8. Моноциты, макрофаги, клетки островков Лангерганса, дендритные клетки в результате взаимодействия с ВИЧ не деградируют, действуя как резервуар инфекции для заражения других клеток путем межклеточного слияния, позволяя вирусу распространяться, избегая нейтрализующего действия антител.

Поражение иммунных клеток приводит к развитию иммунодефицитов и появлению вторичных заболеваний инфекционной и неинфекционной природы, а также злокачественных опухолей.

Иммунный ответ. Первые недели после инфицирования представляют собой период серонегативного окна, когда антитела к ВИЧ не выявляются. Его продолжительность в среднем составляет 3 нед-3 мес, но может длиться и до 6-19 мес.

Антиген p24 выявляют в крови методом ИФА через 1-2 нед после заражения и определяют до 8 нед, затем его содержание резко снижается. В течение ВИЧ-инфекции отмечают второй подъем содержания в крови белка p24, он приходится на период формирования СПИД. Исчезновение в крови p24 и появление специфических антител к белкам ВИЧ знаменует наступление сероконверсии. Однажды появившись, антитела к gp120, gp41 остаются в организме постоянно, а антитела к p24 уменьшаются, что совпадает с переходом инфекционного процесса в стадию СПИД (рис. 19.2). Однако, несмотря на появление антител, уровень их нейтрализующей активности низкий в связи с появлением новых вариантов вируса, вследствие чего происходит ускользание ВИЧ от иммунного ответа. Защитный иммунитет при ВИЧ-инфекции не формируется.

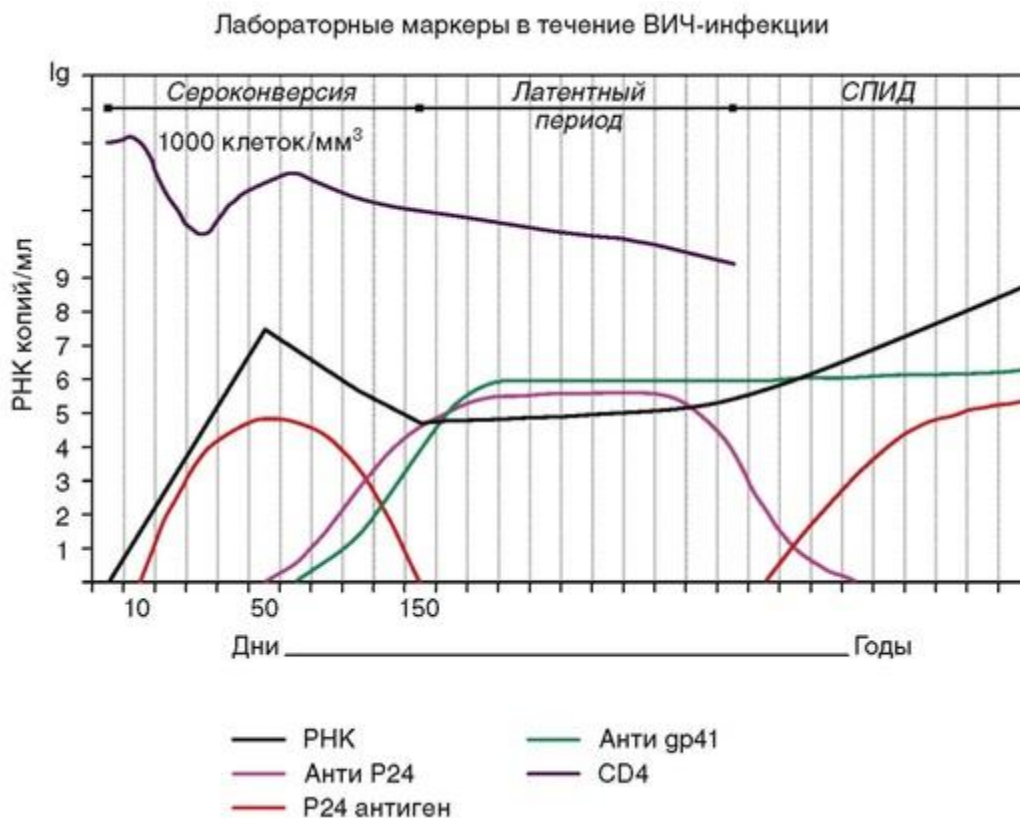


Рис. 19.2. Лабораторные маркеры при ВИЧ-инфекции

Лабораторная диагностика

Первичную диагностику (постановку диагноза) ВИЧ-инфекции проводят серологическим методом. ОТ-ПЦР в связи с изменчивостью вируса при первичной постановке диагноза не используют. Определение вирусной РНК в крови проводят в качестве вторичной диагностики для:

- определения вирусной нагрузки;
- оценки эффективности лечения, формирования резистентности к препаратам противовирусной терапии;
- типирования вируса.

Первичную диагностику ВИЧ-инфекции (постановку диагноза) проводят определением антител/антигенов ВИЧ методом ИФА с последующим отдельным подтверждением антител в реакции иммунного блоттинга.

Серологическое исследование проводят в два этапа - скрининговый и подтверждающий.

- На первом этапе проводят выявление суммарного спектра антител/антигенов ВИЧ с использованием тестов для одновременного определения антител и р24 антигена ВИЧ методом ИФА.
- На втором этапе методом иммуноблоттинга проводят определение антител к отдельным антигенам.

Первичный положительный результат необходимо перепроверять повторным исследованием образца в той же тест-системе, но желательно другой серии и другим лаборантом. Если при повторном исследовании получен отрицательный результат, исследование проводят 3 раза.

Серопозитивную (реактивную) на скрининговом этапе сыворотку крови направляют на референтные исследования, выполняемые с использованием двух-трех высокоспецифичных ИФА-тест-систем. В случае двух положительных результатов проводят экспертное исследование методом иммуноблоттинга - основного метода для подтверждения наличия вирусспецифических антител в исследуемой сыворотке.

Вирусные белки, к которым определяют антитела в иммуноблотте, следующие (рис. 19.3):

- Gp160;
- Gp120;
- P17 - матриксный белок;
- P24 - группоспецифический антиген;
- P9 - нуклеокапсидный белок;
- P10/11 - протеаза;
- P65/51 - ревертаза;
- P31/32 - интегразы;
- Gp41;
- P55 -белок-предшественник.



Рис. 19.3. Результаты иммуноблота при диагностике ВИЧ-инфекции Оценка результатов

- Положительный результат - обнаружение в сыворотке антител к двум вирусным белкам из группы *env* наличием или отсутствием белков, продуктов других структурных генов (*gag*, *pol*).
- Неопределенный результат - обнаружение в сыворотке антител к белкам из групп *gag*, *pol*.
- Отрицательный результат - отсутствие антител к вирусспецифическим белкам.

В случае получения реактивного результата в скрининговом и отрицательного результата в подтверждающем тесте следует повторить тестирование через 3 нед, так как нельзя исключить острую ВИЧ-инфекцию.

Подозрение на ВИЧ-2 инфекцию может наблюдаться при сочетании следующих результатов:

- положительного результата в скрининговом тесте;
- отрицательного иммуноблота;
- низкой вирусной нагрузки;
- снижения CD4.

У новорожденных, рожденных от ВИЧ-инфицированных матерей, диагноз можно ставить только через 1,5 года после рождения вследствие возможности нахождения в крови антител, полученных от матери при трансплацентарной передаче.

Экспресс-тесты выполняют ту же функцию, что и скрининговые, и должны подтверждаться в иммуноблоте. Их преимущества - простота, можно использовать капиллярную кровь из пальца, быстрое получение результата (через 15-20 мин). Они важны в ситуациях, когда необходимы немедленные результаты.

После постановки диагноза ВИЧ-инфекции для оценки иммуносупрессии определяют количество CD4 (<500/мл); CD4/CD8 (<1,5), а также уровень иммуноглобулинов в крови.

Вопросы для самоконтроля

1. Первичную диагностику ВИЧ-инфекции проводят ...
2. Определение вирусной нагрузки проводят методом ...
3. Подтверждающей реакцией в постановке диагноза ВИЧ-инфекции является .
4. В крови пациента методом иммуноблота обнаружены антитела к gp160, gp41. Оцените результат.

МОДУЛЬ 20. ВОЗБУДИТЕЛИ ВИРУСНЫХ ГЕПАТИТОВ: ОСНОВНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, ПРИНЦИПЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Цели модуля

- Знать: свойства вирусов - возбудителей гепатитов А, В, С, D, Е; механизмы инфицирования ими человека, особенности патогенеза и иммунного ответа.
- Уметь: подбирать материал и методы для микробиологической диагностики вирусных гепатитов А, В, С, D, Е.
- Владеть: методами оценки результатов проведенных исследований на инфицированность вирусами гепатитов А, В, С, D, Е.

Вирусные гепатиты - группа инфекционных заболеваний, характеризующихся поражением печени. В настоящее время выделяют гепатиты А, В, С, D, Е, возбудители которых различаются по таксономическим признакам, а заболевания, вызываемые ими, - по механизму передачи, патогенетическим особенностям и вероятности перехода в хроническую форму (табл. 20.1).

Таблица 20.1. Этиологическая структура вирусных гепатитов

Заболевание	Возбудитель	Механизм передачи	Возможность хронизации
Гепатит А	Семейство <i>Picornaviridae</i> , род <i>Hepatovirus</i> ВГА	Фекально-оральный	-

Гепатит В	Семейство <i>Hepadnaviridae</i> , род <i>Orthohepadnavirus</i> ВГВ	Кровяной	+
Гепатит С	Семейство <i>Flaviviridae</i> , род <i>Hepacivirus</i> ВГС	Кровяной	+
Гепатит D	Неклассифицированный дефектный РНК-содержащий вирус ВГД	Кровяной	+
Гепатит E	Род <i>Hepevirus</i> ВГЕ	Фекально-оральный	-

Основой лабораторной диагностики вирусных гепатитов служат:

- знания об их возбудителях и их репликации;
- информация о появлении и исчезновении маркеров инфицированности в течение инфекционного процесса.

20.1. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА В

Лабораторная диагностика вирусного гепатита В (ВГВ) основана на выявлении специфических для ВГВ антигенов и соответствующих антител в крови, а также вирусной ДНК (рис. 20.1).

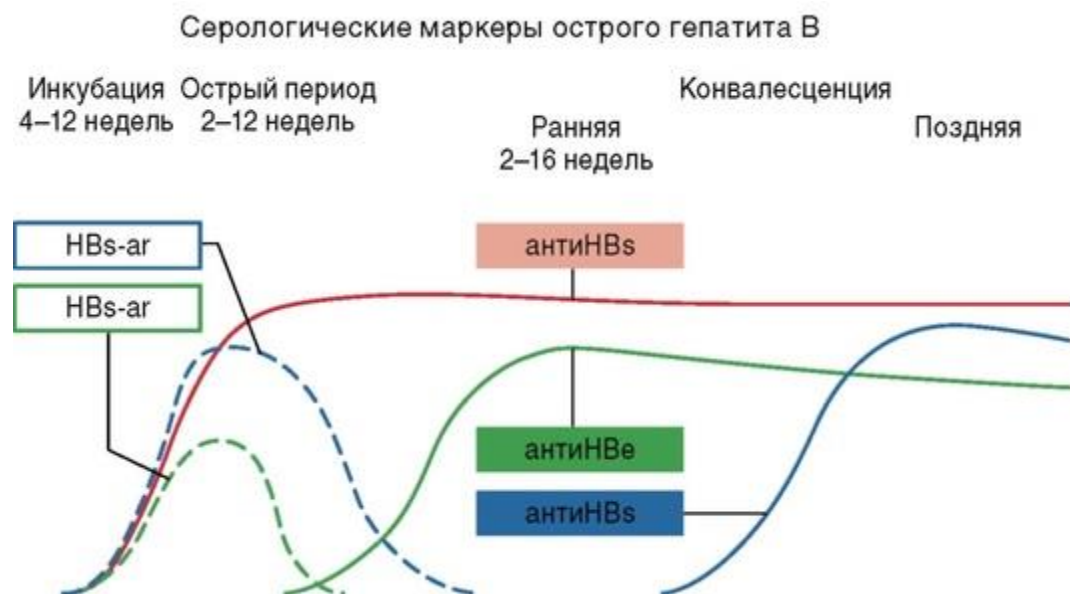


Рис. 20.1. Диагностические маркеры при вирусном гепатите В

Основные маркеры:

- HB-АГ/анти-HBe-АГ;
- анти-HBc-IgM и анти-HBc-IgG;
- HBe-АГ/анти-HBe-АГ;
- ДНК ВГВ.

Самый ранний маркер, который появляется еще в инкубационном периоде, - HBs-АГ, поверхностный антиген ВГВ. При острой инфекции HBs-АГ обнаруживают в крови в течение 5-6 мес, после чего его концентрация в крови снижается, что свидетельствует о стадии разрешения заболевания. Если HBs-АГ обнаруживают более 6 мес от первых

проявлений заболевания, это свидетельствует о переходе болезни в хроническую форму. Наличие HBs-АГ свидетельствует о присутствии ВГВ в организме человека.

HBe-АГ и ДНК ВГВ появляются позже. Присутствие HBe-АГ указывает на активное размножение вируса и является маркером инфекционности. При остром процессе этот маркер появляется в инкубационном периоде. Его обнаружение в крови более 1 мес может свидетельствовать о переходе заболевания в хроническую форму. Выявление HBe-АГ свидетельствует об активной репликации вируса и высокой инфекционности крови. При благополучном исходе болезни HBe-АГ из крови исчезает.

Анти-HBc суммарные антитела (IgM, IgG) - маркеры памяти ВГВ, определяются после обнаружения в крови HBs-АГ и HBe-АГ и обнаруживаются в крови длительное время после разрешения болезни.

Анти-HBc-IgM - маркеры активного процесса в печени, циркулируют в крови в течение 6-12 мес и исчезают после выздоровления.

Анти-HBc-IgG появляются почти одновременно с анти-HBc-IgM и выявляются часто пожизненно, указывая на перенесенную инфекцию.

Анти-HBe-АГ появляются после исчезновения HBe-АГ в крови. Этот процесс называют сероконверсией HBe-АГ, он является благоприятным прогностическим признаком. После перенесенного ВГВ анти-HBe могут выявляться до 5-6 лет.

Анти-HBэ-АГ - протективные антитела к поверхностному антигену. Приходят на смену HBs-АГ и указывают на выздоровление и формирование иммунитета к ВГВ. В некоторых случаях HBs-АГ и анти-HBs-АГ обнаруживают одновременно.

У HBs-АГ/HBe-АГ-позитивных пациентов в сыворотке обнаруживают ВГВ ДНК (HBV DNA). У пациентов, которые излечились от острого гепатита, ДНК в сыворотке не определяют. Интерпретация результатов изложена в таблицах 20.2, 20.3.

Таблица 20.2.Интерпретация маркеров вирусного гепатита В

HBs-АГ	HBe-АГ	Анти-HBc-IgM	Анти-HBc суммарные антитела	Анти-HBe-АГ	Анти-HBs-АГ	ВГВ ДНК	Трактовка результата
+	+	+	+	-	-	+	Острый гепатит
+	+	+/-	+	-	-	+	Хронический активный гепатит

Окончание табл. 20.2

HBs-АГ	HBe-АГ	Анти-HBc-IgM	Анти-HBc суммарные антитела	Анти-HBe-АГ	Анти-HBs-АГ	ВГВ ДНК	Трактовка результата
-	-	-	+	-/+	+	-	Перенесенный гепатит
+	-	-	-	-	-/+	-	Здоровое носительство
-	-	-	-	-	+	-	Состояние после иммунизации

Таблица 20.3. Интерпретация маркеров вирусного гепатита С

Анти-ВГС IgM	Анти-ВГС <i>core</i> IgG	Анти-ВГС NS IgG	РНК ВГС	Трактовка результата
+	+	-	+	Острый гепатит С
+	+	+	+	Хронический гепатит С, стадия реактивации
-	+	+	-	Хронический гепатит С, латентная фаза

20.2. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА D

Вирус гепатита D - неклассифицированный дефектный вирус, содержащий однонитчатую РНК и дельта-антиген. В качестве оболочки он использует HBs-АГ ВГВ.

Лабораторную диагностику вирусного гепатита D (ВГD) осуществляют путем обнаружения серологических маркеров, включая наличие дельта-антигена, антител к нему и вирусной РНК.

Обнаружение дельта-антигена в крови и ткани печени свидетельствует о наличии активной инфекции. Маркером активной репликации вируса является также появление анти-ВГD-IgM.

Серологические маркеры инфекции зависят от того, как был приобретен вирус: в виде коинфекции совместно с ВГВ или суперинфекции у больных с хронической формой ВГВ.

- При коинфекции (которая имеет доброкачественное течение) антитела классов IgM и IgG обнаруживают в течение периода заболевания, а затем они исчезают, не оставляя признаков перенесенной инфекции. При этом в крови также определяют маркеры острого ВГВ.

- При суперинфекции серологическая картина имеет следующие особенности. Титр HBs-АГ снижается к моменту появления антител к ВГD и ВГD РНК в крови. Антитела и РНК определяют длительное время в крови наряду с маркерами хронического ВГВ. При этом анти-ВГD-IgM определяют репликацию вируса в организме, а анти-ВГD-IgG свидетельствуют о перенесенной инфекции или возможном инфицировании организма вирусом. ВГD РНК маркирует наличие и репликацию вируса в организме.

20.3. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА С

Лабораторная диагностика вирусного гепатита С (ВГС) основана на определении маркеров этой инфекции: РНК вируса методом ПЦР и антител к вирусу (суммарных, отдельных классов иммуноглобулинов IgM и IgG к вирусу и отдельным вирусным белкам).

РНК ВГС - показатель активной репликации вируса. Она может быть обнаружена уже на 1-2-й неделе после инфицирования и является «золотым стандартом» диагностики. Анти-НВС-антитела в 80% случаев обнаруживают на 5-6-й неделе от момента инфицирования и у 90% лиц - на 12-й неделе после инфицирования, поэтому ПЦР - метод выбора для ранней диагностики ВГС. Обнаружение антител IgG свидетельствует об инфицированности организма вирусом или о перенесенной инфекции. Этот тест является скрининговым. Для уточнения диагноза определяют наличие IgM и IgG к ядерному (*core*) антигену (НСс-АГ) и антитела к неструктурным NS-белкам вируса.

Наличие IgM-антител к НСс-АГ указывает на текущую инфекцию (острую или хроническую в стадии развития). Обнаружение IgG к НСс-АГ свидетельствует об инфицированности вирусом или перенесенной инфекции. Антитела к неструктурным белкам обнаруживают в хронической стадии (см. табл. 20.2, 20.3).

20.4. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА А

Для постановки диагноза вирусного гепатита А (ВГА) используют выявление анти-ВГА-IgM в дожелтушный и желтушный периоды методом ИФА. Антитела сохраняются на протяжении 2-6 мес и являются единственным достоверным маркером острого периода заболевания. Анти-ВГА-IgG появляются в крови после исчезновения из нее вируса, их титр быстро нарастает и сохраняется пожизненно, предохраняя от повторного заражения. Имеющиеся тест-системы для определения в крови и фекалиях методом ПЦР вирусной РНК не получили широкого распространения.

20.5. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА Е

Лабораторная диагностика вирусного гепатита Е (ВГЕ) основана на выявлении анти-ВГЕ-IgM в сыворотке крови методом ИФА, которые появляются с 21-х суток от момента заражения и присутствуют на протяжении 2-24 нед. Быстрое исчезновение анти-ВГЕ-IgM из сыворотки крови не позволяет использовать их в качестве обязательного лабораторного критерия для подтверждения диагноза. Выявить анти-ВГЕ-IgG можно, начиная с 40-х суток от заражения, причем они сохраняются до 2 лет. Важную роль при постановке диагноза ВГЕ играет эпидемиологический анамнез, т.е. пребывание больного в эндемичном по ВГЕ регионе. Сходство клинической картины ВГА и ВГЕ заставляет окончательно подтвердить или отвергнуть диагноз только после лабораторного исследования сыворотки крови на специфические антитела. Определяют вирусную РНК методом ПЦР; существует методика определения вирусного антигена в фекалиях методом РИФ.

Вопросы для самоконтроля

1. Инфицированность организма вирусом гепатита В определяют по наличию в крови ...
2. Показатель размножения вируса гепатита В в организме - определение в крови .
3. Наличие в крови анти-НВс-IgM свидетельствует о ...
4. Раннюю диагностику вирусного гепатита С проводят методом .
5. При хронической форме вирусного гепатита С в крови определяют .
6. Острый период заболевания вирусным гепатитом А характеризуется появлением в крови .

МОДУЛЬ 21. ВОЗБУДИТЕЛИ НЕЙРОВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ: ОСНОВНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, ПРИНЦИПЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Цели модуля

- Знать: этиологическую структуру вирусных инфекций, вызывающих поражение нервной системы.
- Уметь: подбирать материал и методы исследования для диагностики клещевого энцефалита и бешенства.
- Владеть: методами оценки результатов проведенных исследований.

21.1. ВИРУС КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА: ОСНОВНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, ПРИНЦИПЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Клещевой энцефалит (клещевой весенне-летний энцефалит) - природно-очаговая трансмиссивная острая вирусная инфекция с преимущественным поражением ЦНС; она отличается полиморфизмом клинических проявлений и тяжести течения (от легких, стертых форм до тяжелых, прогрессивных).

Вирус клещевого энцефалита (КЭ) относят к роду *Flavivirus*, входящему в семейство *Flaviviridae*. Это сложно организованный вирус сферической формы, диаметром 40-60 нм. Геном вируса КЭ представлен однонитчатой плюс-РНК, окруженной капсидом с кубическим типом симметрии. Нуклеокапсид заключен в суперкапсид с гликопротеинами. Зрелый вирус содержит три структурных белка: капсидный белок С, мембранный белок М и поверхностный белок Е (димер). Белок Е обуславливает тропизм вирусов к клеткам. На его поверхности расположены детерминанты висцеротропности и нейровирулентности, имеющие некоторые антигенные различия, но только один структурный гликопротеин Е индуцирует образование вируснейтрализующих антител, общих для всех известных генотипов вируса.

Вирус КЭ патогенен для ряда лабораторных и диких животных. Наибольшей чувствительностью обладают новорожденные и молодые белые мыши. После заражения в мозг, интраперитонеально, внутримышечно у этих животных развивается энцефалит, заканчивающийся их гибелью. Вирус КЭ обладает цитопатогенным действием (ЦПД), вызывая цитопатические изменения в первичных и перевиваемых культурах клеток почек эмбриона свиньи, и размножается без выраженного ЦПД во многих других клеточных культурах. В мозге инфицированных мышей и культуральной жидкости зараженных культур происходит накопление вируса КЭ и специфических вирусных антигенов - комплементсвязывающих, гемагглютинирующих, преципитирующих и др.

Лабораторная диагностика КЭ основана на обнаружении возбудителя в острой стадии заболевания, выявлении прироста титра специфических антител у реконвалесцентов, а также на выделении вируса от кровососущих членистоногих и их прокормителей, отловленных в природных очагах инфекции.

Материалы для исследования - кровь, плазма или сыворотка крови, а при аутопсии - мозг. Наиболее целесообразно выделять вирус из крови, взятой на первой неделе заболевания. Кровь забирают из вены шприцем в объеме не менее 5 мл в стерильную пробирку и разделяют на две части: одну - для выделения вируса (сразу же замораживают), другую в целях получения сыворотки для серологических исследований ставят на 1,5 ч в термостат или на 1 сут в холодильник при температуре 4 °С. После выдержки в термостате (холодильнике) кровь центрифугируют в течение 20 мин при 1500 об./мин. Сыворотку отсасывают в стерильный пенициллиновый флакон или другую емкость и хранят при температуре 4 °С или в замороженном состоянии до момента

исследования. Если исследование проводят в течение 3-4 сут после получения сыворотки, замораживать ее не следует.

Для выделения вируса из мозга умерших больных лучше брать кусочки ствола и спинного мозга. Если взятый материал в данный момент не представляется возможным подвергнуть исследованию, его сохраняют в замороженном состоянии или в 50% глицерине (рН=7,2-7,4) при температуре 4 °С.

Для выделения возбудителя КЭ наиболее пригодными являются новорожденные (1-3-дневные) или молодые (5-6 г) белые мыши, перевиваемые культуры клеток почки эмбриона свиньи (ПЭС), почки эмбриона зеленых мартышек (*Vero*) в возрасте 1-3 сут, так как они обладают высокой чувствительностью к вирусу. Используют также первично-трипсинизированные культуры из тканей куриного эмбриона (ФЭК) и другие культуры клеток.

Белых мышей заражают интрацеребрально приготовленными 10% суспензиями в объеме 0,01-0,02 и 0,02-0,03 мл соответственно. Каждой пробой заражают по 6-8 животных. Срок наблюдения составляет 14 дней. Мозг мышей, заболевших и погибших через 3 дня и более после заражения, используют для последующих пассажей.

Заражение культур клеток. В 2-4 пробирки с отмытым раствором Хенкса клеточным монослоем вносят по 0,1 мл исследуемого материала. После адсорбции вируса на клетках (1 ч при комнатной температуре или 30 мин при температуре 37 °С) в пробирки вносят поддерживающую среду 199 (рН=7,6) с 3% инактивированной бычьей сывороткой. В зависимости от количества вируса в инокуляте накопление его достигает максимума через 3-6 сут инкубации культуры клеток при температуре 37 °С. В эти сроки делают второй пассаж исследуемого материала *in vitro*, за которым наблюдают в течение 5-7 дней.

Идентификация выделенного вируса КЭ. В культуре клеток ПЭС вирус КЭ обнаруживают по характерному цитопатическому действию, идентифицируют прямым или непрямым методом флюоресцирующих антител; в культуре клеток ФЭК или *Vero* - методом флюоресцирующих антител. Осуществляют индикацию и идентификацию вируса.

Серологическая диагностика. Для серодиагностики необходимы парные пробы сывороток крови. Первую берут в первую неделю болезни, а вторую - через 10-15 дней после первой. При подостром или хроническом течении процесса берут еще одну пробу сыворотки через 1-2 мес. Основные серологические методы, используемые для диагностики КЭ, - РСК, РТГА, РН, а также методы ускоренной диагностики - РИФ, ИФА, РНГА, реакция торможения непрямой гемагглютинации (РТНГА).

Реакция связывания комплемента (РСК) - наиболее универсальный метод серологической диагностики. Комплементсвязывающие антитела появляются у больных обычно в конце 1-й недели болезни, достигают максимума к 6-7-й неделе и держатся в стационарных титрах до 6 мес. Обнаружение комплементсвязывающих антител является чаще всего свидетельством недавно перенесенной инфекции. В диагностических целях исследуют (обязательно в одном и том же опыте) парные сыворотки. Четырехкратное или более значительное нарастание титра антител к антигену вируса КЭ - основание для постановки диагноза.

Антигемагглютинины к вирусу КЭ, которые определяют в РТГА, при острой инфекции появляются в сыворотках больных на 1-й неделе заболевания, нарастая до максимальных титров к 5-6-й неделе реконвалесценции. Высокие титры антигемагглютининов наблюдают у реконвалесцентов в течение 6-8 мес. В последующие 2 года антитела, как правило, сохраняются, постепенно снижаясь в титрах.

В РТГА двукратные разведения сыворотки взаимодействуют с постоянной дозой антигена - разведением, содержащим 8 ГАЕ антигена. Реакцию ставят в объеме 4 капли: по 1 капле антигена и сыворотки и 2 капли 0,4% взвеси эритроцитов в фосфатном буфере. Реакция протекает в два этапа:

- первый - соединение сывороток и антигенов и контакт их при температуре 4 °С в течение 18-20 ч;
- второй - добавление эритроцитов, экспозиция 20-40 мин и учет результатов.

Титром сыворотки считают наивысшее разведение, которое вызывает задержку гемагглютинации с 8 ГАЕ антигена. Сыворотки считают положительными, если они подавляют гемагглютинацию в разведении 1:10 и выше.

Реакция нейтрализации (РН). С помощью РН можно выявлять антитела в сыворотках крови больного или иммунного организма. Наличие вируснейтрализующих антител - наиболее постоянный специфический показатель инфекции. Вируснейтрализующие антитела появляются на 2-й неделе болезни, достигают высоких титров через 4-5 нед и сохраняются в крови переболевших в течение многих лет. РН - наиболее специфичная серологическая реакция в вирусологии. На практике эту реакцию ставят в основном в тех случаях, когда результаты других серологических методов, применяемых в опыте, вызывают сомнение. В ней используют такие компоненты, как вирус, сыворотки, лабораторные животные или культуры клеток.

Реакция иммунофлюоресценции (РИФ) - достаточно чувствительный, высокоспецифичный и быстрый способ диагностики КЭ. В практике находят применение два варианта постановки реакции - прямой и непрямой методы РИФ.

Положительную реакцию определяют по специфическому изумрудно-зеленому свечению антигена в инфицированных клетках на слабом оранжево-красном, желто-оранжевом или серо-желтом фоне флюоресценции нормальных клеток.

Иммуноферментный анализ (ИФА) применяют для выявления вирусспецифических антигенов в антигенсодержащих материалах, таких как кровь, органы и ткани больных людей и животных, инфицированные клеточные культуры и переносчики, а также для серологической диагностики вируса КЭ. ИФА характеризуется высокой чувствительностью, специфичностью, быстротой выполнения (5-6 ч). При необходимости реакция может быть поставлена в полевых условиях.

Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА) может быть использована для индикации вируса в различных источниках, например, в крови, СМЖ или органах больных людей и трупных материалах животных, а также в членистоногих переносчиках.

Реакцию торможения непрямой гемагглютинацию (РТНГА) применяют для специфической диагностики арбовирусных инфекций (в том числе и КЭ) и сероэпидемиологических исследований. Этот метод характеризуется высокой чувствительностью, превышающей чувствительность ряда других серологических тестов, что позволяет обнаруживать специфический вирусный антиген непосредственно в исходных материалах без предварительного заражения лабораторных животных или клеточных культур.

При исследовании сывороток больных необходимо соблюдать правила, установленные для работы с вирусом клещевого энцефалита, так как в пробах крови может присутствовать возбудитель КЭ или другой инфекции в случаях неточности клинической диагностики.

21.2. БЕШЕНСТВО

Бешенство (от лат. *rabies*, греч. *lyssa*; синонимы: водобоязнь, гидрофобия) - острое нейровирусное заболевание с летальным исходом. Вирус бешенства относят к семейству *Rhabdoviridae* (от греч. *rabdos* - «пуля, прут»), роду *Lyssavirus*. Вирион имеет пулевидную форму размером 60-80 нм и представляет собой сложно организованный вирус, содержащий однонитевую линейную минус-РНК. РНК вируса совместно с белками L, N (капсидом) и Р (полимеразой) формирует рибонуклеопротеин, который является группоспецифическим антигеном. Нуклеопротеин индуцирует образование комплементсвязывающих и преципитирующих антител, не обладающих вируснейтрализующей способностью и не оказывающих защиты против бешенства. Гликопротеин G липопротеиновой оболочки отвечает за адсорбцию, нейроинвазивность, нейровирулентность вируса и является протективным типоспецифическим антигеном, выявляемым в реакции нейтрализации.

Механизм передачи вируса - контактный. Заражение происходит при укусах или ослонении ран и неповрежденных слизистых оболочек. Возможны аэрогенный, алиментарный и посттрансплантационный механизмы заражения. Вирус бешенства проникает в рану, внедряется в поперечнополосатые мышцы, где происходит его первоначальная репликация. Далее вирус проникает в нервные окончания и вдоль нервных волокон медленно (3 мм/ч) движется в ЦНС (вирусемии нет). После репликации в нейронах мозга вирус по вегетативным нервным волокнам распространяется в обратном направлении и попадает в слюнные, слезные железы, роговицу, волосяные фолликулы, где он обнаруживается уже в конце инкубационного периода.

Инкубационный период составляет от 7 дней до 1 года (чаще 1-3 мес), его продолжительность зависит от локализации укусов, их глубины и обширности. Наиболее короткий инкубационный период при укусах в область головы, шеи, рук, промежности (больше нервных окончаний, ближе к ЦНС). При одиночных укусах в туловище и нижние конечности он более продолжительный.

Продромальный период (1-3 дня) характеризуется лихорадкой, появлением неприятных ощущений в области укуса, подавленностью настроения, чувством страха, тоски, повышением чувствительности к слуховым и зрительным раздражителям, чувством нехватки воздуха. Дальнейшее размножение вируса в ЦНС приводит к развитию агрессивности, галлюцинаций, буйства, судорог мышц глотки, гортани, диафрагмы, слюнотечению, дисфагии, гидро-, аэро-, фото- и акустофобий. На 3-7-е сутки заболевания наступает паралитическая фаза, заканчивающаяся смертью от паралича сосудодвигательного и дыхательного центров. Летальность составляет 100%.

Лабораторная диагностика в основном осуществляется посмертно. Посмертный диагноз бешенства может быть подтвержден с помощью нескольких методов (ОТ-ПЦР, РИФ, вирусологического исследования, гистологического исследования).

В лабораторию направляют трупы целиком или головы мелких животных, а от крупных - головы. Трупы животных, головы пересылают в двойных полиэтиленовых мешках, в металлических контейнерах или в другой влагонепроницаемой таре. При взятии и упаковке материала обязательно соблюдают меры предосторожности: работают в перчатках, защитных очках, тщательно моют руки с мылом. Отбор, упаковку и транспортирование секционного материала от людей, предположительно погибших от бешенства, осуществляет квалифицированный персонал, обученный правилам биологической безопасности и имеющий опыт патологоанатомического или судебно-медицинского исследования лиц, погибших от опасных и особо опасных инфекционных заболеваний. Во избежание заражения в процессе вскрытия необходимо соблюдать все меры предосторожности, включая тщательность препарирования и использование толстых резиновых перчаток.

Для исследования забирают следующие участки: аммонов рог, мозжечок, кору больших полушарий, слюнные железы. Размер секционного материала - 15x15 мм. Забор проводят стерильными инструментами. Каждый образец материала помещают в отдельные стерильные пластиковые флаконы (колбы, контейнеры), содержащие стерильный физиологический раствор, покрывающий взятый секционный материал, и подвергают глубокой заморозке (до -65 ± 5 °С или в жидком азоте) либо до температуры -20 ± 4 °С. В исключительном случае допускают помещение секционного материала вместе с глицерином в стерильные пластиковые флаконы (колбы, контейнеры) при температуре 6 ± 2 °С. Запрещено помещать и хранить секционный биологический материал в формалине, а также в парафиновых блоках.

Вирусологическое исследование. Биологическая проба основана на заражении исследуемым материалом лабораторных животных, главным образом белых мышей. Для биопробы отбирают молодых белых мышей массой 6-8 г. Заражают не менее 5-6 мышей. Суспензию исследуемого мозга в разведении 1:10 вводят в мозг в объеме 0,02 мл или внутримышечно в объеме 0,2-0,3 мл. Исследуемый материал можно вводить также в кончик носа или в переднюю лапку в объеме 0,05 мл. Инкубационный период заболевания при заражении в мозг составляет 8-14 дней и более. Заболевание протекает в основном в паралитической форме. Далее с помощью различных методов (гистологического исследования, ОТ-ПЦР, РИФ) исследуют биоптаты мозга погибшего животного. Биопроба - самый достоверный метод лабораторной диагностики бешенства. Возможно культивирование вируса на культуре клеток мышечной нейробластомы (Na C1300), фибробластов куриных эмбрионов, почки сайги, *Vero*, ВНК-21 и др. При использовании культуры клеток сокращается время, необходимое для постановки диагноза.

Метод иммунофлюоресценции (РИФ) - один из основных тестов при диагностике бешенства (99-100% совпадение с биопробой). Фиксацию препаратов проводят в течение 4 ч в охлажденном до 8 °С ацетоне. Используют прямой метод иммунофлюоресценции, который проводят с применением антирабического флюоресцирующего иммуноглобулина. Учитывают результаты визуально в люминесцентном микроскопе. Антиген вируса бешенства выявляют в виде ярких желто-зеленых или зеленых гранул различной формы и величины в клетках или вне их. Диагноз считают установленным, если в нескольких полях зрения обнаруживают не менее 10 типичных гранул или множество мельчайших точек.

Гистологический метод диагностики основан на обнаружении специфических эозинофильных включений телец Бабеша-Негри в мазках-отпечатках и гистологических срезах (исследуют аммонов рог, мозжечок, кору больших полушарий головного мозга; тельца также присутствуют в цитоплазме нейронов, гиппокампе, стволе мозга, гипоталамусе и спинномозговых ганглиях). Тельца Бабеша-Негри (рис. 21.1) состоят из тонковолокнистого матрикса и вирусного рибонуклеопротеида, их размер составляет около 10 нм. Для их обнаружения мазки-отпечатки мозга (аммонов рог) окрашивают по Селлерсу, Муромцеву или другими методами. После окрашивания препараты просматривают в световом микроскопе с иммерсионной системой. Положительным результатом считают наличие при окраске по Селлерсу четко очерченных овальных или продолговатых гранулярных образований розово-красного цвета, при окраске по Муромцеву - светло-фиолетовых с темно-синими включениями телец, которые располагаются в протоплазме или вне нервных клеток. У 15-20% умерших от бешенства тельца Бабеша-Негри обнаружить не удается.

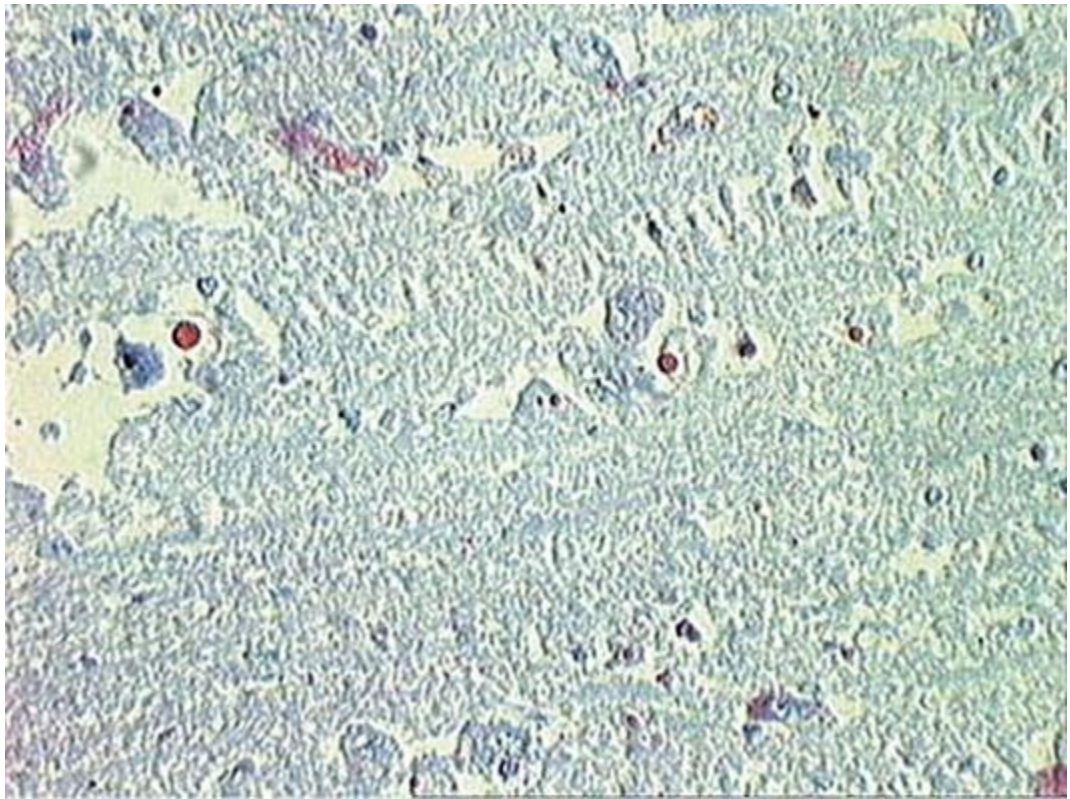


Рис. 21.1. Тельца Бабеша-Негри

Прижизненная диагностика. Прижизненная диагностика затруднена. Возможно обнаружение вирусной РНК в слюне, спинномозговой жидкости или тканях с помощью ОТ-ПЦР. С помощью РИФ исследуют отпечатки роговицы, биоптаты кожи, взятые из заушной области, волосяные фолликулы кожного биоптата из области шеи выше линии роста. Вирус выделяют из слюны, спинномозговой и слезной жидкостей путем внутримозгового заражения мышей-сосунков. РИФ и вирусологическое исследование при затяжном течении болезни могут давать ложноотрицательные результаты из-за высокого титра нейтрализующих антител в крови и спинномозговой жидкости. Возможно определение антител у больных в сыворотке крови и спинномозговой жидкости с помощью ИФА, РН, непрямой РИФ, РНГА, РСК. У невакцинированных больных диагноз бешенства подтверждает четырехкратное повышение титра нейтрализующих антител при исследовании парных сывороток. У вакцинированных больных при постановке диагноза опираются на абсолютный уровень нейтрализующих антител в сыворотке, а также на присутствие этих антител в СМЖ. После вакцинации нейтрализующие антитела в спинномозговой жидкости обычно не появляются либо их титр низок (менее 1:64), в то время как при бешенстве титр нейтрализующих антител в СМЖ составляет 1:200-1:160 000.

Вопросы для самоконтроля

1. Обнаружение телец Бабеша-Негри проводят при диагностике ...
2. Обнаружение вируса клещевого энцефалита в культуре клеток проводят:
 - а) по обнаружению телец Гварниери;
 - б) цитопатическому действию;
 - в) образованию бляшек;
 - г) с использованием РИФ.

Составьте пары «вопрос-ответ».

3. РТГА	А. Диагностика бешенства
4. Внутримозговое заражение мышей	Б. Диагностика клещевого энцефалита
5. Кровь в качестве материала для исследования	В. Оба
	Г. Ни тот ни другой

ПРОПИСИ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

- **Мясная вода.** 1 кг мясного фарша заливают 2 л воды и кипятят в течение 1 ч. Снимают накипь, остужают и фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Доводят до первоначального объема водой, стерилизуют при 1 атм 20 мин.

- **Пептонная вода.** 1-2 г пептона и 0,5 г натрия хлорида растворяют в 1 л воды. Доводят рН до 7,2, фильтруют через бумажный фильтр, стерилизуют при 1 атм 30 мин.

- **Мясо-пептонный бульон (МПБ).** К 1 л мясной воды добавляют 1 г сухого пептона, 5 мг хлорида натрия, кипятят 30 мин, доводят водой до первоначального объема, устанавливают едким натрием рН до 7,2, стерилизуют при 1 атм 20 мин.

- **Мясо-пептонный агар (МПА).** К 1 л мясной воды добавляют 1 г пептона, 0,5 г натрия хлорида, доводят рН до 7,2-7,4, добавляют до 2% агара (в зависимости от качества агара). Кипятят до полного растворения агара, фильтруют, стерилизуют при температуре 120 °С 20 мин.

- **Хоттингера перевар.** Продукт переваривания мяса с помощью панкреатина или ткани поджелудочной железы. Характеризуется высоким содержанием пептидов, аминокислот, высокой буферной емкостью. Используют при приготовлении агара и бульона Хоттингера.

- **Хоттингера бульон.** Перевар Хоттингера разводят несколько раз дистиллированной водой, на 1 л бульона добавляют 0,5 г натрия хлорида, 1 мг фосфата калия двузамещенного, устанавливают рН до 7,4-7,6, кипятят 15-20 мин, фильтруют через бумажный фильтр, стерилизуют при 1 атм 20 мин.

- **Тиогликолевая среда (среда для контроля стерильности - СКС).** В состав среды входят гидролизат казеина, экстракт кормовых дрожжей, натрия тиогликолят (уменьшающий окислительно-восстановительный потенциал), натрия хлорид, глюкоза, гидрохлорид цистеина, углекислый натрий, агар микробиологический. Выпускают в виде порошка с инструкцией по применению.

- **Сахарно-кровяной агар для анаэробов.** К 1 л растопленного МПА добавляют 1 г глюкозы, разливают по флаконам по 100 мл, стерилизуют при 0,5 атм 30 мин. К 100 мл расплавленной среды добавляют 20 мл свежей дефибринированной крови.

- **Вильсона-Блера среда.** К 100 мл 3% питательного агара добавляют 5 мл 20% раствора глюкозы, 10 мл 20% раствора безводного сульфита натрия, 1 мл 8% раствора кристаллического железосульфата.

- **Лакмусовое молоко.** К 1000 мл свежеснятого молока добавляют 20 мл 1% водного раствора лакмуса.

- **Китта-Тароцци среда.** Печень животного нарезают на мелкие кусочки по 1-1,5 г, добавляют бульон Хоттингера в тройном объеме и кипятят 30 мин. Бульон отфильтровывают, печень промывают, бульон разливают в пробирки по 7-10 мл. В каждую пробирку кладут по 4 кусочка печени, сверху заливают слоем вазелинового масла и стерилизуют автоклавированием при 0,5 атм 30 мин.

- Среда Эндо. МПА растапливают и охлаждают до температуры 70 °С, прибавляют 1 г лактозы, предварительно растворенной в стерильной пробирке в воде и прокипяченной. В отдельной пробирке приготавливают 2-3 мл спиртового насыщенного раствора основного фуксина. В отдельную пробирку наливают 1 мл фуксина, прибавляют раствор сульфита натрия до обесцвечивания фуксина. Подготовленную смесь вливают в растопленный агар, перемешивают и разливают по чашкам. Среду готовят в день использования. Среду выпускают также в сухом виде с прилагаемой инструкцией по применению.

- Гектоен агар (среда для выделения шигелл и сальмонелл). Содержит пептон, дрожжевой экстракт, лактозу, сахарозу, салицин, смесь желчных солей, натрия хлорид, натрия тиосульфат, цитрат аммонийного железа, кислый фуксин, бромтимоловый синий, агар. Выпускают в сухом виде с инструкцией по применению. Расщепляющие лактозу бактерии образуют оранжевые колонии, лактозонегативные - зелено-голубые.

- Питательная среда № 10. Предназначена для выделения и идентификации стафилококков. В ее состав входят питательный агар, 7,2% натрия хлорид, 1% маннит и индикатор феноловый красный. Присутствие 7,2% натрия хлорида делает среду селективной, поэтому энтеробактерии и псевдомонады на ней не растут.

- Среда Сабуро. Предназначена для культивирования, выделения и идентификации грибов. В состав входят пептон - 10 г/л, глюкоза - 40 г/л, агар-агар - 15 г/л.

- Среда Чапека. Элективный агар для культивирования грибов. В состав (в расчете на 1 л) входят сахароза - 30 г, нитрат натрия - 3 г, сульфат магния - 0,5 г, калия хлорид - 0,5 г, сульфат железа - 0,01 г, двузамещенный фосфат калия - 0,05 г, агар - 13 г.

- Тиогликолевый буфер. Содержит K_2HPO_4 - 4,5 г; Na_2HPO_3 - 6 г; агар - 1 г; тиогликолевую кислоту - 0,4 мо; воду - до 1 л. Стерилизуют при 0,5 атм 30 мин.

- Среда Блаурокка. Состав: пептон - 10 г; натрия хлорид - 5 г; лактоза - 10 г; агар - 20 г; цистин - 100 мг; печеночный отвар - 1 л.

- Среда МРС. Состав: $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 0,05 г; цитрат аммония - 2 г; пептон - 10 г; сорбиновая кислота - 40 мг; глюкоза - 20 г; печеночный экстракт - 100 мл; дрожжевой аутолизат - 50 мл; гидролизат молока - 500 мл; $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 0,2 г; ацетат натрия - 5 г; цистин - 0,2 г; агар - 20 г; твин-80 - 1 мл; вода - до 1 л. Сорбиновую кислоту растворяют в спирте, добавляют после стерилизации при 0,5 атм в течение 30 мин; $\text{pH}=5,0$ устанавливают 10% раствором лимонной кислоты.

- Бульон *Preston*. Состав: мясной экстракт - 10 г; пептон - 10 г; натрия хлорид - 5 г; пируват натрия - 0,25 г; метабисульфат натрия - 0,25 г; сульфат железа - 0,25 г; полимиксин В - 5000 ЕД; триметоприм - 10 мг; рифампицин - 10 мг; амфотерицин В - 100 мг; лизированная лошадиная кровь - 50 мл; вода - 1000 мл.

- CCD-агар (элективный бескровяной агар для кампилобактера). Состав: мясной экстракт - 10 г; натрия хлорид - 5 г; уголь - 4 г; гидролизат казеина - 3 г; дезоксихолат натрия - 1 г; сульфат железа - 0,25 г; пируват натрия - 0,25 г; агар - 8-18 г; вода - 1000 мл; цефоперазон - 32 мг; амфотерицин В - 10 мг.

- Висмут-сульфитный агар. Высокоэлективная среда в отношении сальмонелл. Содержит бриллиантовый зеленый и висмут-сульфит, которые подавляют рост грамположительных микроорганизмов и многих энтеробактерий, в том числе шигелл. Дифференцирующее действие среды основано на том, что образуемый бактериями из тиосульфата натрия сероводород вызывает почернение вследствие образования сульфита натрия, поэтому бактерии, продуцирующие сероводород, образуют колонии черного цвета.

- BGA агар-агар с бриллиантовым зеленым. Высокоэлективная среда в отношении сальмонелл. В состав входят бриллиантовый зеленый, индикатор фенол красный, лактоза и сахароза. Селективная субстанция - бриллиантовый зеленый, подавляющий рост грамположительной микрофлоры и некоторых энтеробактерий. Фенол красный меняет цвет с желтого на красный при $pH=6,8-8,4$, поэтому колонии бактерий, не сбраживающих лактозу и сахарозу, имеют розово-красный цвет. Лактозо- и сахарозоположительные бактерии формируют колонии желтого или желто-зеленого цвета.

- Раппопорта-Вассилиадиса среда. Эта среда, так же как и агар с бриллиантовым зеленым, рекомендована в настоящее время ВОЗ для выделения сальмонелл. Среда используют для селективного обогащения образцов при выделении сальмонелл из фекалий, пищи, объектов окружающей среды. Малахитовый зеленый, входящий в состав среды, - селективный агент. Раствор магния хлорида в конечной концентрации 4% создает повышенное осмотическое давление, которое приемлемо для сальмонелл и неприемлемо для других бактерий. Среда не может быть использована для выделения *S. typhi*.

- Мюллера-Хинтона агар. Используют для определения чувствительности бактерий к антибиотикам. Содержит крахмал - 1,5 г/л; МПА - 2 г/л; гидролизат казеина - 17,7 г/л; агар - 17 г/л.

- Левенштейна-Йенсена среда (среда для культивирования микобактерий). Состоит из солевой основы в виде порошка промышленного производства (аспарагина - 3,6 г/л; калия дегидрофосфата - 2,4 г/л; магния сульфата - 0,24 г/л; магния цитрата - 0,6 г/л; картофельной муки - 30 г/л; малахитового зеленого - 37 г/л). Порошок в количестве 24 г растворяют в 600 мл воды, содержащей 12 мл глицерина, и стерилизуют при 1 атм 15 мин, добавляют 1000 мл эмульсии яиц, разливают в пробирки, прогревают в скошенном виде при температуре 85 °С в течение 45 мин.

- Борде-Жангу среда (для выделения возбудителя коклюша). Содержит картофельный настой, пептический перевар органов животных, натрия хлорид, агар, стерильную дефибринированную кровь.

- Клауберга среда (для выделения возбудителя дифтерии). К 100 мл расплавленного МПА добавляют 3 мл теллурида калия, 10 мл глицериновой смеси (40 мл крови крупного рогатого скота + 30 мл глицерина), 54 мл лаковой крови (34 мл воды + 16 мл крови). Перед применением выдерживают в холодильнике 3-6 нед.

- Шоколадный агар. К растопленному горячему 2% питательному агару, содержащему 0,5% глюкозу, доведенному до $pH=7,4$, добавляют дефибринированную кровь. Нагревают, не доводя до кипения. Перед разливом в чашки к агару для подавления роста посторонней микрофлоры добавляют водный раствор генцианового фиолетового в концентрации 1:50 000 и антибиотики.

ОТВЕТЫ НА ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

Модуль 1

1 - 1-я группа; 2 - нельзя; 3 - желтый; 4 - обеззараживанию.

Модуль 2

1 - простых; 2 - Циля-Нельсена; 3 - клеточной стенки; 4 - капсулы; 5 - спор; 6 - нативных; 7 - В; 8 - Г; 9 - А; 10 - Б.

Модуль 3

1 - 5% CO₂; 2 - 37 °С; 3 - выделения анаэробов; 4 - выделения определенного вида бактерий; 5 - дифференциально-диагностических сред и тест-систем; 6 - серийных разведений.

Модуль 4

1 - эпидемического маркирования бактерий; 2 - постановку исследования плазмидного профиля с реперной плазмидой; 3 - Б; 4 - А; 5 - В.

Модуль 5

1 - Б; 2 - В; 3 - А; 4 - Г.

Модуль 6

1 - загрязнения объектов окружающей среды выделениями человека и животных; 2 - микробного числа; 3 - определения микробного числа воздуха; 4 - лактобактерии; 5 - вагиноза; 6 - исследование микрофлоры кишечника.

Модуль 7

1 - Е-тест; 2 - диаметру зоны ингибиции роста; 3 - наличия бактерий группы кишечной палочки; 4 - уничтожения бесспорных форм микроорганизмов; 5 - стерилизацию текучим паром.

Модуль 8

1 - продромальный; 2 - летальных дозах; 3 - наличия эндотоксина; 4 - гемолитические свойства бактерий.

Модуль 9

1 - Г; 2 - А; 3 - Б; 4 - В; 5 - З; 6 - Д; 7 - Е; 8 - Ж; 9 - положительный; 10 - зонтика.

Модуль 10

1 - культуральный; 2 - молекулярно-биологический; 3 - серологический; 4 - микроскопический метод.

Модуль 11

1 - бактериологический; 2 - способности расщеплять лактозу; 3 - жидкую питательную среду накопления; 4 - антигенной структуре; 5 - реакции агглютинации с поливалентной ОК-сывороткой; 6 - иерсиний; 7 - реакция микроагглютинации; 8 - токсина; 9 - условий с пониженной концентрацией кислорода.

Модуль 12

1 - Б; 2 - В; 3 - А; 4 - Г; 5 - серологический; 6 - определения напряженности антитоксического иммунитета; 7 - определения инфицированности микобактериями и развития ГЗТ; 8 - серийно развести.

Модуль 13

1 - Г; 2 - Б; 3 - А; 4 - В; 5 - тест на плазмокоагулазу; 6 - тест на оксидазу; 7 - клостридиальных инфекций.

Модуль 14

1 - Б; 2 - Г; 3 - А; 4 - В; 5 - реакции Кумбса; 6 - кожно-аллергической пробы; 7 - дифференциация возбудителя сибирской язвы от сапрофитных бацилл; 8 - возбудителя чумы.

Модуль 15

1 - 10^5 ; 2 - кардиолипидный; 3 - бактериоскопический метод; 4 - *C. trachomatis*; 5 - *M. genitalium*, *U. urealyticum*.

Модуль 16

1 - серологический; 2 - РСК; 3 - сыпного тифа и болезни Брилля; 4 - дифференциации эпидемического и эндемического возвратных тифов; 5 - серологический.

Модуль 17

1 - В; 2 - А; 3 - Г - острая инфекция, заражение до 3 мес назад; беременным необходимо провести исследование ПЦР.

Модуль 18

1 - выделение и характеристика полиовируса из клинических проб; 2 - ОТ-ПЦР в реальном времени; 3 - нейтрализация инфекционности в культуре клеток против трех типов штаммов Сэбина.

Модуль 19

1 - серологическим методом; 2 - ОТ-ПЦР; 3 - иммуноблотт; 4 - пациент ВИЧ-инфицирован.

Модуль 20

1 - НВs-АГ; 2 - НВе-АГ; 3 - остром периоде болезни; 4 - ОТ-ПЦР; 5 - антитела к неструктурным белкам; 6 - иммуноглобулинов класса М.

Модуль 21

1 - бешенства; 2 - б; г; 3 - Б; 4 - В; 5 - Б.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии / Под ред. Быкова А.С., Воробьева А.А., Зверева В.В. - М.: МИА, 2008. Брюханов А.Л., Рыбак К.В., Нетрусов А.И. Молекулярная микробиология: Учебник для вузов. - М.: Изд-во МГУ, 2012.
2. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: Учебник для вузов / Под ред. Зверева В.В., Бойченко М.Н. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011.
3. Организация и проведение вирусологических исследований материалов от больных полиомиелитом, с подозрением на это заболевание, с синдромом острого вялого паралича (ОВП) // Методические указания МУК 4.2.2410-08.
4. Руководство по лабораторным исследованиям полиомиелита ВОЗ. - 4-е изд. - Женева, 2005.