

ВЫСШЕЕ ОБРАЗОВАНИЕ

А. А. ВОРОБЬЁВ, Ю. С. КРИВОШЕИН, В. П. ШИРОБОКОВ

МЕДИЦИНСКАЯ И САНИТАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Рекомендовано

Учебно-методическим объединением по медицинскому и фармацевтическому образованию вузов России в качестве учебного пособия по микробиологии, вирусологии, иммунологии для студентов медицинских вузов

Москва

2003

УДК 579.61/.63
ББК 52.64я73
В751

Рецензенты

д-р мед наук, профессор кафедры эпидемиологии ММА им И М Сеченова
Н И Брико,
д-р мед наук, профессор кафедры микробиологии МГМСУ им Н А Семашко
В. Н Царев

Воробьев А. А.

В751 Медицинская и санитарная микробиология: Учеб. пособие для студ. высш. мед. учеб. заведений / А. А. Воробьев, Ю. С. Кривошеин, В. П. Ширококов. — М.: Издательский центр «Академия», 2003. — 464 с., [16] л. цв. ил.

ISBN 5-7695-1292-X

Изложены современные методы лабораторной диагностики бактериальных инфекций, а также заболеваний, вызываемых вирусами, грибами, простейшими и гельминтами, распространенных в нашей стране и за рубежом. Приведены методы антимикробных воздействий и санитарно-микробиологического обследования объектов, актуальных в плане возникновения и распространения инфекций.

Дана характеристика общепринятых и новейших микроскопических, культуральных, серологических, аллергологических, биологических и других методов исследования, анализируется их применение при диагностике инфекций.

Для студентов высших медицинских учебных заведений

УДК 579.61/.63
ББК 52 64я73

© Воробьев А. А., Кривошеин Ю. С., Ширококов В. П., 2003
© Издательство «Мастерство», 2003

ISBN 5-7695-1292-X

© Оформление Издательский центр «Академия», 2003

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АГ — антиген
АТ — антитело (иммуноглобулин)
БГКП — бактерии группы кишечной палочки
ВБИ — внутрибольничные инфекции
Гр- — грамотрицательные
Гр+ — грамположительные
ИФ — иммунофлюоресценция
ИФА — иммуноферментный анализ
ИХН — изотонический раствор хлорида натрия
ИЭМ — иммунная электронная микроскопия
КОЕ — колониеобразующие единицы
ЛПУ — лечебно-профилактическое учреждение
МИК — минимальная ингибирующая концентрация
МПА — мясо-пептонный агар
МПБ — мясо-пептонный бульон
НК — нуклеиновые кислоты
ОМЧ — общее микробное число
ОРВИ — острые респираторные вирусные инфекции
ПАВ — поверхностно-активные вещества
ПЦР — полимеразная цепная реакция
РА — реакция агглютинации
РБТ — реакция бласттрансформации лимфоцитов
РВИЭФ — реакция встречного иммуноэлектрофореза
РГА — реакция гемагглютинации
РГадс — реакция гемадсорбции
РГадсТО — реакция гемадсорбции на твердой основе
РИА — радиоиммуноанализ
РИФ — реакция иммунофлюоресценции
РИЭФ — реакция иммуноэлектрофореза
РН — реакция нейтрализации
РНГА — реакция непрямой гемагглютинации
РОНГА — реакция обратной непрямой гемагглютинации
РП — реакция преципитации
РПП — реакция преципитации в геле

- РПНГ — реакция повреждения нейтрофильных гранулоцитов
- РРГ — реакция радиального гемолиза
- РСК — реакция связывания комплемента
- РТГадс — реакция торможения гемадсорбции
- РТМЛ — реакция торможения миграции лейкоцитов
- РТНГА — реакция торможения непрямой гемагглютинации
- РТОНГА — реакция торможения обратной непрямой гемагглютинации
- СПМ — санитарно-показательные микроорганизмы
- УПМ — условно-патогенные микроорганизмы
- ХАО — хорион-аллантаисная оболочка куриного эмбриона
- ЦПД — цитопатическое действие вируса
- ЭМ — электронная микроскопия

ОТ АВТОРОВ

Микробиология — интегральная дисциплина, объединяющая ряд самостоятельных предметов, тесно связанных между собой, — бактериологию, вирусологию, микологию, протозоологию и иммунологию, поэтому их изучение рационально проводить комплексно (в едином алгоритме).

Знание лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных заболеваний, встречающихся у нас в стране и за рубежом, необходимо врачу любой специальности для осуществления правильных и своевременных лечебных и профилактических мероприятий.

В вышедших за последние годы учебниках и учебных пособиях по инфекционной патологии для студентов медицинских вузов основное внимание уделяется вопросам этиологии, патогенеза, профилактики и лечения, тогда как лабораторная диагностика представлена кратко, схематично, недостаточно отражены экспресс-методы исследования.

В данном пособии детально представлены этапы лабораторной диагностики бактериальных, вирусных инфекций, протозоозов, микозов и гельминтозов, а также методы санитарно-микробиологических исследований различных объектов внешней среды. Описаны современные методы исследования, основанные: на морфологических признаках возбудителя, его культуральных и других физиологических свойствах; особенностях взаимодействия с организмом экспериментальных животных в модельных опытах; антигенном строении возбудителя и реакциях макроорганизма на эти антигены (идентификация микроорганизмов или индикация их антигенов, серологическая и аллергологическая диагностика инфекционного заболевания); определении генома возбудителя в исследуемом материале или геноидентификации.

Большое внимание уделено экспресс-диагностике инфекционных болезней и новейшим методам иммуно- и генодиагностики, которые начинают широко применяться в лабораторной практике. Среди них иммуноферментный анализ, иммуноэлектронная микроскопия, реакция иммунофлюоресценции, радиоиммуноло-

гический метод, реакция обратной непрямой гемагглютинации, иммуноферритиновая, иммуноблотинг, гибридизация и секвенирование нуклеиновых кислот и др.

Все названия микроорганизмов приведены в соответствии с 9-м изданием «Определителя бактерий» Берджи и более поздними изменениями официальной номенклатуры микроорганизмов.

Большую помощь в подготовке рукописи к изданию оказали ведущие преподаватели кафедр микробиологии, вирусологии, иммунологии, инфекционных болезней медицинских вузов Москвы, Симферополя, Киева, Рязани: Ю. Н. Ачкасова, М. А. Борисова, Е. В. Буданова, А. Г. Букринская, А. С. Быков, В. Г. Войцеховский, Н. В. Давыдова, В. Я. Кицак, О. Н. Корнюшенко, Ю. Л. Криворученко, К. И. Липатникова, А. Ю. Миронов, Ю. В. Несвижский, Д. Н. Нечаев, Е. П. Пашков, К. Д. Пяткин, А. М. Рыбакова, О. В. Салата, Т. А. Сарачан, И. В. Смирнов, Т. Н. Тарасов, Л. В. Тышкевич, Г. Н. Усатова, А. А. Фурман, А. Б. Хайтович, М. В. Шилов, А. И. Якименко.

Мы понимаем, что книга не лишена недостатков, и будем благодарны и признательны читателям за критические замечания, отзывы и пожелания, высказанные в наш адрес.

Академик РАН и РАМТН, профессор А. А. Воробьев

Академик РАМТН, профессор Ю. С. Кривошеин

Академик РАМТН и НАНУ, профессор В. П. Широбоков

РАЗДЕЛ I

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ИНФЕКЦИИ

ГЛАВА I

МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

Для микробиологической диагностики бактериальных инфекций используют различные методы:

бактериоскопические, основанные на изучении морфологических признаков возбудителя; они направлены на обнаружение микроорганизмов в нативных или окрашенных препаратах;

бактериологические, основанные на изучении культуральных и других физиологических свойств возбудителя; они предполагают культивирование, выделение чистых культур, идентификацию и типирования возбудителей;

биологические, основанные на изучении особенностей взаимодействия микроба с организмом экспериментальными животными в модельных опытах;

серологические, основанные на изучении антигенных свойств возбудителя и реакций макроорганизма на эти антигены (серологическая и аллергологическая диагностика инфекционного заболевания; антигенная идентификация микроорганизмов или их компонентов);

молекулярно-генетические — обнаружение фрагментов генома возбудителя в биологическом материале при помощи молекулярной гибридизации ДНК или РНК, а также ПЦР.

При инфекционном заболевании часто один из этих методов является основным, а другие — вспомогательными. Материалом для проведения микробиологической диагностики могут быть кровь, кал, моча, желчь, кусочки пораженных тканей и др. Далее будут приведены основные микробиологические методы лабораторной диагностики бактериальной инфекции.

1.1. Бактериоскопическое исследование

1.1.1. Методы микроскопического исследования

Метод бактериоскопического исследования приобретает особое значение, если микроб имеет морфологические и тинкториальные особенности или особую локализацию в тканях, клетках

организма. Только при некоторых инфекциях для постановки диагноза достаточно морфологического исследования. Для диагностики большинства инфекций микроскопия, как первый этап микробиологического исследования, имеет лишь вспомогательное, ориентировочное значение. Разрешающая способность метода составляет в среднем 100 000 клеток в 1 мл.

В микробиологических лабораториях применяются не только обычные методы оптической микроскопии в проходящем свете, но и специальные: в темном поле зрения, фазово-контрастный, люминесцентный и электронный.

Световая микроскопия. Световой микроскоп имеет сухой и иммерсионный объективы. Сухой объектив с относительно большим фокусным расстоянием и слабым увеличением обычно применяют для изучения относительно крупных биологических и гистологических объектов. При изучении микроорганизмов используют главным образом иммерсионный («погружной») объектив с небольшим фокусным расстоянием и более высокой разрешающей способностью (увеличение $60\times$ — $100\times$). При иммерсионной микроскопии объектив погружают в масло (кедровое, персиковое, «иммерсиол» и др.), показатель преломления которого близок к показателю преломления стекла. В этом случае лучи света, пройдя через предметное стекло, не меняют своего направления и не рассеиваются, а попадают в объектив (рис. 1.1, а). Разрешающая способность иммерсионного объектива около $0,2\text{ мкм}$. Максимальное увеличение современных оптических микроскопов достигает $2000\times$ — $3000\times$.

Микроскопия в темном поле зрения. Этот вариант микроскопии проводится с использованием специального приспособления темного поля (микроскоп с таким устройством еще называют ультрамикроскопом). При боковом освещении в темном поле зрения наблюдают живые объекты величиной $0,02$ — $0,06\text{ мкм}$. Чтобы получить яркое боковое освещение, обычный конденсор заменяют на параболоид-конденсор, в котором центральная часть линз непрозрачна, а боковая поверхность конденсора зеркальная. Такой конденсор задерживает центральные лучи, образуя темное поле

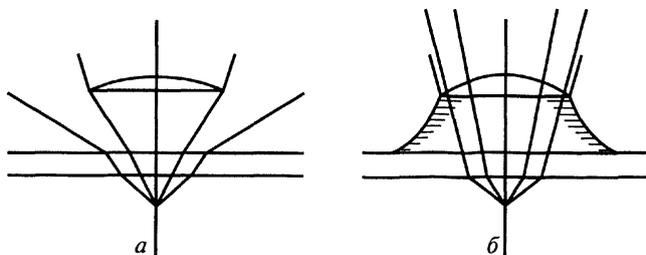


Рис. 1.1. Ход лучей в сухой (а) и иммерсионной (б) системах

зрения. Краевые лучи проходят через кольцевую щель, попадают на боковую зеркальную поверхность конденсора, отражаются от нее и концентрируются в фокусе. Встречая на своем пути клетки микроорганизмов или другие оптически плотные частицы, луч света отражается от них и попадает в объектив. Клетки микроорганизмов и другие объекты в этом случае ярко светятся на темном фоне.

Источником искусственного света служит электрический осветитель. Для бокового освещения необходим параллельный пучок света, который получают с помощью плоского зеркала микроскопа.

При микроскопии материала в темном поле зрения обычно используют объектив сухой системы (40×). Небольшую каплю изучаемого материала помещают на предметное стекло и накрывают покровным стеклом, не допуская образования пузырьков воздуха. На верхнюю линзу конденсора наносят каплю иммерсионного масла, которое должно заполнить пространство между конденсором и предметным стеклом.

Темнопольная микроскопия применяется для обнаружения неокрашенных (нативных) препаратов возбудителей сифилиса, возвратного тифа, лептоспироза и других болезней, а также для изучения подвижности микроорганизмов. Однако исследование в темном поле зрения не позволяет хорошо изучить их форму и тем более внутреннее строение. Для этой цели используют специальные методы световой микроскопии.

Фазово-контрастная микроскопия. Известно, что оптическая длина пути света в любом веществе зависит от показателя преломления. Световые волны, проходящие через оптически более плотные участки объекта, отстают по фазе от волн, не проходящих через эти участки. При этом интенсивность света не меняется, а изменяется только фаза колебания, не улавливаемая глазом и фотопластинкой. Для повышения контрастности изображения в объектив микроскопа вкладывают специальную полупрозрачную фазовую пластинку, в результате чего между лучами фона и объекта возникает разность амплитуд световых волн. Если она достигает $\frac{1}{4}$ длины волны, то возникает заметный для глаза эффект, когда темный объект отчетливо виден на светлом фоне (положительный контраст), или наоборот (отрицательный контраст), в зависимости от структуры фазовой пластинки.

Фазово-контрастная микроскопия не увеличивает разрешающей способности оптической системы, но помогает выявить новые детали структуры живых микроорганизмов, изучить различные стадии их развития, влияние на них химических веществ, антибиотиков и других факторов.

Люминесцентная микроскопия. Люминесценция (или флюоресценция) — это способность некоторых объектов и красителей при

попадании на них ультрафиолетовых или других коротковолновых лучей света испускать лучи видимой части спектра (зеленые, желтые, оранжевые).

Различают собственную (первичную) и наведенную (вторичную) флюоресценцию. При первичной флюоресценции исследуемый объект содержит вещества (витамины, пигменты и другие продукты обмена), способные флюоресцировать при освещении их ультрафиолетовыми лучами. Большая часть объектов микроскопии не обладает собственной флюоресценцией, поэтому при люминесцентной микроскопии их обрабатывают красителями (флюорохромами), способными флюоресцировать. В качестве флюорохромов используют аурамин (для микобактерий туберкулеза), акридиновый желтый (для гонококков), корифосфин (для коринебактерий дифтерии), флюоресцеинизотиоцианат, или ФИТЦ (для изготовления меченых антисывороток) и др.

Препарат для люминесцентной микроскопии готовят обычным способом, фиксируют 5—10 мин в ацетоне или этаноле и наносят на него флюорохром на 20—30 мин. После этого препарат промывают проточной водой 15—20 мин, накрывают покровным стеклом и микроскопируют.

Люминесцентные микроскопы представляют собой обычные биологические микроскопы, снабженные ярким источником света (как правило, ртутно-кварцевые лампы, излучающие ультрафиолет и сине-фиолетовые лучи, возбуждающие люминесценцию) и набором светофильтров, предназначенных для выделения из общего светового потока строго определенных участков спектра. Флюорохромы, связываясь с НК или белками, образуют стойкие комплексы, которые светятся в люминесцентном микроскопе желто-зеленым, оранжево-красным, коричнево-красным цветами.

Преимущества люминесцентной микроскопии по сравнению с обычными методами микроскопии следующие: цветное изображение; значительная контрастность; возможность исследования как живых, так и погибших микроорганизмов, прозрачных и непрозрачных объектов, обнаружение отдельных бактерий, вирусов и их АГ, установление их локализации; дифференцирование отдельных компонентов клетки.

Электронная микроскопия. В электронном микроскопе вместо света используется поток электронов в безвоздушной среде, на пути которых находится анод. Источником электронов является электронная пушка (вольфрамовая проволока, разогреваемая до 2500—2900 °С). Роль оптических линз играют электромагниты. Между вольфрамовой нитью и анодом создается электрическое поле с напряжением 30 000—50 000 В, что сообщает электронам большую скорость, и они, проходя через отверстие анода, попадают в первую электромагнитную линзу (конденсор). Электронные лучи при выходе из конденсора собираются в плоскости исследуемого

объекта, отклоняются под разными углами за счет различной толщины и плотности препарата и попадают в электромагнитную линзу объектива, снабженного диафрагмой. Электроны, мало отклонившиеся при встрече с объектом, проходят через диафрагму, а отклонившиеся под большим углом задерживаются, благодаря чему обеспечивается контрастность изображения. Линза объектива дает промежуточное увеличенное изображение, которое рассматривают через смотровое окно. Проекционная линза позволяет увеличивать изображение во много раз. Это изображение попадает на флуоресцирующий экран и может фотографироваться. Новейшие электронные микроскопы дают возможность видеть частицы величиной 0,2—2,0 нм (в зависимости от типа объекта).

Электронную микроскопию широко используют в микробиологии для детального изучения строения микроорганизмов, а в вирусологии также и с диагностической целью (см. подразд. 3.1.4).

Для исследования препаратов в электронном микроскопе вместо предметных стекол применяются специальные пленки, незначительно поглощающие электроны. Они крепятся на опорные сетки. Материалом для приготовления пленок служат коллоиды, окись алюминия и кварц. Тщательно очищенный от различных примесей и нанесенный на пленку исследуемый материал после испарения жидкости оставляет на ней тончайший слой, который и подлежит микроскопии. В электронном микроскопе можно также исследовать срезы тканей, клеток, микроорганизмов, полученные с помощью ультрамикротомов. Препараты контрастируют с помощью электронно-плотных (задерживающих электроны) веществ, используя разные методы: напыление тяжелых металлов, обработка фосфорно-вольфрамовой кислотой, уранилацетатом, солями осмиевой кислоты и др.

1.1.2. Приготовление и окраска препаратов-мазков для световой микроскопии

Приготовление мазков, их окраску и другие микробиологические манипуляции осуществляют на заранее подготовленном рабочем месте. На столе должны находиться только материалы и предметы, необходимые для данного исследования, а именно: изучаемый объект (кровь, гной, мокрота, кал и др.), пробирки или чашки с культурой микроорганизмов, стерильная водопроводная вода или ИХН, штатив для бактериологической петли, банки с чистыми обезжиренными предметными стеклами и карандашами по стеклу. Помимо этого, необходимы газовая горелка или спиртовка, растворы красителей, ванночка с подставкой (мостик) для стекол, промыватель с водой, пинцет, фильтровальная бумага, банка с дезинфицирующим раствором, используемым для обезвреживания отработанных препаратов и пипеток.

Методы обработки стекол. Новые стекла кипятят в 1%-м растворе гидрокарбоната натрия, промывают водой, помещают в слабый раствор соляной кислоты, после чего снова промывают водой. Стекла, бывшие в употреблении, помещают в концентрированную (техническую) серную кислоту на 2 ч или в смесь серной кислоты, бихромата калия и воды (100 : 50 : 1000), тщательно промывают водой, кипятят в растворе гидрокарбоната или гидроксида натрия, затем снова промывают водой, вытирают обезжиренной льняной ветошью и хранят в спирте или в смеси спирта с эфиром в банках с притертыми пробками. Для мытья стекол применяют также стиральные порошки. Для обезжиривания стекла натирают сухим кусочком мыла и протирают чистой марлей. При изготовлении мазков стекла заранее извлекают пинцетом из раствора, в котором они хранились, и насухо вытирают. Держат их пальцами за края. Капля, нанесенная на правильно подготовленное стекло, равномерно растекается и не принимает шаровидную форму.

Приготовление препарата-мазка. Перед приготовлением препарата предметные стекла обжигают в пламени горелки для их дополнительного обезжиривания.

Для приготовления *мазка из культуры бактерий, выращенной на плотной среде*, на охлажденное стекло наносят каплю ИХН или воды. Пробирку с культурой берут большим и указательным пальцами левой руки. Петлю стерилизуют в пламени горелки. Ватную пробку зажимают мизинцем правой руки, извлекают ее из пробирки и оставляют в таком положении. Края пробирки фламбируют, обжигая их в пламени горелки, а затем в пробирку через пламя вводят петлю. Остудив петлю о внутреннюю стенку пробирки, прикасаются ею к питательной среде на границе стекла (если петля недостаточно охлаждена, то она вызывает треск и расплавляет среду).

Охлажденной петлей прикасаются к культуре микроорганизмов на поверхности среды. Затем петлю извлекают, быстро обжигают края пробирки, закрывают ее пробкой, проведенной через пламя, и ставят пробирку в штатив. Все описанные действия производят только вблизи пламени горелки. Культуру вносят петлей в каплю воды или ИХН на стекле и распределяют равномерно круговыми движениями на площади диаметром 1,0—1,5 см, затем петлю обжигают.

Для приготовления *мазка из культуры бактерий, выращенной в жидкой питательной среде*, на середину обезжиренного в пламени горелки предметного стекла наносят каплю культуры петлей или пастеровской пипеткой (затем пипетку погружают в дезинфицирующий раствор) и равномерно распределяют ее петлей. Предварительно с обратной стороны стекла восковым карандашом очерчивают границы препарата, так как очень тонкие мазки

почти незаметны. Со стороны мазка на стекле указывают номер анализа или культуры.

Для приготовления *мазка из гноя или мокроты* используют два предметных стекла. Небольшое количество материала переносят стерильной петлей или иглой на середину предметного стекла и покрывают вторым так, чтобы осталась свободной треть первого и второго стекла. Стекла раздвигают в стороны (рис. 1.2) и получают два больших мазка одинаковой толщины.

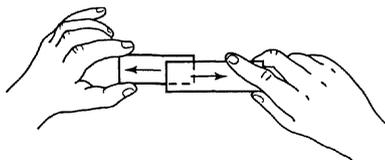


Рис. 1.2. Приготовление мазка из мокроты

Мазок из крови готовят следующим образом. Стерильной иглой укалывают предварительно продезинфицированный безымянный палец левой руки. Первую каплю крови удаляют сухой ваткой, а затем прикасаются к выступившей капле крови поверхностью хорошо обезжиренного предметного стекла. Стекло быстро кладут на стол, придерживая его левой рукой, и прикасаются к капле крови на нем краем второго, несколько более узкого шлифованного стекла, установленного под углом 45° (рис. 1.3). Легким быстрым движением, прижимая шлифованное стекло, продвигают его влево по предметному стеклу, не доходя 1,0—1,5 см до края. Правильно приготовленный мазок имеет желтоватый цвет и просвечивается.

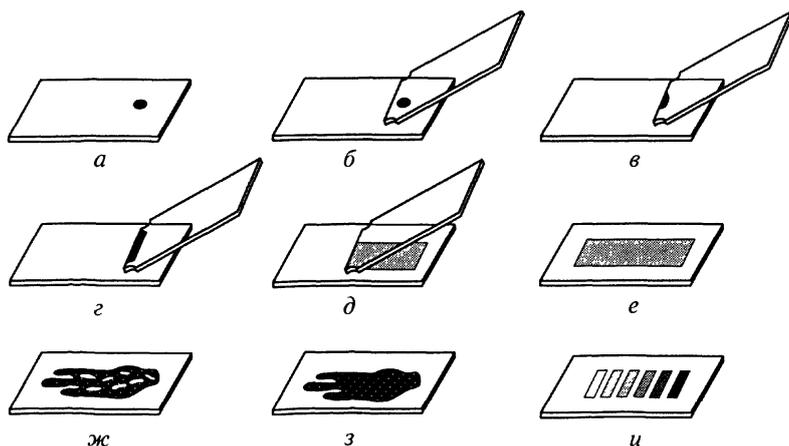


Рис. 1.3. Приготовление мазка из крови:

а—е — этапы приготовления тонкого мазка; ж—и — неправильно приготовленные мазки

Препараты-отпечатки делают из внутренних органов трупов, пищевых продуктов плотной консистенции (мясо, ветчина и др.). Поверхность органов или пищевого продукта прижигают раскаленным скальпелем и из этого участка вырезают кусочек материала. Поверхностью разреза прикасаются к стеклу в двух-трех местах.

Высушивание и фиксирование. Тонко приготовленные мазки обычно быстро высыхают на воздухе при комнатной температуре, более толстые высушивают в термостате или при легком подогревании над пламенем горелки или спиртовки. При этом стекло держат за края большим и указательным пальцами мазком вверх, средний палец помещают под стеклом, чтобы регулировать степень нагревания и не допустить свертывания белка бактерий и нарушения структуры клеток.

Высушенные мазки фиксируют в пламени горелки для того, чтобы убить и закрепить бактерии на стекле, предотвратив их смывание в процессе окраски. Убитые микроорганизмы лучше воспринимают красители, а также не представляют опасности для работающих. Предметное стекло берут пинцетом или большим и указательным пальцами правой руки мазком вверх и втроекратно проводят через наиболее горячую часть пламени горелки. Фиксация этим способом продолжается около 5—6 с, а действие пламени — 2 с.

Мазки крови, препараты-отпечатки и мазки из культуры бактерий, деформирующиеся при высокой температуре, обрабатывают одним из следующих фиксаторов: метиловым спиртом (в течение 5 мин); этиловым спиртом (10—15 мин); смесью Никифорова (равные объемы этилового спирта и эфира — 10—15 мин); уксусом (5 мин); парааминобензойной кислотой и формалином (несколько секунд).

Окраска препарата-мазка. Препараты окрашивают анилиновыми красителями. С химической точки зрения различают кислые, основные и нейтральные красители. Основные красители, у которых красящая часть молекулы заряжена положительно, более активно вступают в соединение с отрицательно заряженной бактериальной клеткой.

Окраска бактерий является сложным физико-химическим процессом. При взаимодействии красителя с веществами клетки микроорганизма образуются соли, обеспечивающие прочность окраски. Отношение разных видов микроорганизмов к красителям называют тинкториальным свойством.

Наиболее широко применяются следующие красители: красные (фуксин основной, фуксин кислый, сафранин, нейтральный красный, конго красный); синие (метиленовый синий, толуидиновый синий, трипановый голубой и др.); фиолетовые (генциановый, метиловый или кристаллический); желто-коричневые (везувин, хризоидин).

Все применяемые красители имеют порошкообразный или кристаллический вид. Из таких красителей, как фуксин основной,

генциановый фиолетовый, метиленовый синий, заранее готовят насыщенные спиртовые растворы (1 г красителя на 10 мл 96%-го спирта). Из насыщенных спиртовых и феноловых растворов красителей готовят водно-феноловые или водно-спиртовые растворы, используемые для окраски простыми и сложными методами.

Простые методы окраски позволяют определить наличие бактерий в препарате, их форму, размеры и взаиморасположение клеток. Для окраски этими методами используют, как правило, один краситель, позволяющий отличить частицы от неокрашенного фона.

Для приготовления фенолового фуксина Циля, отличающегося стойкостью при хранении, используют основной фуксин. Бактерии и другие микроорганизмы окрашиваются фуксином Циля в красный цвет.

Феноловый фуксин Циля

Основной фуксин	1 г
Спирт этиловый (95%-й)	10 мл
Фенол кристаллический	5 г
Глицерин	3—4 капли
Вода дистиллированная	100 мл

Фуксин с кристаллами фенола и несколькими каплями глицерина растирают в ступке до гомогенной массы, понемногу добавляя спирт, затем, не прекращая перемешивания, постепенно доливают дистиллированную воду. Краситель выдерживают 48 ч при комнатной температуре и фильтруют. Срок хранения длительный.

Фуксин Пфейффера

Фуксин Циля	1 мл
Вода дистиллированная	9 мл

При окраске фуксином Пфейффера следует использовать свежеприготовленный раствор.

Насыщенный спиртовой раствор метиленового синего

Метиленовый синий	10 г
Спирт этиловый (95%-й)	100 мл

Щелочной раствор метиленового синего по Леффлеру

Насыщенный спиртовой раствор метиленового синего	30 мл
Натрия (калия) гидроксид (1%-й)	1 мл
Дистиллированная вода	100 мл

Водно-спиртовой раствор метиленового синего

Насыщенный спиртовой раствор метиленового синего	10 мл
Дистиллированная вода	100 мл

Старые растворы этого красителя обладают лучшей красящей способностью.

Фиксированный препарат помещают мазком вверх на подставку. На всю поверхность мазка пипеткой наносят раствор красителя. Фуксином Пфейффера окрашивают 1—2 мин, щелочным раствором метиленового синего Леффлера или водно-спиртовым раствором метиленового синего — 3—5 мин. После окраски краситель сливают, препарат промывают водой, высушивают между листками фильтровальной бумаги и микроскопируют с использованием иммерсионного объектива (см. цв. вклейку, рис. 1).

Прижизненная окраска микроорганизмов. Окраску производят метиленовым синим, нейтральным красным и другими малоядовитыми красителями в разведении 1 : 10 000. Для этого на предметном стекле смешивают каплю исследуемого материала с раствором красителя и накрывают покровным стеклом. Микроскопируют с объективом 40х.

Окраска по методу Бури. При негативном способе окраски живых бактерий по этому методу бактерии остаются неокрашенными на темном фоне. В каплю туши, разведенную 1 : 10 дистиллированной водой, вносят исследуемую культуру и равномерно распределяют петлей или краем предметного стекла. Мазок сушат на воздухе и микроскопируют с иммерсионной системой (рис. 1.4). Вместо туши иногда используют нигрозин, конго красный и др.

Сложные методы окраски предполагают использование нескольких красителей и дают возможность дифференцировать одни микробы от других, а также изучать особенности строения микробных клеток. К ним относят окраску по Граму, Цилю—Нильсену, Нейссеру, Романовскому—Гимзе и др.

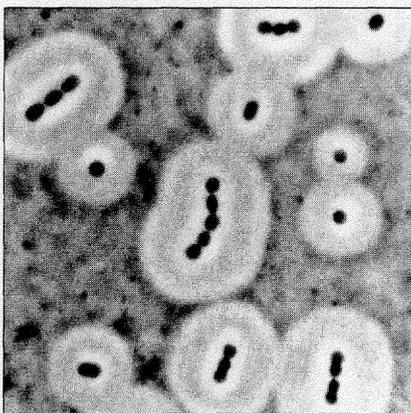


Рис. 1.4. *Streptococcus pneumoniae* в тушвом препарате по Бурри (видна выраженная капсула)

Дифференцирующий метод окраски, предложенный Хансом Христианом Иоахимом Грамом в 1884 г., не утратил практического значения до настоящего времени.

Окраска по методу Грама. При окраске этим методом все бактерии подразделяются на грамположительные и грамотрицательные, что облегчает проведение дифференциальной диагностики инфекционных заболеваний и выбор средств антимикробной терапии.

Грамположительные бактерии и дрожжи после окраски

вания кристаллвиолетом и связывания с иодом не обесцвечиваются в органических растворителях, оставаясь сине-фиолетового цвета; грамтрицательные — обесцвечиваются (возможно, за счет высокого содержания липидов и отсутствия тейхоевых кислот в клеточной стенке), становясь красными после докрасивания сафранином или фуксином (см. цв. вклейку, рис. 2).

Общепринятый метод. Следует приготовить следующие растворы: 1) спиртовой раствор генцианового или кристаллического фиолетового; 2) иодный раствор Люголя; 3) обесцвечивающий раствор (95%-й этиловый спирт и/или ацетон); 4) фуксин Пфейффера или сафранин.

Спиртовой раствор генцианвиолета

Генциан фиолетовый	20 г
Спирт этиловый (95%-й)	200 мл
Вода дистиллированная	800 мл

Генциан фиолетовый, метиловый фиолетовый и кристаллический фиолетовый принадлежат к красителям трифенилметанового ряда, что позволяет применять их в одинаковой степени для окраски по методу Грама. Краситель растворяют, растирая в ступке с добавлением спирта, затем добавляют воду, настаивают в течение 1 сут при комнатной температуре и фильтруют готовый раствор.

Иодный раствор Люголя

Иод кристаллический (I ₂)	1 г
Калия иодид	2—5 г
Вода дистиллированная	300 мл

Смешать ингредиенты и оставить на сутки для растворения иода (иногда приходится добавлять кристаллы KI).

Обесцвечивающий раствор

Ацетон	400 мл
Спирт этиловый (95%-й)	1200 мл

Внимание! Отдельные компоненты и смесь огнеопасны. Возможно использование компонентов по отдельности или в других соотношениях. Обесцвечивание ацетоном происходит более быстро.

Раствор сафранина

Сафранин (2,5%-й раствор в 95%-м этиловом спирте)	25 мл
Вода дистиллированная	75 мл

Вначале готовят 2,5%-й спиртовой раствор сафранина, затем смешивают его в указанной пропорции с водой. В нашей стране в качестве второго красителя чаще используют фуксин Пфейффера (см. выше), который лучше прокрашивает, например клетки грам-отрицательных анаэробов.

Окраска состоит из четырех этапов.

1. На фиксированный мазок накладывают фильтровальную бумагу, на которую наливают раствор генцианвиолета на 30—60 с (при окраске по методу Синева мазок покрывают полоской фильтровальной бумаги, заранее пропитанной раствором генцианового фиолетового и высушенной, на бумагу наносят 2—3 капли воды и выдерживают 1—2 мин), затем раствор сливают.

2. Обрабатывают мазок раствором Люголя 1 мин и, не промывая его водой, сливают раствор.

3. Обесцвечивают мазок 95%-м спиртом и/или ацетоном, покачивая стекло до исчезновения серо-фиолетовых струек красителя (в течение 20—50 с), и немедленно промывают препарат водой.

4. Наливают на мазок фуксин Пфейффера, через 1—2 мин краситель сливают, препарат промывают водой, высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют с иммерсионной системой.

Окраска по Граму позволяет дифференцировать возбудителей инфекционных заболеваний. Так, например, известно, что все болезнетворные кокки, кроме гонококка и менингококка, являются грамположительными; вибрионы, трепонемы, кампилобактеры, хеликобактеры и энтеробактерии — грамотрицательными, все патогенные бациллы и клостридии — грамположительными.

Окрашивание по Граму в модификации Аткинса (K. N. Atkins, 1920). Обычно используют для улучшения окраски грамположительных бактерий, состав красителей несколько отличается.

Спиртовой раствор генцианвиолета

Кристаллический фиолетовый (85—90%-й)	20 г
Спирт этиловый (96%-й)	200 мл
Аммония оксалат $[(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4]$	8 г
Дистиллированная вода	800 мл

Растворить кристаллвиолет, растирая в ступке с добавлением спирта, а оксалат — в воде; смешать оба раствора и через сутки профильтровать готовый краситель.

Иодный раствор

Иод (кристаллический I_2)	20 г
Натрия гидроокись (1N раствор)	100 мл
Дистиллированная вода	900 мл

Растворить иод в щелочи, добавить воду. Хранить при комнатной температуре в емкости из темного стекла.

Для обесцвечивания используют чистый ацетон.

Водно-спиртовой раствор сафранина готовят, как в предыдущей методике.

Мазки, окрашиваемые по Аткинсу, более устойчивы к обесцвечиванию, так как фиксирующий раствор более прочно удерживает

живает генцианвиолет. Это особенно важно для бактерий с повышенной чувствительностью к обесцвечиванию (*Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus* spp.). Метод Аткинса не дает преимуществ при окрашивании грамотрицательных микроорганизмов, более того, выявление таких микроорганизмов может быть осложнено в некоторых материалах, например мазках крови.

Существует множество других модификаций окраски по Граму (с использованием тартразина и светлого зеленого, основного фуксина и др.). Чаще всего усовершенствования направлены на улучшение окраски грамотрицательных микроорганизмов и тех, которые плохо окрашиваются общепринятым методом.

Обнаружение кислотоустойчивых бактерий требует специальных методов окраски.

Окраска по Цилю—Нильсену. Метод используется для выявления кислотоустойчивых микобактерий (возбудителей туберкулеза, микобактериозов, лепры), актиномицетов и некоторых других микроорганизмов. Кислотоустойчивость микроорганизмов обусловлена наличием в их клетках липидов, воска и оксикислот. Такие микроорганизмы плохо окрашиваются разведенными растворами красителей. Для облегчения проникновения красителя в клетки микроорганизмов нанесенный на препарат феноловый фуксин Циля подогревают над пламенем горелки.

Окрашенные микроорганизмы не обесцвечиваются слабыми растворами минеральных кислот и спирта.

Окраска микроорганизмов по методу Циля—Нильсена включает следующие этапы.

1. Фиксированный мазок покрывают полоской фильтровальной бумаги и наливают на нее феноловый фуксин Циля (можно пользоваться фильтровальной бумагой, предварительно пропитанной красителем и высушенной). Мазок подогревают над пламенем горелки до появления паров, затем отводят в сторону для охлаждения и добавляют новую порцию красителя. Подогревание повторяют 2—3 раза. После охлаждения снимают фильтровальную бумагу и промывают препарат водой.

2. Препарат обесцвечивают путем погружения или нанесения на него 5%-го раствора серной кислоты (или 1%-м соляно-кислым спиртом) и промывают несколько раз водой.

3. Окрашивают препарат водно-спиртовым раствором метиленового синего 3—5 мин, промывают водой и высушивают.

При окраске по методу Циля—Нильсена кислотоустойчивые бактерии приобретают интенсивно красный цвет, остальная микрофлора окрашивается в светло-синий цвет (см. [цв. вклейку, рис. 3](#)).

Окрашивание спирохет и простейших традиционно ведется с применением особых красителей.

Окраска по Романовскому—Гимзе. Мазки из исследуемого материала (кровь, гной, тканевая жидкость и др.) высушивают на

воздухе, фиксируют метиловым спиртом в течение 3 мин, снова высушивают на воздухе и окрашивают. Обработку мазков удобно производить в чашках Петри, на дно которых положены две подставки (из предметного стекла, разрезанного вдоль пополам). Препарат кладут мазком вниз на подставки и сбоку подливают разведенный краситель так, чтобы мазок соприкасался с ним. Окраска длится от 30 мин до одного или нескольких часов, после чего мазки промывают водой и высушивают на воздухе.

Краситель Романовского — Гимзы состоит из метиленового синего, эозина и азура, благодаря чему он окрашивает в разные цвета элементы микроорганизма и форменные элементы крови. Перед обработкой препарата краситель разводят водой (рН 7,0—7,2) в 10—20 раз. Степень разведения меняется в зависимости от серии красителя и рН воды. Поэтому рекомендуют каждую новую серию красителя и воду проверять на контрольных мазках крови.

Цитоплазма простейших при окраске методом Романовского — Гимзы приобретает голубой цвет, а ядра — красный. Элементы крови окрашиваются следующим образом: эритроциты — в розовый цвет, ядра лейкоцитов — в фиолетовый, цитоплазма — в голубой, базофильная зернистость — в синий, эозинофильная — в красный, нейтрофильная — в сиреневый.

Окраска по Морозову методом серебрения. Метод применяется для выявления путем импрегнации серебром спирохет, вирусов и микроструктур бактерий (жгутиков, включений). Готовят следующие растворы.

Раствор № 1

Ледяная уксусная кислота	25 мл
Формалин (40%-й)	2 мл
Дистиллированная вода	100 мл

Раствор № 2

Танин	5 г
Жидкий фенол	1 мл
Дистиллированная вода	100 мл

Раствор № 3

К 5%-му раствору нитрата серебра по каплям добавляют раствор аммиака до легкой опалесценции (готовят *ex tempore*).

Высушенный на воздухе мазок фиксируют раствором № 1 в течение 1 мин, промывают водой, затем на препарат наливают раствор № 2 (для протравливания), подогревают до появления паров и тщательно промывают водой. Для окраски серебрением используют раствор № 3, который наливают на препарат и подогревают до появления темно-коричневого цвета. После этого препарат промывают водой, высушивают и микроскопируют с иммерсионной системой.

С диагностической целью в микробиологических лабораториях изучают не только форму и размеры бактериальной клетки, но и отдельные элементы ее структуры: цитоплазму, включения, нуклеоид, оболочку, капсулу, жгутики, споры.

Для выявления клеточной стенки бактерий используют специальные методы окраски (Пешкова, Гутштейна, Кнайзи и др.) с предварительным протравливанием препарата.

Плазмолиз бактериальной клетки проводят в концентрированных растворах хлорида натрия или сахарозы. При этом клеточная стенка отслаивается от обезвоженной цитоплазмы и хорошо видна при микроскопии.

Метод Пешкова. Фиксатор (90%-й спирт — 60 мл, хлороформ — 30 мл, уксусная кислота — 10 мл) наливают на препарат на 15 мин, затем протравливают 10%-м водным раствором танина в течение 5 мин, промывают водой и окрашивают фуксином Пфейффера в течение 30—60 с, высушивают на воздухе и микроскопируют.

Для обнаружения нуклеоида бактерий используют *микрхимическую реакцию Фельгена* с применением слабого кислотного гидролиза. При этом освобождается дезоксирибоза, которая затем переходит в альдегидную форму и вступает в реакцию с бесцветной фуксинсернистой кислотой реактива Шиффа. Нуклеоид окрашивается в красно-фиолетовый цвет. Выявить нуклеоид микроорганизмов можно также с помощью электронно-микроскопических исследований ультратонких срезов.

Выявление гранул волютина (цитоплазматических включений) актуально, например, при диагностике дифтерии. Вследствие высокой концентрации метафосфатов и других соединений фосфора гранулы волютина обладают метахромазией. При окраске щелочным метиленовым синим, уксусно-кислым метиловым фиолетовым они имеют по сравнению с цитоплазмой более интенсивный цвет.

Окраска щелочным метиленовым синим по Леффлеру. На фиксированный мазок наливают щелочной метиленовый синий на 3—5 мин, промывают водой, высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют. При этом цитоплазма дифтерийных коринебактерий окрашивается в голубой цвет, гранулы волютина — в темно-синий.

Окраска уксусно-кислым метиловым фиолетовым. Фиксированный мазок обрабатывают в течение 5—10 мин уксусно-кислым метиловым фиолетовым (метиловый фиолетовый, генциановый или кристаллический фиолетовый — 0,25 г, 5%-й раствор уксусной кислоты — 100 мл). Мазок промывают водой и высушивают. В этом случае цитоплазма дифтерийных коринебактерий окрашивается в светло-сиреневый цвет, гранулы волютина — в темно-лиловый (см. цв. вклейку, рис. 4, а).

При сложном методе окраски по Нейссеру бактериальные клетки принимают желтый цвет, а гранулы волютинина — коричнево-черный (см. цв. вклейку, рис. 4, б).

Окраска по Нейссеру. Окраска гранул волютинина этим методом включает три этапа.

1. Фиксированный мазок окрашивают уксусно-кислым метиленовым синим 1 мин, сливают краситель и промывают мазок водой.

2. Наливают раствор Люголя на 20—30 с, после чего сливают раствор.

3. Окрашивают препарат везувином 1—3 мин, после чего промывают водой и высушивают.

Уксусно-кислый метиленовый синий по Нейссеру

Метиленовый синий	0,1 г
Спирт (95%-й)	2 мл
Ледяная уксусная кислота	5 мл
Дистиллированная вода	100 мл

Везувин

Везувин	12 г
Спирт (95%-й)	60 мл
Дистиллированная вода	40 мл

Смесь кипятят и после охлаждения фильтруют.

После окраски по Нейссеру цитоплазма клеток, имеющая кислую реакцию, воспринимает щелочной краситель везувин и становится желтой, а зерна волютинина окрашиваются в темно-синий цвет. В настоящее время используют несколько вариантов этой окраски.

Обнаружение капсул бактерий имеет значение как для их дифференциации, так и для определения их вирулентности. Капсулы, как и споры, плохо воспринимают анилиновые красители, поэтому чаще применяют негативные методы окраски.

Окраска по Гинсу. Высушенный на воздухе препарат, приготовленный по Бурри (см. выше), фиксируют, нанося 2—3 капли спирта и сжигая его на стекле. На остывшее стекло наливают фуксин Пфейффера на 3—5 мин, промывают мазок водой и высушивают.

В этом случае бактерии окрашиваются в красный цвет, а неокрашенные капсулы контрастно выделяются на тушевом фоне препарата (см. цв. вклейку, рис. 5). Иногда вокруг окрашенных бактерий, не образующих капсул, видны небольшие бесцветные зоны — ложные капсулы, которые появляются в результате неправильного высушивания или фиксации мазка.

Выявление жгутиков бактерий предполагает использование сложных методов окраски (серебрение по Морозову, методы Грея, Леффлера, Шенка и др.), так как жгутики легко повреждаются при приготовлении препарата. Как правило, методы окраски основаны на искусственном увеличении жгутиков за счет нанесе-

ния протравы. Строение их и другие детали изучают с помощью электронной микроскопии.

Окраска по Грю. Протраву, состоящую из растворов № 1 (насыщенный водный раствор калийных квасцов — 5 мл, 20%-й водный раствор танина — 2 мл, насыщенный водный раствор хлорида ртути — 2 мл) и № 2 (насыщенный спиртовой раствор основного фуксина — 0,4 мл), готовят за сутки до использования, наливают на препарат на 8—10 мин, промывают водой, окрашивают карболовым фуксином Циля 5 мин, вновь промывают водой, сушат на воздухе и микроскопируют. Жгутики окрашиваются в красный цвет.

Окраска по Шенку. Протраву, состоящую из растворов № 1 (30 мл насыщенного водного раствора танина и 10 мл 5%-го водного раствора хлорида железа) и № 2 (1 мл анилина и 4 мл 95%-го этилового спирта), наносят на мазок (№ 1 — 8 капель, № 2 — 1 капля), сливают и окрашивают метиленовым синим Леффлера или 1%-м спиртовым раствором сафранина.

Обнаружение спор бактерий важно для их идентификации. Используются специальные методы окраски, основанные на более интенсивном прокрашивании этих плохо воспринимающих окраску структур. Приводим некоторые из них.

Окраска по Вертцу—Канклину. Препарат фиксируют в пламени горелки, окрашивают 5%-м водным раствором малахитового зеленого и 3—4 раза нагревают до появления паров (в течение 3—6 мин), затем промывают водой и докрасшивают 0,5%-м водным раствором сафранина. Тело бактерий окрашивается в красный цвет, споры — в зеленый.

Окраска по Ожешке. Густой мазок высушивают на воздухе, протравливают 0,5%-м раствором соляной кислоты и подогревают до появления паров. Затем препарат промывают водой, высушивают, фиксируют над пламенем и окрашивают по способу Циля—Нильсена. Споры приобретают розово-красный, а клетка — голубой цвет.

Окраска по Пешкову. На мазок, фиксированный в пламени, наливают метиленовый синий по Леффлеру. Нагревают препарат в средней части пламени и кипятят 15—20 с, не допуская высыхания. Остывший препарат промывают водой, докрасшивают 0,5%-м раствором нейтрального красного в течение 30 с. Затем снова промывают водой и высушивают. Споры окрашиваются в голубоватосиний цвет, клетка — в розовый.

1.1.3. Исследование микроорганизмов в живом состоянии методами раздавленной и висячей капли

В живом состоянии у микроорганизмов изучают процессы размножения, спорообразования, влияние на них различных химических и физических факторов. В практических лабораториях изучение микроорганизмов в живом состоянии используют для опре-

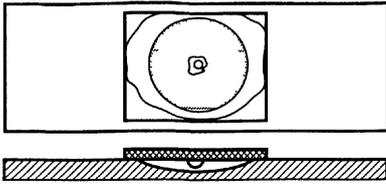


Рис. 1.5. Приготовление висячей капли

деления их подвижности, т. е. косвенного подтверждения наличия у них жгутиков. Препараты в этом случае готовят методами раздавленной или висячей капли и микроскопируют с сухим или иммерсионным объективом. Более четкие результаты получают при микроскопии в темном поле или фазовоконтрастной микроскопии.

Препарат раздавленной капли. На середину предметного стекла наносят каплю исследуемого материала (чаще суточную бульонную культуру микроорганизмов). Каплю накрывают покровным стеклом так, чтобы не появились пузырьки воздуха; жидкость должна заполнять все пространство и не выступать за края стекла. Недостатком препарата раздавленной капли является быстрое высыхание исследуемого материала. При длительном микроскопировании рекомендуют смазывать края покровного стекла вазелином.

Препарат висячей капли. Для приготовления этого препарата используют специальные толстые предметные стекла с углублением (лункой) в центре. Небольшую каплю исследуемого материала наносят на середину покровного стекла. Края лунки предварительно смазывают вазелином. Предметное стекло накладывают на покровное так, чтобы капля находилась в центре лунки. Затем его осторожно переворачивают, и капля свисает в центре герметически закрытой полости лунки (рис. 1.5). В такой замкнутой полости капля защищена от высыхания. Недостатком препарата являются оптические дефекты изображения, связанные с толщиной предметного стекла и наличием лунки.

Приготовленные препараты висячей или раздавленной капли микроскопируют, слегка затемняя поле зрения, конденсор при этом опускают, регулируя поступление света вогнутым зеркалом. Вначале пользуются малым увеличением (объектив 8х), после того как обнаружат край капли, устанавливают объектив 40х или иммерсионный.

Иногда молекулярное (броуновское) движение ошибочно принимают за истинное. Следует учитывать, что, передвигаясь с помощью жгутиков, микроорганизмы могут пересекать все поле зрения и совершать круговые и вращательные движения

После работы препараты раздавленной и висячей капли следует опускать в отдельную емкость с дезраствором для их обеззараживания и дальнейшего использования.

1.2. Бактериологическое исследование

1.2.1. Принципы и методы выделения чистых культур бактерий

Бактериологическое исследование основано на культивировании бактерий на питательных средах, выделении чистой культуры возбудителя и ее идентификации. Чистой культурой называют популяцию микроорганизмов одного вида, как правило выращенную из изолированной колонии на плотной питательной среде. Разрешающая способность метода составляет в среднем 1000 клеток в 1 мл.

Известно, что возбудители инфекционных болезней в организме человека, животных и во внешней среде находятся преимущественно в смеси с другими микроорганизмами (в том числе условно-патогенными и сапрофитами). Выделение чистой культуры позволяет выявить ее морфологические, культуральные, биохимические и другие признаки, по совокупности которых определяют видовую принадлежность возбудителя, т.е. осуществляют его идентификацию.

Существуют следующие принципы и методы выделения чистых культур бактерий.

На принципе механического разобщения микроорганизмов основаны следующие методы:

серийных разведений в жидкой питательной среде (метод Пастера);

пластинчатых разведений (метод Коха);

рассева по поверхности плотной питательной среды (метод Дригальского);

выделения чистой культуры из одной клетки с помощью микроскопа и микроманипулятора.

На принципе использования биологических особенностей микроорганизмов основаны методы:

выделения бактерий по их подвижности;

выделения термоустойчивых бактерий;

выделения анаэробов;

выделения кислото- и щелочеустойчивых микроорганизмов;

выделения микроорганизмов, устойчивых к антибиотикам, анилиновым красителям и др.;

выделения бактерий на элективных средах;

выделения культур путем заражения восприимчивых лабораторных животных и др.

Выбор метода культивирования, состава питательной среды зависит главным образом от типа питания и дыхания (биологического окисления) микроорганизмов. На рис. 6 (цв. вклейка) показан наиболее распространенный способ посева исследуемого материала с целью выделения чистой культуры: механическое

разобшение клеток микроорганизмов по поверхности плотной питательной среды с помощью бактериологической петли.

1.2.2. Питательные среды

Для роста и размножения бактерии нуждаются в питательных веществах: им необходимы источники углерода, азота, витамины, минералы и другие соединения сложного и простого состава. Большинство бактерий, имеющих медицинское значение, являются *гетерохемоорганотрофами*, которые питаются по законам осмоса. Кроме того, среди бактерий встречаются как легко культивируемые, так и требовательные к питательным веществам микроорганизмы (прихотливые), которым необходимы дополнительные факторы роста.

Питательные среды готовят из продуктов животного или растительного происхождения. Состав сред определяется метаболическими потребностями той или иной группы бактерий. Все питательные среды должны отвечать следующим требованиям:

- содержать основные питательные вещества в легкоусвояемой форме;

- быть влажными, изотоничными и нетоксичными (для исследуемых микробов);

- иметь определенную вязкость;

- иметь оптимальный показатель рН и окислительно-восстановительный (редокс) потенциал;

- обладать буферными свойствами;

- быть стерильными;

- по возможности быть прозрачными.

Среды различают: по консистенции (жидкие, полужидкие, плотные); по составу (простые и сложные); по целевому назначению (основные, консервирующие, транспортные, накопительные, селективные, дифференциально-диагностические, специальные — обогащенные, среды для хранения). Особой группой являются питательные среды для культивирования анаэробов. Кроме того, для научных исследований, а также промышленного культивирования микроорганизмов часто применяют синтетические среды (среды с точно известным химическим составом). Ниже приведены условная классификация и примеры часто используемых в бактериологии сред (табл. 1.1).

Основные среды (МПБ, МПА) — простые по составу и применяются для культивирования большинства неприхотливых бактерий. Содержат: мясной экстракт, пептон, хлорид натрия (МПА дополнительно содержит агар-агар).

Обогащенные среды можно приготовить на основе простых, включив в их состав кровь, гемин, сыворотку, асцитическую жидкость и др. Такие среды используют для культивирования бактерий со

Таблица 1.1

Часто используемые питательные среды

Тип среды	Пример среды	
	жидкой	плотной
Основная (простая, универсальная)	Мясо-пептонный бульон	Мясо-пептонный агар
Среда специального назначения (сложная):		
обогащенная (специальная)	Сахарный бульон, сывороточный бульон, асцитический бульон и т. д.	Сахарный агар, сывороточный агар, кровяной агар и т. д.
селективная	Щелочная пептонная вода, желчный бульон, среды с антибиотиками и т. д.	Солевой агар, желточно-солевой агар (ЖСА), среды с антибиотиками и т. д.
накопительная	Селенитовый бульон, полужидкая среда для контроля стерильности (СКС) и др.	Нет
дифференциально-диагностическая	Среды Гисса	Агары Эндо, Левина, Олькеницкого, среды Гисса (полужидкие) и др.
Транспортная и консервирующая среды	Среда Амиеса (полужидкий агар с активированным углем), глюкозо-дрожжевая среда, СКС и др.	
Среда для хранения культур	Глицерин (для хранения при -20°C)	Среда Дорсе и др.

сложными питательными потребностями (прихотливых микроорганизмов).

Накопительные среды — это жидкие питательные среды, которые применяют при необходимости накопить в них бактерии опре-

деленной группы в результате их преимущественного размножения по сравнению с сопутствующими микробами. Состав этих сред подбирают таким образом, чтобы рост сопутствующей флоры частично или полностью был задержан.

Селективные (элективные) среды используют для избирательного культивирования микроорганизмов определенных видов при подавлении роста других микроорганизмов. Такой эффект достигается при добавлении различных ингибиторов роста микробов, изменении показателя рН, состава питательных веществ в среде и др.

Дифференциально-диагностические среды позволяют различать бактерии по их росту, биохимической активности и другим признакам. В состав этих сред, кроме питательных веществ, обычно включают субстрат, по отношению к которому дифференцируются бактерии, и индикатор. В результате культивирования микробы, ферментирующие субстрат, способствуют накоплению продуктов расщепления, сдвигу рН, редокс-потенциала среды, что сопровождается окрашиванием среды и собственных колоний в цвет индикатора (см. цв. вклейку, рис. 7).

К дифференциально-диагностическим относят также комбинированные полиуглеводные среды (Рассела, Клигера, трехсахарный железосодержащий агар, Олькеницкого и др.). Например, среда Олькеницкого содержит: 100 мл МПА, 1 г лактозы, 1 г сахарозы, 0,1 г глюкозы, 1 г мочевины, 0,02 г соли Мора, 0,003 г тиосульфата натрия, 0,4 мл фенолового красного (0,4%-го раствора); рН 7,2—7,4.

Дифференциально-диагностические среды обычно являются плотными, реже полужидкими; в своем составе они имеют несколько ферментируемых субстратов и индикаторных систем, что позволяет использовать их не только для накопления чистой культуры в процессе ее выделения (см. ниже), но и одновременно проводить первичную идентификацию культуры по ряду фенотипических признаков. Так, на трехсахарном железосодержащем агаре можно определить способность культуры к продукции сероводорода, ферментации глюкозы (до кислоты или кислоты и газа), лактозы, сахарозы (см. цв. вклейку, рис. 8).

Транспортные и консервирующие среды применяют для временного сохранения микроорганизмов после взятия исследуемого материала и при транспортировке его в лабораторию. Обычно эти среды содержат только буферные и солевые растворы (иногда агар-агар, активированный уголь, твин-80 — для придания полужидкой консистенции и нейтрализации токсических воздействий); они не предназначены для культивирования микробов.

Среды для хранения культур предназначены для длительного сохранения чистых культур микроорганизмов в условиях лаборатории. Основным требованием для них является способность дли-

тельного поддержания жизнеспособности без изменения основных свойств культур.

Одним из важных моментов в работе по выделению возбудителя из исследуемого объекта является взятие, хранение и транспортировка материала.

1.2.3. Правила взятия, хранения и транспортировки материала

При взятии материала для проведения бактериологического исследования следует учитывать следующее:

а) выбор биологического материала для исследования определяется локализацией предполагаемого возбудителя на данном этапе болезни. В случае отсутствия или неопределенности локальных очагов исследуют кровь. Брать материал следует непосредственно из очага инфекции или исследовать соответствующее отделяемое (гной, мочу, желчь и т. п.);

б) брать материал рекомендуется до начала антибактериальной терапии или через определенный промежуток времени после введения препарата, необходимого для его выведения из организма (от 8 ч до 3 сут в зависимости от препарата и предполагаемого возбудителя);

в) брать материал нужно во время наибольшего содержания в нем возбудителей заболевания (например, кровь для выделения гемокультуры при повышении температуры в начале периода озноба и т. д.);

г) следует соблюдать правила асептики (во избежание контаминации пробы микрофлорой окружающей среды и представителями нормальной микрофлоры тела);

д) отбор материала для выделения аэробов и факультативных анаэробов производят стерильными ватными тампонами (отделяемое из раны, мазки со слизистых оболочек, из глаза, носа, зева, цервикального канала, влагалища, анального отверстия), специальными приспособлениями (петлями, трубками, щетками и др.), шприцем (кровь, гной, экссудаты), непосредственно в стерильную посуду (моча, мокрота, фекалии);

е) материал для выделения строгих анаэробов получают из патологического очага путем пункции шприцем, из которого предварительно удален воздух, при исследовании кусочков ткани их берут из глубины очага. При необходимости использовать тампоны их нужно сразу же после взятия материала погружать в транспортную среду;

ж) количество материала должно быть достаточным для исследования и его повторения в случае необходимости; при низкой концентрации возбудителя стараются взять большое количество материала;

з) транспортировку нативного клинического образца материала в лабораторию следует производить в максимально короткие сроки, так как при длительном его хранении происходит гибель многих видов возбудителей, начинают размножаться менее требовательные и быстро растущие виды, что приводит к нарушению количественного соотношения видов микробов. Если материал нельзя немедленно транспортировать в лабораторию, следует использовать транспортные среды или поместить материал в условия бытового холодильника (приемлемо не для всех возбудителей). Материал для микробиологического исследования транспортируют в специальных биксах, пеналах и т. п.;

и) клинические образцы для культивирования анаэробов следует транспортировать в лабораторию, максимально защищая их от воздействия кислорода воздуха (используют специальные герметично закрытые флаконы, заполненные бескислородной газовой смесью или специальной транспортной средой, в которую вносят исследуемый материал уколом иглы через резиновую пробку флакона; материал можно транспортировать прямо в шприце, на кончик которого надета стерильная резиновая пробка);

к) к клиническому образцу, направляемому в лабораторию, прилагают сопроводительный документ, содержащий основные сведения, необходимые для проведения микробиологического исследования (характер материала, Ф. И. О. больного, название учреждения или отделения, номер истории болезни, предполагаемый диагноз заболевания, предшествующая антимикробная терапия, дата и время взятия материала, подпись врача, направляющего материал для исследования).

1.2.4. Выделение и идентификация чистой культуры бактерий

В этом разделе мы рассмотрим основные этапы выделения и идентификации чистых культур аэробных и анаэробных бактерий. Методы выделения и идентификации отдельных возбудителей инфекционных заболеваний представлены в соответствующих разделах, посвященных их лабораторной диагностике.

Схематично этапы выделения и идентификации чистых культур аэробных и факультативных анаэробных бактерий представлены в табл. 1.2.

Аэробные и факультативно-анаэробные бактерии. На первом этапе из исследуемого материала готовят мазки, микроскопируют их, затем сеют материал на плотную среду в чашки Петри шпателем или бактериологической петлей (см. цв. вклейку, рис. 6). При этом достигается механическое разъединение микроорганизмов на поверхности питательной среды, что позволяет получить их рост в виде изолированных колоний. В отдельных случаях исследуемый материал вначале сеют в жидкую среду накопления, а

Таблица 1.2

Принципиальная схема (алгоритм) бактериологического исследования

Этапы	Цель	Ход исследования
I	Выделение чистой культуры	Посев исследуемого материала на плотные питательные среды
<i>Инкубация посевов при оптимальных условиях</i> (обычно 18—20 ч при 37 °С)		
II	Накопление чистой культуры	Изучение культуральных свойств изолированных колоний Микроскопия окрашенных мазков (изучение морфологических и тинкториальных свойств) Пересев колоний на свежую среду для накопления
<i>Инкубация посевов при оптимальных условиях</i> (обычно 18—20 ч при 37 °С)		
III	Идентификация и изучение свойств чистой культуры	Проверка чистоты выделенной культуры. Изучение биохимических свойств (ферментативной активности): сахаролитических; протеолитических Внутривидовая идентификация и эпидемиологическое маркирование (при необходимости): серотипирование; биотипирование; фаготипирование; колицинотирование; генотипирование Определение токсигенности (вирулентности) Определение чувствительности к антибиотикам и другим антимикробным средствам
<i>Инкубация посевов при оптимальных условиях</i> (обычно 18—20 ч при 37 °С)		
IV	Учет результатов	

затем пересевают его в чашки Петри с плотной питательной средой. Чашки с посевами обычно помещают в термостат на 18—24 ч при 37 °С.

На втором этапе изучают культуральные свойства бактерий (характер их роста на питательных средах).

Макроскопическое изучение колоний в проходящем и отраженном свете. Чашку поворачивают дном к себе и рассматривают колонии в проходящем свете. При наличии различных видов колоний их нумеруют и описывают каждую в отдельности. Обращают внимание на следующие свойства: а) величину колоний (крупные — более 4 мм в диаметре, средние — 2—4 мм, мелкие — 1—2 мм, карликовые — менее 1 мм); б) форму очертаний колоний (правильно и неправильно округлая, розеткообразная, ризоидная и др.); в) степень прозрачности (непрозрачная, полупрозрачная, прозрачная).

В отраженном свете рассматривают колонии со стороны крышки, не открывая ее, и фиксируют в протоколе следующие данные: а) цвет колоний (бесцветные, пигментированные, цвет пигмента); б) поверхность (гладкая, блестящая, влажная, морщинистая, матовая, сухая и др.); в) рельеф (выпуклые, погруженные в среду, плоские, с куполообразным центром, с валиком по краю и др.).

Микроскопическое изучение колоний. Чашку устанавливают вверх дном на предметном столике микроскопа, опускают конденсор и с помощью объектива 8× изучают колонии, фиксируя в протоколе их структуру (гомогенная или аморфная, зернистая, волокнистая и др.) и характер краев (ровные, волнистые, зубчатые, бахромчатые и др.).

Из части колоний готовят мазки (при взятии материала из колонии отмечают ее консистенцию — сухая, слизистая, пастообразная), окрашивают по Граму и микроскопируют, выясняя тинкториальные свойства микроорганизмов. При наличии однородных бактерий остаток колоний пересевают на скошенный агар для получения чистой культуры в достаточном количестве. Пробирки с посевами помещают в термостат на 18—24 ч при температуре 37 °С.

На третьем этапе из выросшей на скошенном агаре культуры делают мазки, окрашивают их по Граму. О чистоте культуры судят по однородности роста, формы, размера и окраски микроорганизмов. Для идентификации выделенной чистой культуры, кроме изучения морфологических, тинкториальных и культуральных особенностей микроорганизмов, необходимо определить их ферментативные и антигенные свойства, фаго- и бактериоциночувствительность, токсигенность и другие признаки, характеризующие их видовую специфичность.

Для определения пути расщепления глюкозы (окислительный или бродильный) ставят *тест ОФ* (тест окисления/ферментации): культуру засевают уколом в две пробирки с полужидкой питательной средой, содержащей глюкозу и бромтимоловый синий. В одну из них вносят слой вазелинового масла (для создания анаэробноаэробии) и инкубируют обе пробирки при 37 °С. Образование

кислоты, сопровождающееся пожелтением среды в обеих пробирках, свидетельствует о ферментативной реакции. Образование кислоты только в пробирке без масла свидетельствует об утилизации глюкозы путем окисления. Отсутствие кислотообразования в обеих пробирках свидетельствует о том, что тестируемые микроорганизмы не утилизируют глюкозу этими путями (см. цв. вклейку, рис. 9). В двух последних случаях микроорганизмы могут относиться к «неферментирующим» видам — *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Flavimonas*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* и др.

Для выявления микробной *нитратредуктазы* ставят тест на восстановление нитрата в нитрит (последний в присутствии N,N-диметил-1-нафтиламина образует диазосоединение, которое окрашивает среду в красный цвет). Культуру выращивают на полужидкой среде, содержащей 0,1 % нитрата, и добавляют смесь указанного реактива с сульфаниловой кислотой, наблюдая в течение нескольких минут за развитием красного окрашивания среды (свидетельствует о присутствии нитрита).

Для определения *каталазы* на поверхность 24-часовой культуры на скошенном агаре наливают 0,5—1,0 мл 3%-го раствора перекиси водорода (нельзя использовать кровяной агар, так как каталаза эритроцитов может дать ложноположительную реакцию). Появление пузырьков газа расценивают как положительную реакцию. В качестве контроля следует параллельно исследовать культуру, заведомо содержащую каталазу.

Для выявления *ферментов, расщепляющих углеводы*, используют дифференциально-диагностические среды Гисса. При ферментации бактериями углеводов с образованием кислоты цвет среды меняется за счет находящегося в ней индикатора, что создает впечатление пестроты («пестрый» ряд). В зависимости от изучаемого рода и вида бактерий подбирают среды с соответствующими моно- и дисахарами (глюкоза, лактоза, мальтоза, сахароза и др.), полисахаридами (крахмал, гликоген, инулин и др.), высшими спиртами (глицерин, маннит и др.), в процессе ферментации которых образуются альдегиды, кислоты и газообразные продукты (CO₂, H₂, CH₄).

Протеолитические ферменты у бактерий обнаруживают различными способами, например, с помощью посева их в столбик питательного желатина. Посевы выдерживают при комнатной температуре (20—22 °С) в течение нескольких дней, регистрируя не только наличие разжижения, но и его характер (послойно, в виде гвоздя, елочки и т. д.) (рис. 1.6).

Протеолитическое действие ферментов микроорганизмов можно также наблюдать при посевах на свернутую сыворотку, при этом вокруг колоний появляются углубления (разжижение). В молоке происходит расщепление сгустка казеина с образованием пептона, в результате чего оно приобретает желтоватый цвет (пептонизация молока).

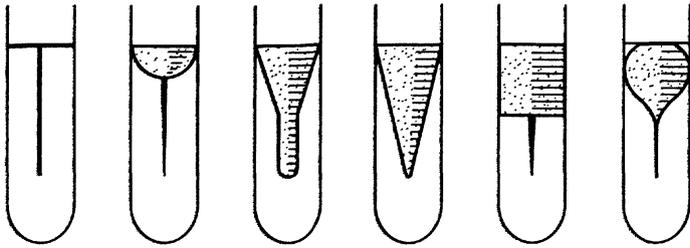


Рис. 1.6. Последовательные фазы разжижения желатина холерным вибрионом

Показателями более глубокого расщепления белка является образование индола, аммиака, сероводорода и других соединений. Для выявления этих газообразных веществ делают посевы микроорганизмов в МПБ, 1%-ю пептонную или триптонную воду. Посевы выдерживают в термостате в течение 24—72 ч.

Для обнаружения *индола* по способу Ковача чистую культуру выращивают в пробирках на жидкой среде, богатой триптофаном, и добавляют несколько капель реактива Ковача (изоамиловый спирт — 150 мл, *n*-диметиламинобензальдегид — 10 мл, концентрированная соляная кислота — 50 мл). Индол, образовавшийся в ходе расщепления микробами триптофана, при взаимодействии с бензальдегидом образует окрашенные в красный цвет соединения — «розиндолы», поэтому при положительной реакции добавленная жидкость в течение нескольких минут становится малиново-красной.

Сероводород обнаруживают с помощью полоски фильтровальной бумаги, пропитанной раствором ацетата свинца, которую закрепляют между стенкой и пробкой пробирки. При взаимодействии сероводорода и ацетата свинца бумага чернеет в результате образования сульфида свинца. В другом варианте в состав плотной среды вводят сульфат железа(II), который при взаимодействии с сероводородом образует черный преципитат сульфида железа (колонии образующих сероводород бактерий и среда вокруг них чернеют).

Биохимические свойства большого количества культур аэробных и анаэробных бактерий нередко изучают с применением специальных *микротестсистем* и *микробиологических анализаторов*. Как правило, для этого используют полистироловые пластины с изолированными лунками, содержащими высушенные дифференциально-диагностические среды. При внесении небольшого количества стандартизованной суспензии испытуемой чистой культуры среда в лунках восстанавливается, а при последующем инкубировании в термостате культура вырастает в лунках, проявляя свои характерные изменения на соответствующих средах (см. [цв. вклей-](#)

ку, рис. 10). Анализатор отличается от мультимикротестов тем, что учет, а в ряде приборов также посев и инкубирование осуществляется автоматически (мутность и цветовые изменения среды в каждой лунке регистрируются с помощью встроенного спектрофотометра).

Антигенные свойства выделенной культуры изучают, как правило, с помощью реакции агглютинации (см. подразд. 1.4).

Вирулентность определяют путем выявления факторов патогенности, заражения экспериментальных животных, культур ткани или на экспериментальных моделях (см. подразд. 1.3.4).

Для определения чувствительности к антимикробным средствам культуру засевают на жидкие и плотные среды в соответствии с принятыми методами исследования (см. подразд. 1.2.5).

Характерные свойства бактерий, имеющие значение для их идентификации, приведены в разделах, посвященных лабораторной диагностике вызываемых ими заболеваний.

В отдельных случаях для выделения чистой культуры возбудителя (чума, туляремия и др.) применяется биологическая проба (см. подразд. 1.3).

Видовую принадлежность аэробных бактерий определяют путем сравнения обнаруженных морфологических, культуральных, биохимических, антигенных и других свойств выделенной культуры со свойствами бактерий известных видов и вариантов.

На четвертом этапе проводят учет результатов исследования, анализируют их и выписывают ответ по результатам посевов.

Анаэробные бактерии. Одним из основных требований при культивировании анаэробных бактерий является создание анаэробной атмосферы, удаление кислорода из питательной среды и снижение ее редокс-потенциала. Пониженное содержание кислорода создают следующими методами:

применением специальных сред с редуцирующими веществами — тиогликолевой кислоты, тиогликолята натрия, цистеина, глюкозы, кусочков печеночной (среда Китта—Тароцци) и мозговой (среда Гиблера) ткани, мяса и др.;

связыванием или замещением кислорода в герметически закрытых сосудах — анаэростатах, эксикаторах или специальных пластиковых мешках (рис. 1.7);

изоляцией анаэробов в питательной среде от воздействия атмосферного кислорода (посев высоким столбиком в трубку или пробирку, заливка вазелинового масла на поверхность питательной среды, метод Перетца и др.);

использованием специальных анаэробных боксов (см. цв. вклейку, рис. 11).

На первом этапе исследуемый материал для накопления анаэробов сеют в среду Китта—Тароцци (концентрированный



Рис. 1.7. Выращивание анаэробов в портативном анаэростате: в замкнутом объеме с помощью газогенераторного пакета создается бескислородная атмосфера

МПБ или бульон Хоттингера, глюкоза, 0,15 % агар-агара, pH 7,2 — 7,4). На дно пробирки для адсорбции кислорода помещают кусочки вареной печени или фарша слоем 1,0 — 1,5 см и заливают 6 — 7 мл среды. Среду перед посевом необходимо прогреть в кипящей водяной бане в течение 10 — 20 мин (для удаления растворенного в ней кислорода воздуха), а затем охладить. При выделении споровых форм анаэробов засеянную среду вновь прогревают при температуре 80 °С в течение 20 — 30 мин для уничтожения неспорных форм бактерий. Посевы заливают вазелиновым маслом и помещают в термостат. Кроме среды Китта — Тароцци, используют бульон Хоттингера и Мартена, содержащий 0,5 — 1,0 % глюкозы и кусочки органов животных, тиогликолевую среду и др.

Например, тиогликолевая среда состоит из гидролизата казеина — 15, дрожжевого и/или мясного экстракта — 5, глюкозы — 5,5, хлорида натрия — 2,5, L-цистеина и тиогликолята натрия — по 0,5, резазурина — 0,001, агар-агара — 0,75. Среду разливают в пробирки или флаконы, стерилизуют при 121 °С 15 мин и хранят в темном месте. В случае покраснения верхней части столбика среды более чем $\frac{1}{3}$, ее восстанавливают путем прогревания в кипящей водяной бане или в струе пара.

На втором этапе учитывают изменения, происшедшие в среде накопления, а именно появление помутнения или помут-

нения и газообразования. Бульонную культуру набирают пастеровской пипеткой, которую опускают через слой вазелинового масла на дно пробирки. Мазки готовят на стекле обычным способом, фиксируют в пламени и окрашивают по Граму. При микроскопии отмечают морфологические признаки спорообразующих и неспорообразующих анаэробов (так, наличие крупных грамположительных палочек позволяет заподозрить присутствие в материале клостридий). Пересев из среды накопления делают на специальные плотные питательные среды для анаэробов. Изолированные колонии обычно получают одним из двух нижеописанных способов.

1. Материал со среды накопления засевают штрихами (или шпательем) на чашки с кровяным анаэробным агаром, которые помещают в анаэрогат или другие приспособления для культивирования анаэробов и инкубируют при 37°C 24 ч — 72 ч (метод Цейслера).

2. Выращивают анаэробные микроорганизмы в глубине плотной питательной среды (метод последовательных разведений Вейнберга). Культуру из среды берут пастеровской пипеткой с запаянным концом и переносят последовательно в 1, 2 и 3-ю пробирки с 10 мл ИХН. Затем продолжают производить разведения в пробирках из тонкого стекла диаметром 0,8 см и высотой 18 см, перенося материал в 4, 5 и 6-ю пробирки с расплавленным и охлажденным до 50°C сахарным агаром или средой Вильсона — Блера. После застывания агара посеvy помещают в термостат. Для приготовления среды Вильсона — Блера к 100 мл расплавленного МПА, содержащего 1% глюкозы, добавляют 10 мл 20%-го раствора сульфита натрия и 1 мл 8%-го раствора хлорида железа.

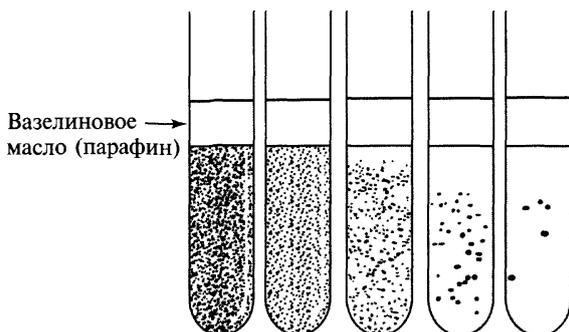


Рис. 1.8. Выделение чистой культуры анаэробов методом Вейнберга: в результате последовательного разведения материала в расплавленном агаре в глубине застывшей среды вырастают изолированные колонии

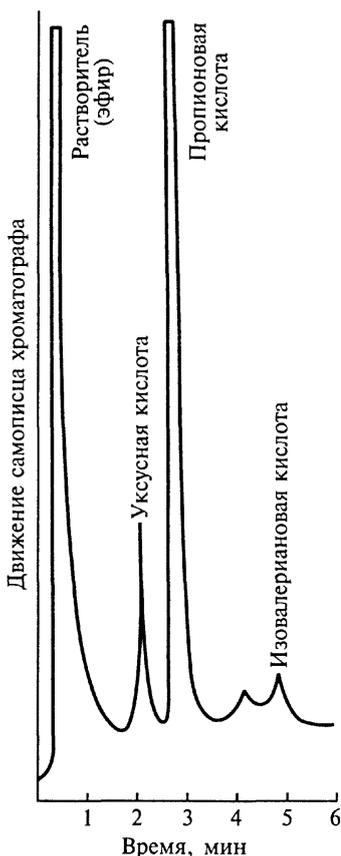


Рис. 1.9. Образец хроматограммы, получаемой для идентификации анаэробов по составу и количеству летучих жирных кислот

На третьем этапе изучают образовавшиеся в чашках изолированные колонии и из наиболее типичных делают мазки. Остаток колонии засевают в среду Китта — Тароцци. Из пробирок с сахарным агаром или средой Вильсона — Блера колонии извлекают стерильной пипеткой или выталкивают столбик агара паром при подогревании дна пробирки (рис. 1.8). Из части колонии готовят мазки, а ее остатки сеют в среду Китта — Тароцци для накопления чистой культуры и инкубируют при 37 °С.

На четвертом этапе выросшую на среде Китта — Тароцци культуру проверяют на чистоту и идентифицируют по морфологическим, культуральным, биохимическим, антигенным и другим свойствам (см. выше). Иногда для идентификации выделенных культур (или прямого обнаружения анаэробов в исследуемом материале) методом газожидкостной хроматографии определяют характерные метаболиты анаэробного «дыхания» — летучие жирные кислоты (рис. 1.9)

На пятом этапе учитывают результаты исследования и анализируют их.

1.2.5. Эпидемиологическое маркирование штаммов

Определение фагочувствительности. Чувствительность к диагностическим фагам используется как один из признаков для определения видовой и родовой принадлежности бактерий. На чашки

с плотной питательной средой засевают газоном исследуемую культуру, посев подсушивают и на его поверхность наносят петлей или пастеровской пипеткой капли фага, соответствующего рабочему разведению, указанному на ампуле. Предварительно проверяют соответствие титра фага тому, что обозначен на этикетке (см. ниже). Посевы помещают в термостат на 12—18 ч. Литическое действие фага учитывают по появлению прозрачных («негативных») пятен. Положительный результат позволяет отнести исследуемые бактерии к соответствующему роду или виду.

Определение фаговаров бактерий. Оно проводится для эпидемиологического анализа и установления источников инфекции при кишечных, стафилококковых, дифтерийной и других инфекциях.

Чашки с 1,5%-м МПА подсушивают, расчерчивают с обратной стороны на квадраты по количеству фагов, входящих в набор, и маркируют. После этого 3—4-часовую бульонную культуру бактерий засевают газоном, подсушивают и на каждый квадрат

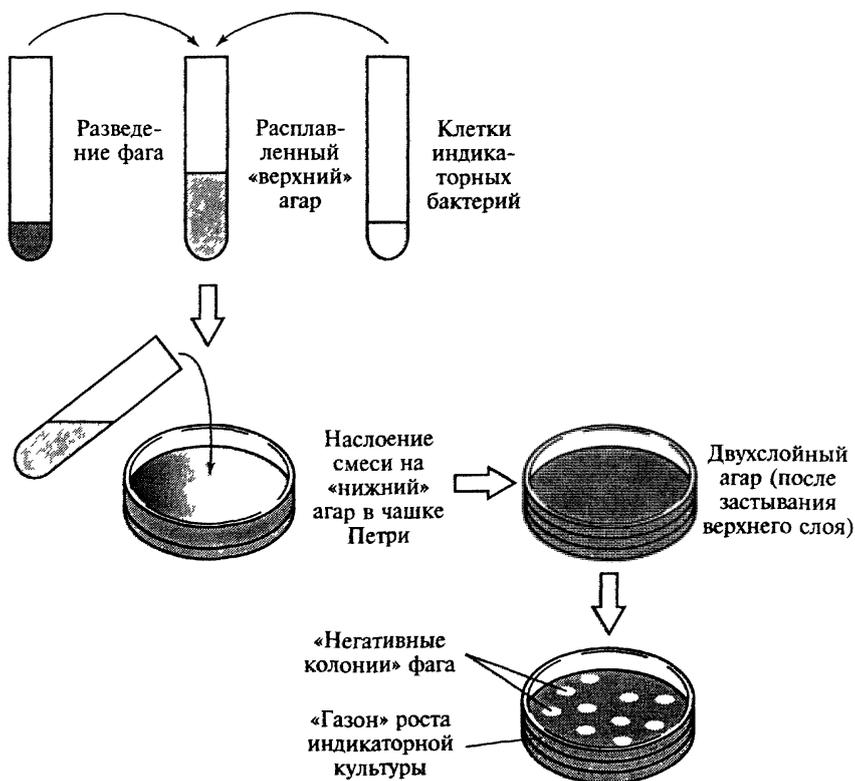


Рис. 1.10. Определение количества фаговых частиц методом агаровых слоев

наносят каплю соответствующего фага в тест-разведении. Посевы помещают в термостат на 12—18 ч, после чего учитывают спектр чувствительности культуры к определенным фагам по литическому действию.

Определение титра бактериофага. Количество фаговых частиц в исследуемом материале обычно определяют методом агаровых слоев по Грациа (рис. 1.10; см. цв. вклейку, рис. 12). Наличие бактериофагов в исследуемом материале является косвенным показателем присутствия соответствующих бактерий. Определение колифагов в воде, например, является важным показателем ее загрязнения бактериями вида *E. coli* и косвенно свидетельствует о присутствии в ней энтеровирусов (см. подразд. 11.1.1).

Определение бактериоциногена. Спектр чувствительности исследуемых штаммов к эталонным бактериоцинам позволяет выяснить источники заболевания и циркуляцию, например, возбудителя дизентерии в коллективах. Чашки с плотной питательной средой расчерчивают, маркируют, подсушивают и уколом сеют на них соответствующие индикаторные культуры — продуценты бактериоцинов. Посевы инкубируют при 37 °С в течение 48 ч. Выросшие макроколонии индикаторных культур инактивируют хлороформом или УФ-лучами. Затем на поверхность агара наливают 3—4 мл 0,7%-го расплавленного МПА, куда после охлаждения до температуры 45 °С внесли 0,2 мл исследуемой 4-часовой бульонной культуры; после застывания агара посевы вновь помещают в термостат на 18—24 ч. Учитывая зоны задержки роста вокруг индикаторных культур, определяют бактериоциноген изучаемых бактерий. Этот метод исследования дает хорошие результаты при использовании свежeweделенных культур.

Определение бактериоциногена. Определение циногенной активности микроорганизмов также проводят для внутривидовой дифференциации микроорганизмов с эпидемиологической целью. На чашки с соответствующей питательной средой сеют уколом суточную агаровую или 4-часовую бульонную исследуемую культуру и помещают на 48 ч в термостат при 37 °С. Инактивируют рост макроколоний хлороформом или УФ-лучами. Затем заливают поверхность агара 4 мл 0,7%-го МПА с 0,2 мл 4-часовой бульонной культуры эталонного штамма, чувствительного к бактериоцинам данного вида. Посев помещают в термостат при температуре 37 °С на сутки. Наличие зон задержки роста эталонных культур свидетельствует о продукции бактериоцинов. Использование эталонных продуцентов бактериоцинов и штаммов, чувствительных к соответствующим бактериоцинам, позволяет установить условный или точный бактериоциноген изучаемой культуры.

Определение плазмидного профиля и других геномных меток. В связи с активной разработкой и широким распространением в последние годы молекулярно-биологических методов исследова-

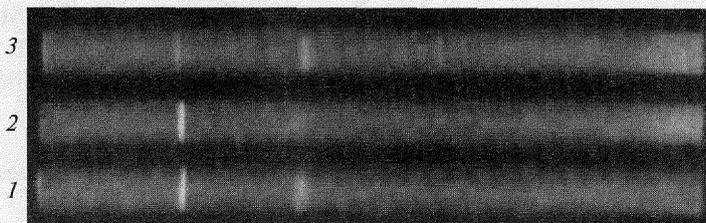


Рис. 1.11. Плазмидный профиль штаммов одного вида (идентичные профили у 1-го и 2-го штаммов)

ния микроорганизмов некоторые из этих методов нашли применение не только в научных исследованиях, но и применяются для эпидемиологического маркирования штаммов. К таким методам можно отнести определение плазмидного или белкового профиля микроорганизмов, рестрикционный анализ, риботипирование, амплификационный анализ. Следует отметить, что точность и надежность эпидемиологического маркирования возрастает в ряду: фенотипический признак — белок — плазмидный геном — хромосомный геном. В любом случае такие маркеры помогают устано-

№ штамма 7 24 4 97 30 102

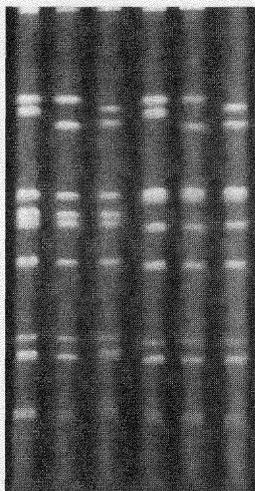


Рис. 1.12. Пульс-гельэлектрофорез рестрикционных фрагментов метициллинрезистентных стафилококков (*MRSA*) из разных источников (профили неидентичны)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

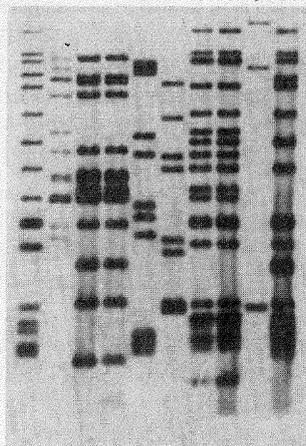


Рис. 1.13. Саузерн-блот рестрикционных фрагментов *Mycobacterium tuberculosis*, имеющих вставку *IS6110* (идентичны 3—4-й и 7—8-й штаммы)

вить идентичность или неидентичность выделенных штаммов, определить в конкретной ситуации источник инфекции и пути заражения, наметить и осуществить адекватные меры профилактики (рис. 1.11 — 1.13).

1.2.6. Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам

Для выбора средств эффективной антимикробной терапии и профилактики важно определять чувствительность выделенных культур возбудителей к антимикробным препаратам. С этой целью применяют несколько методов исследования: диско-диффузионный, метод серийных разведений, метод Е-тестов, пограничных концентраций и другие. Нередко в качестве эпидемиологического маркера используют *резистограмму* штаммов — данные по их устойчивости/чувствительности к химиопрепаратам, что позволяет оценивать идентичность штаммов, выделенных из разных источников.

При использовании антибиотиков на практике важно определять чувствительность к ним клинически значимых штаммов микроорганизмов.

Чувствительность микроорганизмов к антибиотикам и другим ХТП необходимо определять в каждом случае инфекции и периодически — в ходе лечения. Главным показателем чувствительности является *минимальная ингибирующая концентрация* — МИК (мкг/мл), т. е. минимальная концентрация антибиотика, задерживающая рост микроба-возбудителя в стандартном опыте. Значение величины МИК определяют методом *серийных разведений* или методом *диффузии в агар* (дисками или Е-тестами).

В любом случае *критерием чувствительности* является значение величины *терапевтического индекса*

$$T = \text{МИК}/K,$$

где K — концентрация данного антибиотика (мкг/мл) в очаге инфекции (или в крови) при введении терапевтических доз препарата.

Микроб чувствителен, а антибиотик обычно клинически эффективен при $T < 0,3$. Значения K можно найти в специальных таблицах.

На практике величина МИК позволяет отнести испытуемый штамм микроорганизма к одной из 3 категорий: чувствительный, умеренно устойчивый, устойчивый.

Микроорганизм считают *чувствительным*, если у него нет механизмов резистентности к данному антимикробному средству и при лечении стандартными дозами инфекции, вызванной данным микроорганизмом, отмечается хорошая терапевтическая эф-

фективность. *Устойчивым* к антимикробному средству считают микроорганизм, если он имеет механизмы резистентности к данному препарату и при лечении инфекций, вызванных этим микроорганизмом, нет клинического эффекта даже при использовании максимальных терапевтических доз этого препарата. Микроорганизм относят к *умеренно устойчивым*, если по своей чувствительности он занимает промежуточное значение между чувствительными и устойчивыми штаммами и при лечении инфекций, вызванных данным возбудителем, хорошая клиническая эффективность наблюдается только при использовании высоких терапевтических доз препарата (или при локализации процесса в местах концентрации антимикробного средства, например в моче при мочевых инфекциях).

Выбор антибиотика для лечения зависит от чувствительности возбудителя, возможности достижения очага инфекции без снижения активности антибиотика и от его побочного (нежелательного) действия.

Метод серийных разведений. Методом *серийных разведений* МИК определяют по минимальной концентрации антибиотика, задерживающей видимый рост микроба в пробирках или чашках с питательной средой, содержащих убывающие концентрации антибиотика. Например, для определения МИК тетрациклина в отношении культуры *Staphylococcus aureus*, выделенной от больного, в

Таблица 1.3

Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам (МИК, мкг/мл) методом серийных разведений в бульоне

Ингредиенты	Номер опытной пробирки (конечная концентрация антибиотика), мкг/мл					Контроль		
	1 (64)	2 (32)	3 (16)	4 (8)	5 (4)	культуры	бульона	антибиотика
1. Бульон, мл	–	1	1	1	1	1	1	–
2. Раствор антибиотика (64 мкг/мл), мл	1	1	–	–	–	–	–	1
3. Испытуемая культура (стандартизованная суспензия)	2	2	2	2	2	2	–	–
<i>Инкубирование в оптимальных для культуры условиях 18–24 ч</i>								
Пример учета	–	–	–	+	+	+	–	–
Интерпретация результата: МИК тетрациклина в отношении испытуемой культуры — 16 мкг/мл								

ряду пробирок готовят двукратно убывающие концентрации этого антибиотика в стандартном питательном бульоне, для чего содержимое пробирки перемешивается и переносится 1 мл из 2-й пробирки в 3-ю, из 3-й — в 4-ю и т.д., а из последней пробирки 1 мл удаляется (табл. 1.3).

Учетным признаком при этом является наличие/отсутствие мутности бульона в пробирках. В контроле культуры должна быть мутность, в остальных контролях — нет. Величина МИК соответствует той минимальной концентрации, при которой отсутствует мутность (бульон в пробирке прозрачен). Так, если бульон будет мутным в 4-й и 5-й опытных пробирках, МИК тетрациклина = 16 мкг/мл. Известно, что величина К тетрациклина при введении среднетерапевтических доз — 2 мкг/мл (при использовании максимальных доз — 10 мкг/мл). Следовательно, в данном случае терапевтический индекс будет равен $T = 16/2 = 8 (> 0,3)$, т.е. возбудитель устойчив к антибиотику и лечение тетрациклином не даст антимикробного эффекта в отношении *Staphylococcus aureus* у данного больного даже при введении максимальных доз ($T = 16/10 = 1,6$). Метод серийных разведений считается наиболее точным, но относительно трудоемким.

Диско-диффузионный метод. При определении чувствительности методом диффузии в агар чистую культуру возбудителя засевают «газоном» на питательный агар в чашке, например, тампоном, смоченном в стандартизованной (10^8 КОЕ/мл) суспензии микроорганизма. Затем на поверхность агара укладывают стандартные бумажные диски, пропитанные антибиотиками, которые диффундируют в агар, создавая градиент концентрации. На чашку диаметром 90 мм равномерно укладывают не более шести дисков с определенным количеством антибиотика. После инкубирования в термостате измеряют диаметры зон задержки роста вокруг дисков и по специальным таблицам определяют степень чувствительности к тому или иному антибиотику (см. цв. вклейку, рис. 13). Поскольку опыт диффузии ставят в стандартных условиях (состав и количество среды, количество засеваемых микробов, температура и сроки инкубирования, стандартные диски и др.), каждому значению диаметра зоны вокруг диска с антибиотиком соответствует определенное значение МИК. Исходя из этих значений, для каждого антибиотика рассчитаны величины терапевтического индекса, что позволяет по диаметру зоны определить степень чувствительности к тому или иному антибиотику: чувствительные (*S*), умеренно устойчивые (*I*) и устойчивые (*R*). К категории *S* (от англ. *sensitive*, чувствительный) относят те, для которых использование средних терапевтических доз будет достаточным для трехкратного превышения МИК. В категорию *I* (от англ. *intermediate*, промежуточный) относят те микробы, для подавления которых потребуются максимальные терапевтические дозы. Категорию *R*

(от англ. *resistant*, устойчивый) составляют те микроорганизмы, в отношении которых данный антибиотик будет неэффективным *in vivo* (см. выше).

Другие методы. Промежуточное положение между двумя вышеописанными методами занимает метод определения чувствительности с помощью Е-тестов. Последние представляют собой бумажные полоски, пропитанные не одной, а рядом убывающих концентраций определенного антибиотика (128, 64, 32, 16, 8, 4, ..., мкг/мл). Е-тесты, как и диски при диско-диффузионном методе, укладывают на поверхность стандартного питательного агара, засеянного испытуемой культурой в виде «газона». После инкубирования вокруг полоски формируется эллипсовидная зона задержки роста, которая сужается в области малых концентраций и «пересекает» полоску на уровне, соответствующем величине МИК (рис. 1.14).

При массовых исследованиях используют автоматизированные методы определения чувствительности к антибиотикам. Это позволяет упростить и ускорить проведение исследования, а также снизить его стоимость. Наиболее часто применяют *методы серийных разведений в планшетах* и *пограничных концентраций* (микрометоды). В первом случае, как правило, используют готовые стерильные полистироловые 96-луночные планшеты, в лунки которых внесены и лиофильно высушены убывающие концентрации антибиотиков в бульоне. После вскрытия планшета стандартизованную суспензию испытуемой культуры в одинаковой дозе (например, 0,1 мл) асептически вносят в соответствующие ряды лунок, закрывают крышкой и инкубируют при оптимальной температуре. Среда при этом восстанавливается, что позволяет после инкубирования планшета отметить рост (помутнение бульона) в тех лунках, где антибиотик не действует (см. цв. вклейку, рис. 13). При помутнении бульона в контроле культуры и опытных лунках определяют величину МИК. Учет можно вести как визуально, так и с помощью специальных микробиологических анализаторов. В этих приборах имеется возможность автоматизации основных действий: внесения культуры, инкубирования, встряхивания, определения оптической плотности (степени мутности) жидкости в каждой лунке, графическое отображение результатов (в том числе в динамике), определение степени чувствительности и печать протокола исследования.

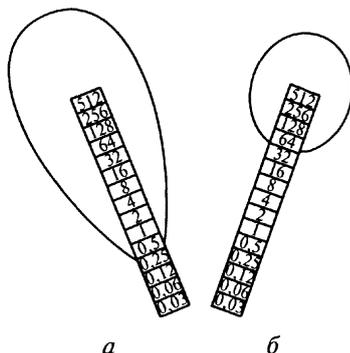


Рис. 1.14. Е-тест. МИК антибиотика:

а — 0,5 мкг/мл; б — 64 мкг/мл

Метод пограничных концентраций можно считать усеченным методом серийных разведений. В соответствии с ним испытуемую культуру вносят только в две лунки (пробирки), где находятся высокая (C) и низкая (c) концентрации антибиотика. Концентрация C соответствует границе между устойчивыми и умеренно устойчивыми штаммами, а концентрация c — границе между умеренно устойчивыми и чувствительными штаммами. Если после инкубирования рост отсутствует в обеих лунках, штамм относят к чувствительным, если только в лунке с концентрацией C — к умеренно устойчивым штаммам, а если в обеих лунках имеется рост, штамм относят к устойчивым.

Важными условиями корректного определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам являются:

использование только чистых культур и соблюдение правил асептики;

применение стандартных питательных сред, соответствующих питательным потребностям испытуемого микроорганизма (среда Мюллера—Хинтона, агар АГВ, среда НТМ и др.);

внесение испытуемой культуры в стандартной дозе и соблюдение установленного соотношения инокулюм/среда;

правильный режим инкубирования и метод учета.

Учитывая то, что признак подвержен фенотипическим и генотипическим изменениям, чувствительность к антибиотикам желательно проверять у свежeweделенных культур, выделенных из материала до начала антибиотикотерапии, и повторять исследование с культурами, выделенными в ходе лечения.

В последние годы в практике стали применять ПЦР для выявления у микробов специфических генов, ответственных за формирование лекарственной устойчивости (геноиндикация антибиотикоустойчивых культур).

1.3. Биологическое исследование

1.3.1. Выбор и характеристика экспериментальных животных

Биологическое исследование заключается в заражении животных для выделения культуры микроорганизмов возбудителей заболевания и в последующем изучении их вирулентности. Биопробу применяют также для определения некоторых микробных токсинов (см. подразд. 2.6.4, 2.6.5).

Выбор экспериментальных животных определяется целью работы. Наиболее часто используют для заражения белых мышей, морских свинок и кроликов. Они восприимчивы к возбудителям различных инфекционных заболеваний человека, удобны в обра-

щении и легко размножаются в питомниках. Реже заражают хомяков, хорьков, хлопковых крыс, обезьян, птиц и др.

В специальных, особенно вирусологических, лабораториях для заражения используют генетически охарактеризованных, так называемых линейных, животных (мышей, кроликов, морских свинок и др.), выведенных путем родственного скрещивания.

Работая с экспериментальными животными, необходимо помнить о существовании у них спонтанных бактериальных и вирусных заболеваний, а также латентных инфекций, активизирующихся в результате дополнительного искусственного заражения, что затрудняет выделение чистой культуры возбудителя и установление его этиологической роли. Этому недостатка лишены гнотобиоты (животные без аутомикрофлоры) и свободные от патогенной микрофлоры (СПФ) животные. В настоящее время используются гнотобиоты и СПФ животные и птицы (цыплята, крысы, мыши, морские свинки, поросята и др.).

Лабораторные животные характеризуются видовой, возрастной и индивидуальной чувствительностью к микроорганизмам. В связи с этим при выборе животных для исследований необходимо учитывать их вид и возраст. У беспородных животных чувствительность характеризуется значительными индивидуальными колебаниями. Использование линейных животных, обладающих определенной постоянной восприимчивостью к микроорганизмам, позволяет исключить индивидуальные колебания чувствительности и получить воспроизводимые результаты.

Животных заражают для выделения чистой культуры возбудителя в тех случаях, когда нельзя получить ее другими способами (например, при загрязнении исследуемых объектов посторонней микрофлорой, подавляющей рост возбудителя, при незначительном содержании микроорганизмов или переходе их в фильтрующиеся формы). Так, при исследовании разложившихся трупов грызунов на присутствие возбудителей чумы заражают (суспензией органов, кровью) морских свинок, которые погибают через 3—7 дней при явлениях септицемии (размножение микроорганизмов в крови). Из крови и внутренних органов морской свинки легко выделяют чистую культуру возбудителя.

Заражение восприимчивых животных для воспроизведения инфекционного процесса применяется при заболеваниях, вызываемых риккетсиями и вирусами. Инъекция мышам материала, например, от большого клещевым энцефалитом обуславливает возникновение у них параличей и летальный исход.

Для определения вирулентности возбудителей чумы, туляремии, ботулизма, сибирской язвы и некоторых вирусных заболеваний культуры, выделенные от больных, вводят белым мышам, морским свинкам, мышам-сосункам и другим экспериментальным животным.

1.3.2. Подготовка экспериментальных животных

Отбор животных. Опыты проводят только на здоровых животных, имеющих гладкую блестящую шерсть, активно двигающихся и хорошо поедающих корм. Желательно использовать животных одинакового возраста, пола, массы. Перед заражением животных взвешивают и измеряют у них температуру: у кроликов и морских свинок изогнутым под углом термометром, который вводят в прямую кишку, а у мышей — с помощью специальной аппаратуры. Взвешивание и измерение температуры производят не только до заражения, но и в течение всего опыта. Нормальная температура у лабораторных животных колеблется в следующих пределах: у морских свинок — 37,8—39,5 °С, у кроликов — 37,7—38,8 °С, у мышей — 37—39 °С.

Маркировка. Маркировка (метка) мелких животных (например, мышей) заключается в окрашивании различных участков шерсти растворами анилиновых красителей, пикриновой кислоты или в нанесении маркерных знаков на уши. В протоколе опыта отмечают номер или метку каждого животного. Для маркировки морских свинок отмечают характер рисунка шерсти в виде схемы.

Место введения материала готовят накануне проведения опыта, чтобы к моменту введения исчезло раздражение кожи. На ограниченных участках шерсть выстригают, выбривают (выщипывание волос не рекомендуется) или удаляют с помощью депиляторов. Для депиляции смесь одной части бария сульфата и двух частей оксида цинка разводят водой до получения массы в виде густой сметаны и накладывают эту массу на 3 мин на шерсть, после чего удаляют ее вместе с шерстью, а кожу тщательно промывают водой. Непосредственно перед инъекцией кожу дезинфицируют спиртом или иодной настойкой. У мелких животных шерсть не удаляют, а обрабатывают стерильным ИХН.

Фиксация животных. Неподвижность животного во время опыта достигается применением специальных станков, досок-фиксаторов, ящиков или приемов, с помощью которых помощник фиксирует животное в нужном положении.

Для проведения подкожных и внутрикожных инъекций кроликов и морских свинок кладут на бок, одной рукой держат задние конечности, а другой обхватывают грудную клетку, вводя пальцы в подмышечные впадины.

При взятии крови из сердца животных или введении материала их кладут на спину, растягивая передние конечности в стороны и немного вверх (рис. 1.15).

Мышь берут левой рукой за хвост, опускают на стол, туловище быстро прижимают к столу двумя пальцами правой руки и, передвигая их по спине, захватывают кожу над головой. Животное слегка растягивают. Чтобы держать мышь без помощника (одной рукой),

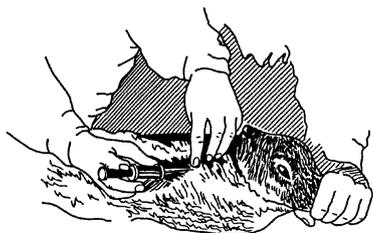


Рис. 1.15. Взятие крови из сердца кролика

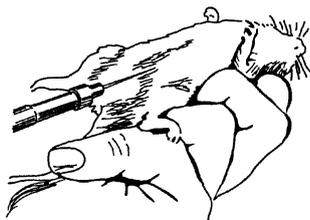


Рис. 1.16. Заражение мышцы внутрибрюшинным способом

кожу головы фиксируют пальцами левой руки, а хвост — мизинцем и ладонью той же руки (рис. 1.16).

Инструменты, необходимые для заражения животных (шприцы в разобранном виде, иглы, пинцеты и др.), кипятят в течение 30 мин. Патологический материал или взвесь микроорганизмов набирают в шприц над кюветой с дезинфицирующим раствором. Для предупреждения разбрызгивания при удалении пузырьков воздуха иглу вводят в стерильную вату, поворачивают шприц иглой вверх и выталкивают воздух вместе с небольшим количеством материала. Загрязненную вату снимают пинцетом и погружают в дезинфицирующий раствор. После заражения шприц и инструменты вновь кипятят 30 мин и более в зависимости от устойчивости микроорганизмов в материале.

1.3.3. Способы заражения

При экспериментальном заражении животных изучаемый материал вводят различными путями: наочно, подкожно, внутрикожно, внутримышечно, внутривенно, через рот и в различные органы и ткани — головной мозг, слизистую оболочку, в дыхательные пути и др. Способ введения материала зависит от средства возбудителя к определенным тканям организма (тропизма), а объем инокулюма — от метода его введения и вида животных (табл. 1.4).

Заражение через рот (per os) осуществляется путем добавления инфицирующего материала к корму или питьевой воде. Перед заражением животных не кормят в течение суток. Заражение можно производить с помощью зонда или эластичного катетера, шприца и иглы, сточенной под прямым углом или с оливкой на конце.

Подкожное заражение проводят следующим образом. Двумя пальцами левой руки захватывают кожу и в образовавшуюся складку вводят иглу (рис. 1.17). Проколов кожу, слегка меняют направление иглы, чтобы после ее извлечения материал не выливался, затем вводят содержимое шприца, надавливая на поршень правой

Основные способы заражения лабораторных животных

Путь введения инфекционного материала	Объем инокулюма, мл		
	Мышь	Морская свинка	Кролик
В мозг	0,03 (новорожденным — 0,01)	0,1 (трепанация)	0,2—0,3 (трепанация)
Внутрикожно	0,1—0,2	0,1—0,2	0,1—0,2
В брюшную полость	До 1,0 (новорожденным — 0,03)	до 5,0	до 10,0
Внутривенно	до 1,0	до 2,0	до 5,0
Через нос	0,03—0,05	до 2,0	до 2,0
Подкожно	До 0,5 (новорожденным — 0,03)	3,0—5,0	3,0—5,0
Внутримышечно	0,25 (новорожденным — 0,03)	2,0	5,0
В переднюю камеру глаза	—	0,05—0,1	0,05—0,1
На скарифицированную роговицу	0,05—0,1	—	0,1—0,2

рукой, и быстро извлекают иглу, предварительно положив на нее вату, смоченную в спирте. Кроликам и морским свинкам подкожные инъекции делают на спине и животе, а крысам и мышам — на спине, у корня хвоста.

Внутрикожное заражение требует более тщательного удаления шерсти животного. Кожу растягивают двумя пальцами левой руки

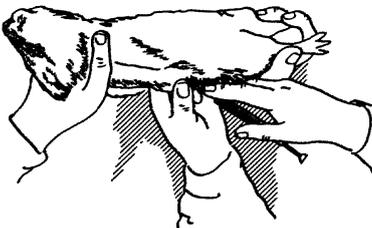


Рис. 1.17. Подкожное заражение морской свинки

и вводят тонкую иглу под острым углом отверстием кверху в поверхностный слой эпидермиса так, чтобы конец ее просвечивал через кожу. При правильном введении жидкости появляется четко ограниченное возвышение, не исчезающее в течение 3—5 мин. Кожа над ним приобретает вид лимонной корочки. Внутрикожно вводят не более 0,1—0,2 мл жидкости.

Накожное заражение — способ, при котором исследуемый материал втирают стеклянной палочкой в неповрежденную или скарифицированную кожу. Скарификацию (насечки) делают скальпелем или специальным пером. Материал втирают в местах, недоступных для слизывания (на спине, ближе к голове).

Внутрибрюшинное заражение проводят так, чтобы инфицирующий материал попал в нижний отдел брюшной полости слева.

При этом животное держат головой вниз, чтобы кишечник переместился к диафрагме. Кожу прокалывают иглой под острым углом, затем устанавливают шприц по отношению к ней под прямым углом, прокалывают толчкообразным движением брюшную стенку и вводят содержимое шприца.

Внутривенное заражение может отличаться по методике, что зависит от вида животного. Кроликам инфицирующий материал вводят в краевую вену уха. Удалив шерсть вдоль наружного края уха, для лучшего кровенаполнения зажимают основание его, растирают, поколачивают щелчками или смазывают ксилолом. Иглу вводят в вену под острым углом (рис. 1.18) по направлению тока крови, перед инъекцией сдавливание прекращают. При легком надавливании на поршень шприца жидкость свободно поступает в кровь. Если игла находится не в вене, жидкость поступает с трудом, образуя вздутие в месте введения. В таких случаях следует сделать второй укол ближе к основанию уха. Перед извлечением иглы вену сдавливают стерильной сухой ватой и не снимают ее до прекращения кровотечения,

Мышам инъекции делают в хвостовые вены. Помощник держит мышь и сдавливает корень хвоста. Для более полного кровенаполнения сосудов хвост погружают на 1—2 мин в воду, нагретую до 50 °С. Прокол лучше делать у основания хвоста, где сосуды расположены поверхностнее, а вены шире. Во время инъекции сдавливание у корня хвоста прекращают.

Морским свинкам материал вводят в вену на внутренней поверхности бедра, предварительно разрезав и отсепарировав кожу. После инъекции на рану накладывают швы.

Внутрисердечное заражение по технике не отличается от *взятия крови из сердца*. Кролика или морскую свинку фиксируют, как описано выше, при этом голова животного должна находиться слева от экспериментатора. Шерсть с левой стороны груди выстригают, кожу дезинфицируют спиртом и иодом. Большим паль-

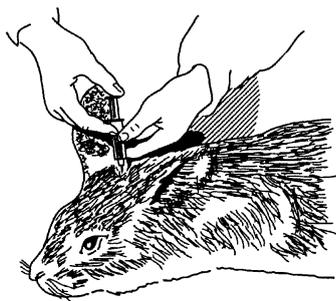


Рис. 1.18. Внутривенное заражение кролика

цем левой руки экспериментатор слегка надавливает на правую сторону грудной клетки животного, а указательным пальцем нащупывает толчок сердца и одновременно определяет положение ребер. Иглу вводят в межреберный промежуток в месте толчка сердца перпендикулярно грудной клетке. Если игла находится в полости сердца, в шприц толчками поступает кровь. В случае неудачи иглу извлекают и делают прокол вновь, тщательно проверив локализацию толчка сердца (нельзя изменять направление иглы, не извлекая ее, так как можно повредить мышцу сердца). Затем место прокола дезинфицируют спиртовым раствором иода. Обычно после взятия большого количества крови животному вводят под кожу такое же количество стерильного ИХН.

Заражение через нос производят за защитным стеклом. Материал вводят под наркозом (эфирным), для чего животных (крыс, мышей) помещают в плотно закрываемую банку, на дно которой помещают вату, смоченную эфиром. При оптимальном наркозе у животных наблюдается глубокое ритмичное дыхание. Материал вводят в каждый носовой ход при помощи шприца с надетой на него иглой или пастеровской пипетки. При неглубоком наркозе у животных сохраняется чихательный рефлекс, и материал может быть разбрызган, что создает опасность заражения экспериментатора. При слишком глубоком наркозе дыхание животных поверхностное, и материал не втягивается в носовые ходы.

Заражение в переднюю камеру глаза — нечасто применяемый способ. Животное фиксируют спиной кверху. В конъюнктивальную полость закапывают 1—2 капли 2%-го раствора новокаина или другого анестетика. Об анестезии глаза свидетельствует исчезновение роговичного рефлекса. Помощник фиксирует голову кролика к поверхности стола на боку и тупым концом пинцета выводит глазное яблоко из глазницы со стороны ее внутреннего угла.левой рукой захватывают глазное яблоко за конъюнктиву с помощью глазного пинцета, а тонкой иглой, находящейся в правой руке, прокалывают роговицу параллельно радужной оболочке. Иглу медленно продвигают к центру роговицы, пока в ее просвете не окажется жидкость. После истечения 2—3 капель жидкости на иглу надевают шприц и в переднюю камеру глаза вводят 0,05—0,1 мл инфицирующего материала.

Заражение в мозг проводят с использованием различных животных. Мышей и крыс фиксируют большим и указательным пальцами левой руки за кожу головы, а мизинцем и безымянным пальцем — за хвост. Череп прокалывают иглой, надетой на туберкулиновый шприц, латеральнее средней линии после предварительной обработки кожи 3%-м спиртовым раствором иода. Кроликам и морским свинкам материал вводят через суборбитальную борозду. Животных фиксируют, кожу освобождают от волос и обрабатывают 3%-м спиртовым раствором иода, прощупывают бороз-

ду, несколько смещают кожу и прокалывают кость у внутреннего угла глаза укороченной иглой (длиной 4—5 мм), направляя ее к срединной линии и вверх. Морских свинок и кроликов можно заражать также через трепанационное отверстие.

Иногда для увеличения вероятности выделения возбудителя одно и то же животное (взрослое или сосунок) заражают одновременно двумя или тремя способами (в мозг, в брюшную полость, внутримышечно).

При определении результатов опыта животных, павших в течение 24 ч после введения материала, не учитывают (травматический отход).

Зараженных животных содержат в лаборатории или в специальном помещении, расположенном в отдалении от питомника. После заражения их помещают в клетки или высокие стеклянные банки, закрывающиеся сверху металлической сеткой. Помещение должно быть теплым и сухим. Особенно чувствительны к холоду мыши; морские свинки чувствительны, помимо холода, к повышенной влажности воздуха. Животные должны регулярно получать пищу с достаточным количеством витаминов, воду; за их состоянием нужно систематически следить.

Следует помнить, что самка может поедать сосунков в том случае, если от них будет исходить запах (иода, спирта, рук экспериментатора), а также при недостаточном количестве воды для питья и болезни сосунков. Поэтому при заражении сосунков следует работать в перчатках и следить за постоянным наличием питьевой воды. Ежедневное наблюдение позволяет своевременно изъять заболевших животных для вскрытия и дальнейших исследований.

1.3.4. Вскрытие животных

Вскрытие погибших, а иногда и заболевших животных проводится для извлечения пораженных органов, обнаружения возбудителя, вызвавшего гибель животного, выделения чистой культуры возбудителя и определения места его локализации. Заболевших животных забивают с помощью эфирного наркоза или воздушной эмболии.

При вскрытии трупа животного необходимо соблюдать ряд условий. Вскрытие следует производить как можно скорее после гибели животного, так как кишечная микрофлора быстро проникает в ткани, кровь и органы. При комнатной температуре это происходит через 10—18 ч, а при температуре холодильника — через 20—22 ч, поэтому труп до вскрытия сохраняют на холоде.

Животных вскрывают с соблюдением правил асептики, используя только стерильные инструменты, которые меняют при вскрытии каждой полости, а также органа.

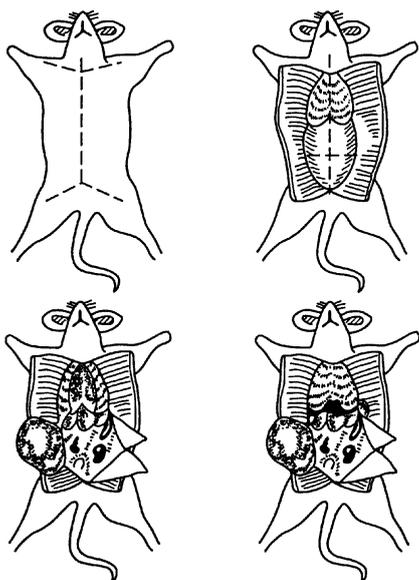


Рис. 1.19. Фиксация и вскрытие трупа белой мыши

шерсти и изменение цвета кожи (при анаэробной инфекции) и т. п. Затем труп животного фиксируют к доске препаровальными иглами или острыми гвоздями (рис. 1.19).

Перед вскрытием инструменты переносят из стерилизатора в банку со спиртом, а перед применением их обжигают в пламени горелки.

Вскрытие наружных покровов начинают с продольного разреза кожи от нижней челюсти до лобка. Кожу отсепааровывают, делают надрезы по направлению к конечностям и отбрасывают ее лоскуты в стороны, обнажая всю переднюю поверхность туловища животного. Отмечают состояние подкожной клетчатки и лимфатических узлов и при наличии в них изменений делают посевы в питательные среды и препараты-отпечатки (прикасаясь предметным стеклом к месту разреза). Использованные инструменты погружают в дезинфицирующий раствор.

При вскрытии грудной полости всю область, освобожденную от кожи, смачивают спиртом и поджигают. Пинцетом захватывают мечевидный отросток, делают поперечный разрез под ним и два продольных, перерезая ребра в местах их соединения с хрящами. Полученный лоскут в виде треугольника (основание у диафрагмы, а вершина у ключицы) откидывают вверх и изучают состояние органов грудной клетки, отмечают наличие экссудата,

Перед вскрытием шерсть животного смачивают дезинфицирующим раствором для предотвращения заражения работающих и инфицирования окружающих предметов. Трупы животных, павших от чумы, погружают в керосин для инактивирования эктопаразитов — переносчиков возбудителей чумы. Трупы вскрывают на хорошо выстроганной окрашенной доске, помещенной в металлическую кювету с дезинфицирующим раствором.

Результаты вскрытия четко и подробно отражают в протоколе, указав дату заражения и характер введенного материала.

Труп животного кладут на спину, растягивают в стороны лапы, осматривают наружные покровы, отмечая наличие язв (при туберкулезе), выпадение

делают посев крови и препараты-отпечатки из ткани легких. Кровь из сердца берут пастеровской пипеткой. Предварительно разрезают эпикард и прижигают поверхность мышцы сердца, прикладывая к ней раскаленный скальпель или пинцет, затем капилляр пипетки вводят в область желудочка или предсердия животного; кровь, поступившую в капилляр, сеют на питательные среды, а из остатка ее делают мазки.

Вскрытие брюшной полости производят осторожно, чтобы не захватить петлю кишки. Для этого приподнимают пинцетом брюшную стенку, делают ножницами продольные разрезы от диафрагмы до лобка и два поперечных разреза по направлению к конечностям. Отвернув мышечные лоскуты, исследуют состояние органов брюшной полости, обращая особое внимание на величину, цвет и консистенцию селезенки, печени, надпочечников.

Затем делают посевы из ткани селезенки, печени, брыжеечных лимфатических узлов и экссудата. Поверхность органа прижигают раскаленным скальпелем и в этом участке производят разрез. В месте разреза петлей делают соскоб и сеют в питательные среды. Для приготовления мазка вырезают небольшой кусочек ткани, берут его пинцетом и прикасаются к поверхности предметного стекла (препарат-отпечаток) или распределяют по нему тонким слоем.

После вскрытия труп животного сжигают, стерилизуют или кипятят в течение 1—2 ч в растворе фенола. Все инструменты, кювету и доску для фиксации обрабатывают дезинфицирующими растворами или стерилизуют.

Трупы животных, павших от особо опасных инфекций, вскрывают в специальных помещениях с соблюдением особых мер предосторожности (см. подразд. 12.2).

Выделение чистой культуры аэробных и анаэробных микроорганизмов и их идентификацию проводят по общепринятым правилам (см. подразд. 1.2.3 и 1.2.4).

1.3.5. Определение вирулентности микроорганизмов

При изучении свойств микроорганизмов в ряде случаев определяют их вирулентность (степень патогенности). Это необходимо для характеристики возбудителей инфекций, выделенных от больных, микробоносителей и из внешней среды, установления остаточной вирулентности живых вакцин, выявления напряженности иммунитета у животных и т. д.

Вирулентность выражают количественно: в величине летальной или инфицирующей дозы, индексах адгезии, инвазии, цитотоксичности и других показателях степени болезнетворности изучаемого штамма. Например, *Dlm* (*dosis letalis minima*, минимальная летальная доза) — минимальное количество микроорганизмов, вызывающее гибель 95 % животных определенного вида в группе,

LD_{50} (половинная летальная доза) — количество микроорганизмов, вызывающее гибель 50 % зараженных животных в группе. LD_{50} является более достоверным показателем вирулентности, так как в меньшей степени зависит от индивидуальной чувствительности животных.

При определении LD_{50} вид, пол, вес животных, условия содержания, кормления должны быть строго стандартизованными. Из культуры бактерий, вирусов или токсина делают 10-кратные разведения, каждое из которых вводят не менее чем 4—6 животным. Через определенный срок отмечают количество погибших животных в каждой группе и вычисляют LD_{50} . Для вычисления LD_{50} существует несколько методов: Рида и Менча, Блисса (метод пробитов), Кербера в модификации И. П. Ашмарина и др. С этими методами можно познакомиться в специальных руководствах по биометрии.

В настоящее время для определения вирулентности стараются не использовать лабораторных животных (в связи с высокой стоимостью исследования и по этическим соображениям). С этой целью широко применяются другие методы определения вирулентности: заражение культур тканей, куриных эмбрионов, культур простейших, а также выявление отдельных факторов патогенности или их генетических детерминант (см. подразд. 1.7 и 3.1).

Для выявления таких важных свойств возбудителя, как адгезивность, инвазивность, цитотоксичность, испытываемой культу-

рой микроорганизма в строго определенном количественном соотношении заражают монослой стандартной культуры ткани (*HeLa*, *Hep-2*, *Vero* и др.). Через определенные периоды (2, 5, 24 ч) контакта при оптимальных условиях для роста культуры ткани культуральную жидкость выливают, монослой отмывают от несвязавшихся с ним микробных частиц, фиксируют, окрашивают и микроскопируют. При этом просматривают 200—300 клеток монослоя и отмечают их состояние (выявляют признаки цитопатического действия), подсчитывают количество внутри- и/или внеклеточно расположенных (адгезированных) микроорганизмов и вычисляют соответствующие индексы: индекс адгезии — среднее количество микробных клеток, прилипших

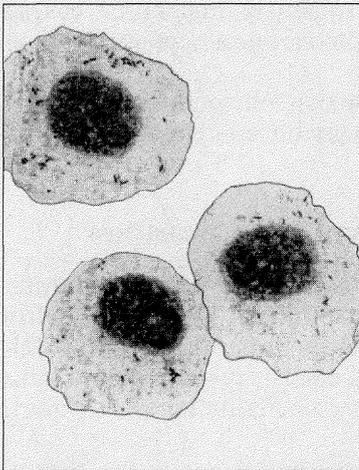


Рис. 1.20. Определение вирулентности на культуре ткани: в цитоплазме эукариотических клеток видны клетки инвазивных *Yersinia enterocolitica*

к одной эукариотической клетке, индекс цитотоксичности — доля (%) клеток монослоя с признаками цитопатического действия и т. д. (рис. 1.20).

Многие патогенные свойства микроорганизмов коррелируют с легко выявляемыми *in vitro* фенотипическими признаками, получившими название *маркеры вирулентности*. В ряде случаев для определения вирулентности достаточно обнаружить такие признаки у выделенной культуры. Так, у энтеропатогенных иерсиний (возбудителей иерсиниоза и псевдотуберкулеза) определяют кальций-зависимость роста при 37 °С (на кальцийдефицитной среде), у возбудителей кишечных и мочевых эшерихиозов — соответствующие адгезины (в реакции агглютинации), у дифтерийной палочки — экзотоксин (в реакции иммунодиффузии) и т. д.

1.4. Серологическое исследование

Основу серологического исследования составляет иммунологическая реакция — специфическое взаимодействие антитела (АТ) с антигеном (АГ). Эту реакцию называют серологической, так как для ее постановки используют сыворотку (*serum*), содержащую антитела.

Серологические реакции применяются в двух направлениях:

для идентификации неизвестной антигенной структуры, т. е. для определения неизвестных АГ бактерий, вирусов, токсинов и т. п. с помощью известных АТ, содержащихся в *иммунных диагностических сыворотках*;

для серологической диагностики, т. е. для определения неизвестных АТ (в исследуемой сыворотке крови) с помощью известного АГ, — *диагностикума*, приготовленного, как правило, из эталонных штаммов микробов.

Таким образом, в серологических реакциях один из двух основных компонентов (АГ или АТ) всегда должен быть известным.

К основным видам серологических реакций относятся реакции агглютинации, преципитации, лизиса, нейтрализации, реакции с использованием метки, а также их различные модификации.

1.4.1. Реакция агглютинации

Агглютинацией называется склеивание микроорганизмов, эритроцитов или других клеток при действии на них специфических АТ в присутствии электролита. Ориентировочная и развернутая РА широко применяются для диагностики многих инфекционных заболеваний.

Для проведения РА необходимы три компонента: 1) АГ (агглютиноген); 2) АТ (агглютинин); 3) ИХН.

Ориентировочная реакция агглютинации. Ориентировочную РА проводят на предметных стеклах. Для этого на обезжиренное стекло наносят пастеровской пипеткой несколько капель сыворотки в небольших (1 : 10 — 1 : 20) разведениях и каплю ИХН для контроля. Для идентификации в каждую каплю сыворотки, а также в каплю контроля вносят петлю суточной культуры испытуемого микроорганизма, взятой с поверхности плотной питательной среды. Для выявления АТ в исследуемой сыворотке крови в нее, как и в каплю ИХН, пастеровской пипеткой вводят по 1 капле взвеси известных микроорганизмов (диагностикума). Внесенную культуру тщательно перемешивают до получения суспензии.

Реакция происходит при комнатной температуре. Результаты реакции учитывают невооруженным глазом через 2—5 мин, иногда для этого используют лупу (5×). Если предметные стекла поместить во влажную закрытую камеру, чтобы исключить испарение капель, то результаты реакции можно учитывать и позже.

При положительной реакции в капле с сывороткой отмечают появление хлопьев (крупных или мелких), хорошо видимых на темном фоне при покачивании предметного стекла. При отрицательной — жидкость остается равномерно мутной, как и в контроле (рис. 1.21).

В тех случаях, когда количество микроорганизмов невелико и учесть результаты реакции трудно, каплю сыворотки с внесенной в нее культурой высушивают, препарат фиксируют, окрашивают фуксином Пфейффера и микроскопируют. При положительной реакции все поле зрения свободно от микроорганизмов, только в отдельных участках наблюдается их скопление. При отрицательной реакции микроорганизмы равномерно распределены по всему полю зрения. Эта реакция получила название микроагглютинации.

Развернутая реакция агглютинации. Развернутую РА ставят для серологической диагностики инфекционных заболеваний — брюшного тифа и паратифов (реакция Видаля), сыпного тифа (реакция Вейгля), бруцеллеза (реакции Райта), туляремии и других — с це-

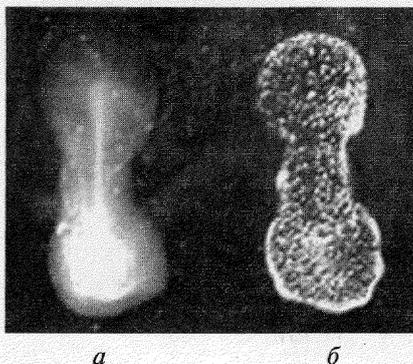


Рис. 1.21. Реакция агглютинации на стекле с диагностической сывороткой СВИ для выявления плазмид-ассоциированных антигенов вирулентных *Yersinia enterocolitica*:
а — контроль; б — положительная реакция

люю определения количества (титра) АТ-агглютининов в сыворотке больных.

Для проведения реакции у взрослого берут 3—5 мл крови из локтевой вены или пальца, мочки уха, а у маленьких детей — 1 мл из пятки. Отделяют сыворотку крови и разводят ИХН от 1 : 50 или 1 : 100 до 1 : 800 или 1 : 1600. Сыворотку в малых разведениях обычно не используют потому, что в крови могут находиться нормальные АТ, которые способны в небольших разведениях вызывать неспецифическую (ложно — положительную) агглютинацию.

В качестве АГ в этой реакции используют диагностикумы — взвеси заводом известных убитых и в отдельных случаях живых микроорганизмов. Диагностикумы из убитых микроорганизмов в S-форме весьма устойчивы, не теряют своих свойств в течение нескольких лет и не представляют биологической опасности. Техника проведения и учет результатов РА с сывороткой больного представлены в табл. 1.5.

Все ингредиенты разливают по пробиркам или лункам планшета для титрования в определенной последовательности. Готовят

Таблица 1.5

Схема проведения реакции агглютинации

Ингредиенты и последовательность операций	Количество ингредиентов в пробирках						
	Номер опытной пробирки (полученные разведения сыворотки)					Контроль	
	1 (1 : 100)	2 (1 : 200)	3 (1 : 400)	4 (1 : 800)	5 (1 : 1600)	сыворотки (1 : 100)	диагностикума
1. ИХН, мл	—	1,0	1,0	1,0	1,0	—	1,0
2. Сыворотка больного в разведении 1:100, мл	1,0	1,0	—	—	—	1,0	—
<i>Приготовление серийных разведений</i>							
3. Диагностикум, капли	1	1	1	1	1	—	1
<i>Перемешивание и инкубирование</i> (2 ч при 37 °С+ 18—20 ч при комнатной температуре)							
Пример учета реакции	+	+	—	—	—	—	—
Интерпретация результата: РА положительна в титре 1:200							

2-кратные разведения сыворотки. В каждую пробирку с разведенной сывороткой вносят по 1—2 капли диагностикума (гомогенная взвесь 1—2 млрд микроорганизмов в 1 мл), энергично встряхивают и помещают на 2 ч в термостат при 37 °С, после чего предварительно учитывают результаты реакции, начиная с контролей (сыворотки и АГ). Отсутствие агглютинации в контрольных пробирках и наличие взвешенных хлопьев в опытных пробирках свидетельствуют о положительной реакции. Пробирки оставляют при комнатной температуре на 18—20 ч, после чего окончательно учитывают результаты.

Интенсивность реакции выражают полуколичественно (плюсами). При полной агглютинации (++++) жидкость совершенно прозрачная, а на дне пробирки — осадок из хлопьев склеившихся микроорганизмов. Чем меньше микроорганизмов агглютинировалось, тем мутнее жидкость и тем меньше хлопьевидный осадок на дне (+++ , ++ , +). При отрицательной реакции (–) хлопьев нет, взвесь остается равномерно мутной и по виду неотличима от содержимого пробирки с контролем АГ (может отмечаться небольшой плотный осадок из несклеившихся клеток).

Внешние проявления РА зависят от вида АГ и величины клеток. У бактерий взаимодействие соматических АГ (*O*-АГ) со специфическими АГ происходит медленно и через 18—20 ч образуется мелкозернистый осадок. При встряхивании мелкие зерна агглютината не разбиваются. Подобная агглютинация наблюдается у возбудителей туляремии, бруцеллеза и др. Наличие жгутикового *H*-АГ (сальмонеллы брюшного тифа, паратифов) обуславливает быстрое появление агглютинации. Через 2—4 ч образуются легко разбивающиеся крупные рыхлые хлопья (рис. 1.22).

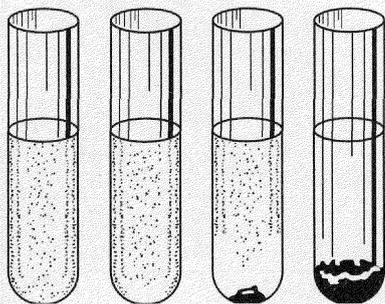


Рис. 1.22. Реакция агглютинации в пробирках

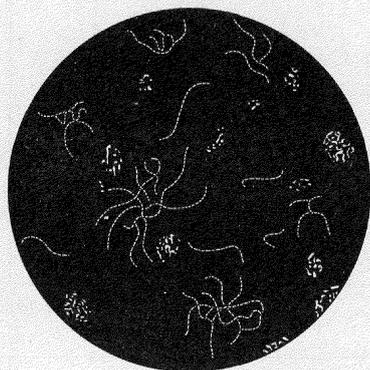


Рис. 1.23. Реакция агглютинации лептоспир в темном поле микроскопа (микроагглютинация)

Агглютинацию живых лептоспир изучают в препарате раздавленной капли при боковом освещении. На темном фоне видны склеившиеся лептоспиры в виде светящихся «паучков» (рис. 1.23).

При отсутствии адсорбированных диагностических сывороток или тест-систем на основе моноклональных антител развернутую РА ставят с диагностической неадсорбированной сывороткой для определения вида, серогруппы и серовара неизвестных микроорганизмов (идентификация по антигенной структуре). Такую реакцию проводят по схеме, которая не отличается от схемы развернутой РА для серодиагностики инфекций.

Реакции непрямой (пассивной) агглютинации. В некоторых случаях АГ, используемые для реакции агглютинации, настолько высокодисперсны, что комплекс агглютиноген-агглютинин не виден невооруженным глазом. Для того чтобы эта реакция была хорошо видна, предложены методы адсорбции таких АГ на более крупных частицах-носителях с последующей их агглютинацией специфическими АТ. В качестве адсорбентов применяют эритроциты, различного вида бактерии, частицы латекса, угля, талька, коалина и т. д. Эта реакция получила название реакции непрямой, или пассивной, агглютинации. Положительный результат реакции проявляется видимой агглютинацией частиц носителя.

Реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации. Наиболее высокой адсорбционной способностью обладают эритроциты. Реакция с использованием эритроцитов называется непрямой, или пассивной, гемагглютинацией (РНГА, или РПГА). Для постановки РНГА могут быть использованы эритроциты барана, лошади, кролика, курицы, мыши, человека и другие, которые заготавливают впрок, обрабатывая формалином или глютаральдегидом. Адсорбционная емкость эритроцитов увеличивается при обработке их растворами танина или хлорида хрома.

Антигенами в РНГА могут служить полисахаридные АГ микроорганизмов, экстракты бактериальных вакцин, АГ вирусов и риккетсий, а также другие вещества.

Эритроциты, сенсibilизированные АГ, называются эритроцитарными диагностикумами. Для приготовления эритроцитарного диагностикума чаще всего используют эритроциты барана, обладающие высокой адсорбирующей активностью.

Методика постановки РНГА. Кровь, взятую из яремной вены взрослого барана, помещают в стеклянную банку с бусами, дефибринируют встряхиванием в течение 10—15 мин и фильтруют через ватно-марлевый фильтр. После центрифугирования в течение 10 мин при 2000 об/мин эритроциты отмывают 3—4 раза в ИХН, осадок ресуспендируют в нем и добавляют 5-кратный объем 4%-го формалина (рН 7,0), в котором оставляют эритроциты на 3—4 дня при 4 °С. Затем эритроциты вновь осаждают и повторяют процедуру со свежим раствором формалина, после

чего их отмывают 20-кратным объемом ИХН и доводят до 20 %-й концентрации. Фиксированные эритроциты хранят при 4 °С.

Для сенсibilизации эритроцитов к 8 объемам дистиллированной воды добавляют 1 объем АГ, 1 объем 50%-й взвеси формализированных эритроцитов и 1 объем 0,1—0,2%-го раствора хлорида хрома или танина в разведении 1 : 20 000—1 : 2 000 000.

Смесь оставляют на 10—15 мин при комнатной температуре, затем добавляют равный объем ИХН и центрифугируют 20 мин при 2000 об/мин. Осадок сенсibilизированных эритроцитов отмывают 2—3 раза 20-кратным объемом ИХН, затем ресуспензируют до концентрации 5 % в стабилизирующем растворе, состоящем из равных объемов 30%-го раствора сахарозы и донорской сыворотки человека.

В качестве контроля используют формализированные эритроциты, сенсibilизированные другим АГ, или формализированные несенсibilизированные эритроциты.

РНГА удобно ставить в планшетах для титрования, используя для разведения материала микротитратор Такачи. Исследуемые сыворотки прогревают 30 мин при 56 °С для инактивации компонента. Для адсорбции неспецифических гемагглютининов к сывороткам добавляют 50%-ю взвесь формализированных или свежих отмытых эритроцитов барана из расчета 0,1 мл взвеси на 1 мл разведенной сыворотки. Смесь встряхивают и инкубируют 30 мин при 37 °С или 1 ч при комнатной температуре, после чего эритроциты осаждают центрифугированием. Можно для осаждения эритроцитов оставить сыворотки в холодильнике до следующего дня.

В U-образные лунки планшета Такачи вносят в зависимости от объема реакции по 1—2 капле ИХН, затем в первые лунки вносят инактивированные сыворотки (1—2 капли) и готовят их 2-кратные разведения. Затем в каждую лунку с разведением сыворотки, а также в контроль АГ (лунка с 1—2 каплями ИХН) вносят эритроцитарный диагностикум — 1%-ю суспензию сенсibilизированных АГ эритроцитов (по 1—2 капли). Для контроля сыворотки на гетерогемагглютинины ее смешивают в тех же пропорциях с контрольными (несенсibilизированными АГ) эритроцитами. Обязателен также контроль сенсibilизированных эритроцитов на отсутствие спонтанной агглютинации. Пластины тщательно встряхивают и помещают на 1—2 ч в термостат при 37 °С или оставляют при комнатной температуре до следующего дня.

Результаты реакции учитывают по наличию гемагглютинации — рыхлого осадка из склеившихся эритроцитов на дне и боковых поверхностях лунок («зонтик»). В контролях гемагглютинации быть не должно (отмечается появление плотного осадка эритроцитов в виде пуговки или колечка). Пример учета микрометода РНГА представлен на [цветной вклейке, рис. 14.](#)

Реакция торможения пассивной (непрямой) гемагглютинации (РТПГА). Реакцию проводят для обнаружения АГ возбудителей в исследуемом материале, добавляя к нему диагностическую иммунную сыворотку. При наличии гомологичного АГ происходит связывание АТ, поэтому после добавления сенсibilизированных АГ эритроцитов их агглютинации не происходит. Это расценивают как положительный результат.

Методика постановки РТПГА. В лунки полистироловых планшетов или агглютинационные пробирки вносят по 0,025 мл 1%-го раствора нормальной сыворотки кролика и делают серийные 2-кратные разведения исследуемого материала. Затем во все лунки добавляют по 0,025 мл иммунной сыворотки, планшет встряхивают и оставляют на 30 мин при 37 °С или на 1 ч при комнатной температуре. Далее во все лунки добавляют по 0,025 мл антигенного диагностикума, встряхивают планшет и оставляют на 2 ч, после чего учитывают результаты.

При проведении этой реакции к контролям для РНГА добавляют контроль специфичности иммунной сыворотки, состоящий из специфического АГ, иммунной сыворотки и взвеси сенсibilизированных эритроцитов. Для большей чувствительности реакции специфическую иммунную сыворотку добавляют к исследуемому материалу в минимальном количестве (2 гемагглютинирующие единицы). Титр иммунной сыворотки определяют предварительно в РНГА. За одну гемагглютинирующую единицу принимают предельное разведение сыворотки, которое вызывает склеивание эритроцитов.

РТПГА применяют также для обнаружения специфических АТ (полных и блокирующих), для чего к исследуемой сыворотке добавляют дозированное количество АГ. Если в ней содержатся АТ, то происходит связывание их АГ, поэтому после добавления эритроцитов, сенсibilизированных АТ (2-й этап РТПГА) склеивания эритроцитов не происходит.

Благодаря использованию минимального количества АГ (2 нейтрализующие дозы) реакция высокочувствительна. Количество нейтрализующих доз в антигенном препарате определяют с помощью РНГА, при этом делают серийные 2-кратные разведения АГ в 1%-м растворе нормальной сыворотки кролика и в лунки вносят антительный эритроцитарный диагностикум. Нейтрализующей дозой АГ считают его максимальное разведение, дающее полное склеивание сенсibilизированных эритроцитов.

Перед проведением реакции испытуемые сыворотки разводят 1:5—1:10, инaktivируют при 56 °С в течение 30 мин и обрабатывают эритроцитами для удаления гетерогемагглютининов.

При проведении опыта исследуемый материал разводят в 1%-м растворе нормальной сыворотки кролика в объеме 0,025 мл в лунках планшеты. Затем в каждую лунку добавляют по 2 нейтрализующих дозы АГ в объеме 0,025 мл. Планшеты встряхивают и оставляют на 30 мин при 37 °С или на 1 ч при комнатной температуре. Затем во все лунки вносят по

0,025 мл антительного эритроцитарного диагностикума, снова встряхивают и инкубируют 1,5—2,0 ч при комнатной температуре, после чего учитывают результаты реакции. Учет можно производить также и на следующий день. Титром исследуемой сыворотки считают максимальное ее разведение, в котором не происходит склеивания эритроцитов.

Опыт сопровождают следующими видами контроля: 1) стабильности сенсibilизированных эритроцитов (эритроциты + 1%-й раствор нормальной сыворотки кролика); 2) полноты истощения гемагглютининов в каждой испытуемой сыворотке (испытуемая сыворотка в наименьшем разведении + формализированные эритроциты); 3) правильности определения минимальной нейтрализующей дозы АГ (2, 1 и 0,5 нейтрализующей дозы АГ + антительный эритроцитарный диагностикум).

Для проведения реакции нейтрализации АГ может быть использован как растворимый, так и корпускулярный АГ.

Реакция обратной непрямой гемагглютинации (РОНГА). Применяется для индикации бактериальных и вирусных АГ в исследуемом материале, а также для экспресс-диагностики ряда инфекций.

В отличие от РНГА при данной реакции эритроциты сенсibilизируют не АГ, а антителами. Частицы антительного (иммуноглобулинового) эритроцитарного диагностикума склеиваются при добавлении АГ. Внешне такая агглютинация не отличается от РНГА.

Эритроциты предварительно фиксируют формалином или глутаральдегидом, а затем связывают их с гамма-глобулином, который выделяют из иммунных сывороток и очищают от других сывороточных белков. Связывание гамма-глобулина с поверхностью эритроцитов производят с помощью хлорида хрома. Для этого к 8 объемам дистиллированной воды добавляют 1 объем иммуноглобулинов, выделенных из иммунной сыворотки, 1 объем 50%-й взвеси формализированных эритроцитов и 1 объем 0,1—0,2%-го раствора хлорида хрома. Смесь оставляют на 10—15 мин при комнатной температуре, затем обрабатывают эритроциты, как при РНГА.

Специфичность антительного диагностикума проверяют в РТПГА с гомологичным АГ. Используется контроль на отсутствие спонтанной гемагглютинации.

С помощью этой реакции проводят индикацию возбудителей в материале, взятом из органов погибших людей и животных, например из мозга, селезенки, печени, легких. Готовят 10%-ю суспензию указанных органов в ИХН, центрифугируют их в течение 30—60 мин при 10 000 об/мин и используют в качестве АГ надосадочную жидкость.

Методика постановки РОНГА. Готовят 2-кратные разведения исследуемого материала (АГ) в стабилизирующем растворе. Вносят по 1 капле каждого разведения АГ в 3 соседние лунки планшета (реакция занимает 3 параллельных ряда лунок). В каждую лунку первого ряда добавляют по 1 капле стабилизирующего раствора, в лунки второго ряда — по 1 капле

гомологичной иммунной сыворотки в разведении 1 : 10, третьего ряда — по 1 капле гетерологичной иммунной сыворотки. Второй и третий ряды служат контролями специфичности реакции. Смесь оставляют на 20 мин при комнатной температуре.

Во все лунки добавляют по 1 капле 1%-й суспензии сенсibilизированных эритроцитов (антительный эритроцитарный диагностикум) и тщательно встряхивают планшеты. Результаты реакции учитывают через 30—40 мин. При наличии специфического АГ гемагглютинация отмечается в первом и третьем рядах (с гетерологичной сывороткой) и отсутствует во втором ряду, где АГ предварительно нейтрализован гомологичной сывороткой. Реакцию сопровождают контролями сенсibilизированных эритроцитов на отсутствие спонтанной агглютинации.

Реакция торможения обратной непрямо́й гемагглютинации (РТОНГА). Данная реакция позволяет определить наличие АТ в сыворотках людей и животных. В ней принимают участие исследуемая сыворотка, АГ и антительный эритроцитарный диагностикум.

Методика постановки РТОНГА. Сыворотки разводят в 10 раз ИХН, прогревают 20 мин при 56 °С для разрушения неспецифических ингибиторов, а затем готовят 2-кратные разведения сывороток в стабилизирующем растворе и рабочую дозу АГ, содержащую 4 агглютинирующие единицы. Вносят по 1 капле каждого разведения сыворотки в лунки планшета и добавляют в них по 1 капле АГ, разведение которого соответствует рабочей дозе.

После контакта компонентов смеси в течение 20 мин при комнатной температуре во все лунки вносят по 1 капле антительного эритроцитарного диагностикума и тщательно встряхивают. Через 1,5—2,0 ч инкубации при комнатной температуре по гемагглютинации учитывают результаты реакции. Титром сыворотки является ее наибольшее разведение, которое полностью тормозит реакцию гемагглютинации с 4 агглютинирующими единицами АГ.

Реакцию сопровождают контролями сенсibilизированных эритроцитов на спонтанную агглютинацию в присутствии: а) стабилизирующего раствора; б) нормального АГ (из материала без возбудителей); в) исследуемой сыворотки. Преимущество реакции заключается в ее универсальности и возможности использования для выявления различных АГ.

Результаты РНГА, РОНГА и РТОНГА учитывают также количественно — по степени агглютинации эритроцитов: (++++) — полная агглютинация; (+++) — менее полная агглютинация; (++) — частичная агглютинация; (+) — следы агглютинации; (–) — отсутствие агглютинации.

Реакция считается положительной, если агглютинация полная (++++) или почти полная (+++), диагностикум не дает спонтанной агглютинации в присутствии каждого компонента реакции и контроль специфичности АГ или АТ положительный.

1.4.2. Реакция преципитации

Реакцией преципитации (РП) называется осаждение из раствора АГ (преципитиногена) при воздействии на него иммунной сыворотки (преципитина) в растворе электролита. Осадок представляет собой макромолекулярный иммунный комплекс (преципитат).

Для РП используются коллоидные растворы АГ. В качестве АГ применяют экстракты из микроорганизмов, органов и тканей, продукты распада клеток микроорганизмов — лизаты, фильтраты и т.д. Устойчивость преципитиногенов к высокой температуре используют при получении АГ из возбудителей сибирской язвы, чумы и др. (метод кипячения).

Преципитирующие сыворотки изготавливают централизованно путем гипериммунизации животных (кроликов, коз, ослов и др.) взвесью бактерий, фильтратами бульонных культур, аутолизатами, солевыми экстрактами микроорганизмов, сывороточными белками и т.д.

Титр преципитирующей сыворотки в отличие от титра других диагностических сывороток определяется максимальным разведением АГ, который дает преципитацию с этой сывороткой. Это объясняется ультрамикроскопической величиной АГ, участвующего в РП (в единице объема частиц АГ содержится гораздо больше, чем АТ, в таком же объеме сыворотки). Преципитирующие сыворотки выпускают с титром не ниже 1 : 100 000.

Реакция кольцепреципитации. В узкую пробирку (диаметр 0,5 см) наливают 0,3—0,5 мл неразведенной преципитирующей сыворотки. Пастеровской пипеткой медленно наслаивают по стенке (пробирку держат в наклонном положении) АГ

в таком же объеме. Затем пробирку осторожно, чтобы не смешать жидкости, ставят вертикально. При правильном наслаивании АГ на сыворотку четко видна граница между двумя слоями жидкости. РП должна обязательно сопровождаться контракциями сыворотки и АГ. Результаты реакции учитывают в зависимости от вида АГ и АТ через 5—10 мин, 1—2 ч или через 20—24 ч. В случае положительной реакции в опытной пробирке на границе между сывороткой и исследуемым экстрактом появляется преципитат в виде кольца белого цвета (рис. 1.24).

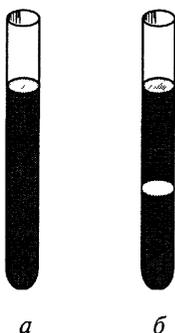


Рис. 1.24. Реакция кольцепреципитации в пробирке:

а — контроль; б — опыт

Реакция кольцепреципитации широко применяется в лабораторной практике для диагностики инфекционных забо-

леваний бактериальной (сибирская язва, чума, туляремия и др.) и вирусной природы (острая респираторная инфекция и др.).

В судебной медицине РП используется для определения видовой принадлежности белка (кровяных пятен, спермы и т.д.).

С помощью РП можно выявить не только видовую, но и групповую специфичность белка. С ее помощью, например, была определена степень родства различных видов животных и растений.

Применение РП для санитарно-гигиенического контроля пищевых продуктов позволяет выявить фальсификацию мясных, рыбных, мучных изделий, примеси в молоке и т.д.

Недостатками РП является нестойкость преципитата (кольца), который исчезает даже при легком встряхивании, а также невозможность установить количество разных АГ, участвующих в формировании преципитата.

Этих недостатков лишена реакция преципитации в геле.

Реакция преципитации в геле (РПГ). РПГ основана на взаимодействии гомологичных АТ и АГ в агаровом геле с образованием видимых полос преципитации. АТ и АГ в результате встречной диффузии в гель образуют макромолекулярные иммунные комплексы, регистрируемые визуально в виде белых (опалесцирующих) полос (рис. 1.25, 1.26).

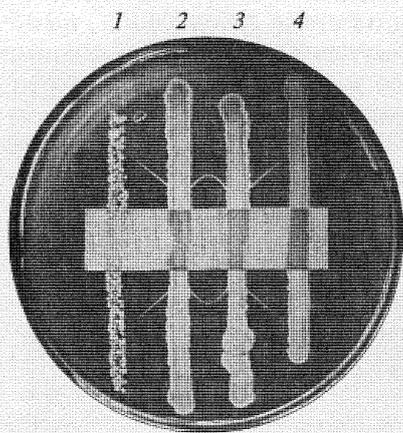


Рис. 1.25. Определение токсигенности коринебактерий дифтерии *in vitro*:

1, 4 — нетоксигенные культуры; 2 и 3 — культуры, выделяющие идентичные дифтерийные токсины (поперек штриховых посевов наложена фильтровальная бумага, пропитанная адсорбированной противодифтерийной сывороткой)

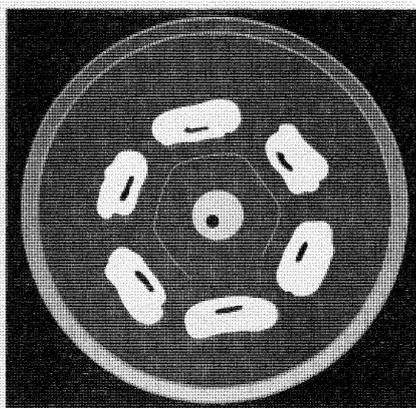


Рис. 1.26. Определение токсигенности коринебактерий дифтерии модифицированным методом:

все культуры токсигенны, за исключением отрицательного контроля внизу (заведомо нетоксигенный штамм *C. diphtheriae* биовара *belfantii* — нижняя бляшка)

При наличии в растворе нескольких АГ, диффундирующих независимо друг от друга, количество полос соответствует количеству АГ. Серологически родственные АГ образуют полосы precipitation, сливающиеся друг с другом, полосы же разнородных АГ перекрещиваются. Это позволяет определить общность антигенной структуры различных исследуемых объектов.

Компонентами РПГ являются агаровый гель, АГ и АТ. Для контроля РПГ применяется тест-система, состоящая из известных гомологичных АТ и АГ.

Антиген, используемый в РПГ, должен быть концентрированным, а сыворотки (больных людей или иммунизированных животных) — с высоким титром АТ.

В качестве геля используют прокипяченный и остуженный 0,8—1%-й раствор специального агара или агарозы на ИХН, слой которого толщиной 1—2 мм наносят на чистые стекла. Реакция среды — нейтральная или слабощелочная. В застывшем агаре штампом вырезают лунки, удаляя из них агар пастеровской пипеткой. В одни лунки вносят сыворотку, в другие — антигены и оставляют гель во влажной камере на несколько дней. Учитывая результаты реакции, сравнивают локализацию и характер линий precipitation возле опытных лунок и контрольной тест-системы. Для определения количества АГ или АТ изучают их 2-кратные разведения.

РПГ широко используется в диагностике заболеваний, вызываемых вирусами, риккетсиями и бактериями, продуцирующими экзотоксины. Большое практическое значение она имеет при определении токсигенности коринебактерий дифтерии.

Реакция иммуноэлектрофореза (РИЭФ). Эта реакция позволяет произвести анализ и идентификацию отдельных АГ в многокомпонентной системе. РИЭФ основана на электрофоретическом

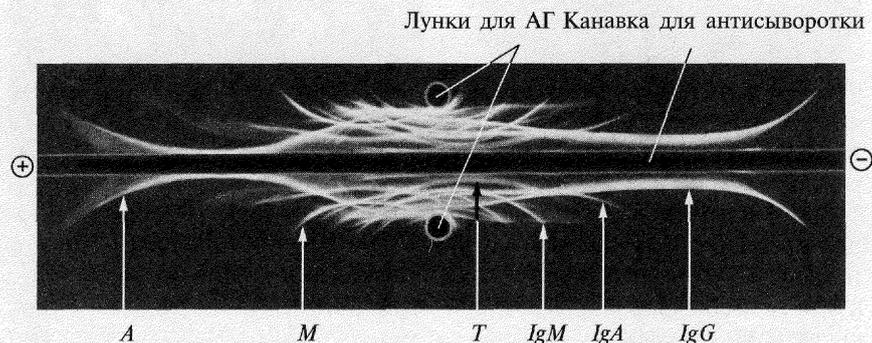


Рис. 1.27. Иммуноэлектрофорез в геле (анализ белковых антигенов цельной сыворотки человека):

стрелками показаны основные белки — альбумин (*A*), микроглобулин (*M*), трансферрин (*T*), иммуноглобулины (*IgM*, *IgA*, *IgG*)

разделении антигенов в геле с последующей их преципитацией АТ иммунной сыворотки. Для проведения реакции иммуноэлектрофореза используют пластины из стекла, на которые нанесен слой агара. Вначале АГ, помещенные в центре такой пластины, разделяются в электрическом поле. Затем в канавку агара, вырезанную параллельно линии разделения антигенов, добавляют иммунную сыворотку. Диффундируя навстречу друг другу, АГ и АТ в месте встречи образуют дуги преципитации (рис. 1.27).

Реакция встречного иммуноэлектрофореза (РВИЭФ). Эта реакция основана на встречной диффузии в электрическом поле антигенов и антител и появлении внутри прозрачного геля видимого преципитата. В агаровом или агарозном геле делают лунки диаметром 2—3 мм, причем расстояние между лунками для сыворотки и АГ должно составлять 5—6 мм. Лунки располагают попарно (одна — для АГ, вторая — для сыворотки) или по три (одна — для АГ, вторая — для испытуемой сыворотки, третья — для контрольной сыворотки). Лунки для сыворотки располагают ближе к аноду, а для АГ — к катоду. Реакцию проводят с несколькими разведениями АГ, продолжительность электрофореза — 90 мин. Результаты реакции учитывают сразу же после окончания электрофореза, отмечая количество и локализацию линий преципитации при сравнении их с контрольной тест-системой.

1.4.3. Реакция лизиса

Реакцией лизиса называется серологический тест, основанный на растворении цельноклеточного АГ, соединенного с АТ, в присутствии комплемента. В зависимости от АГ, участвующих в реакции лизиса, ее называют реакцией спирохетолиза, вибриолиза, бактериолиза, гемолиза и т.д. АТ, участвующие в реакции, соответственно называют спирохетолитинами, вибриолизинами, гемолизинами и т.д. Комплемент проявляет литическое действие только в присутствии иммунного комплекса «клетка + лизин». Большинство микроорганизмов, за исключением холерного вибриона и трепонем, малочувствительны к литическому действию комплемента. Поэтому реакция лизиса не нашла широкого применения в лабораторной практике.

При проведении реакции лизиса (табл. 1.6) иммунную сыворотку прогревают в течение 30 мин при 56 °С для инактивации в ней комплемента. Взвесь микроорганизмов готовят из их суточной культуры (10^9 кл/мл). В первую пробирку к 0,5 мл исследуемой сыворотки, разведенной 1 : 10 (или 1 : 20, 1 : 40 и т.д.), добавляют 0,1 мл приготовленной взвеси микроорганизмов и 0,1 мл неразведенного комплемента. Во вторую пробирку, являющуюся контролем инактивации комплемента в иммунной сыворотке, комплемент не добавляют. В третьей пробирке, служащей контролем

Схема проведения реакции лизиса

Ингредиенты	Количество ингредиентов в пробирках, мл		
	Опыт	Контроль сыворотки	Контроль комплемента
Сыворотка в разведениях 1 : 10; 1 : 20 и т.д.	0,5	0,5	—
Антиген	0,1	0,1	0,1
Комплемент	0,1	—	0,1
ИХН	1,3	1,4	1,8

комплемента на отсутствие в нем лизинов, иммунную сыворотку заменяют ИХН.

Пробирки помещают на 2 ч в термостат при 37 °С, затем делают посев петлей из каждой пробирки на чашки Петри с плотной питательной средой.

Посевы инкубируют в течение суток при 37 °С и подсчитывают колонии. Если в исследуемой сыворотке содержатся лизины, количество колоний на питательной среде, засеянной материалом из опытной пробирки, будет во много раз меньше, чем в чашках, содержащих материал из контрольных пробирок.

Реакцию гемолиза используют в качестве индикаторной системы в реакции связывания комплемента.

1.4.4. Реакция связывания комплемента

Реакция связывания комплемента (РСК) относится к сложным серологическим реакциям. Для ее проведения необходимы 5 ингредиентов, а именно: АГ, АТ и комплемент (первая система), эритроциты барана и гемолитическая сыворотка (вторая система). Специфическое взаимодействие АГ и АТ сопровождается адсорбцией (связыванием) комплемента. Поскольку процесс связывания комплемента не проявляется визуально, Ж. Борде и О. Жангу предложили использовать в качестве индикатора гемолитическую систему (эритроциты барана + гемолитическая сыворотка), которая показывает, фиксирован ли комплемент комплексом АГ-АТ. Если АГ и АТ соответствуют друг другу, т. е. образовался иммунный комплекс, то комплемент связывается этим комплексом и гемолиза не происходит. Если АТ не соответствует АГ, то комплекс не образуется и комплемент, оставаясь свободным, соединяется со второй системой и вызывает гемолиз (см. цв. вклейку, рис. 15).

РСК, как и другие серологические реакции, можно использовать для выявления специфических АТ по известному АГ, а также для определения АГ по известным АТ.

Проведение РСК требует особой подготовки. Посуду (пробирки, пипетки, флаконы) тщательно моют и не используют в других целях. Все ингредиенты реакции подготавливают и титруют до проведения основного опыта.

1. Сыворотку (больного или диагностическую) накануне проведения реакции прогревают в водяной бане при 56 °С 30 мин для инактивации ее собственного комплемента.

Некоторые сыворотки, особенно от иммунизированных животных, обладают антикомплементарными свойствами, т. е. способностью связывать комплемент в отсутствие гомологичного АГ. Антикомплементарность сывороток устраняют путем обработки их углекислым газом, прогреванием, замораживанием и другими методами. Для предотвращения антикомплементарности сывороток их хранят в лиофилизированном виде или замороженном состоянии при низких температурах.

2. Антигеном для РСК могут быть культуры различных убитых микроорганизмов, их лизаты, компоненты бактерий, патологически измененных и нормальных органов, тканевых липидов, вирусы и вирусосодержащие материалы.

Многие АГ из микроорганизмов получают производственным путем. Антикомплементарность АГ устраняют при помощи таких методов, как термолиз (многократное замораживание и оттаивание), обработка жирос растворителями (эфиром, хлороформом, ацетоном), спиртами (метанолом, этанолом) и т. д.

3. В качестве комплемента используют свежую или сухую сыворотку морской свинки. Чтобы получить основной раствор для последующего титрования, комплемент разводят 1 : 10 в ИХН.

4. Эритроциты барана используют в виде 3%-й взвеси в ИХН.

Кровь (100—150 мл) берут из яремной вены, помещают в стерильную банку со стеклянными бусами, дефибринируют путем встряхивания в течение 10—15 мин и фильтруют через 3—4 слоя стерильной марли для удаления фибрина. Эритроциты отмывают три раза в ИХН, доливая его к осадку эритроцитов до первоначального объема крови. Эритроциты можно хранить 5—6 дней при 4—6 °С. Срок хранения эритроцитов увеличивается при их консервировании формалином (0,1 мл неразведенного формалина на 80 мл дефибринированной крови) или другими способами.

5. Гемолитическую сыворотку для РСК получают путем иммунизации кроликов суспензией эритроцитов барана.

Кроликов иммунизируют путем введения им в вену уха 50 %-й взвеси отмывтых эритроцитов барана (по 1 мл 4—6 раз через день). Через 7 дней

после последней инъекции получают пробную сыворотку. Если титр сыворотки не ниже 1 : 1200, то делают кровопускание. Сыворотку прогревают 30 мин при 56 °С. Для предупреждения бактериального роста в гемолитическую сыворотку добавляют консервант (мертиолят 1 : 10 000 или 1 % борной кислоты).

6. Гемолитическая система состоит из смешанных в равных объемах гемолитической сыворотки (взятой в тройном титре) и 3%-й взвеси эритроцитов барана. Для сенсibilизации эритроцитов гемолизинами смесь выдерживают в термостате при 37 °С в течение 30 мин.

Титрование гемолитической сыворотки. Сыворотку титруют путем смешивания ее разведений (1 : 600, 1 : 1200, 1 : 1600, 1 : 3200 и т.д.) в объеме 0,5 мл с 0,5 мл 3 % взвеси эритроцитов и 0,5 мл свежего комплемента в разведении 1 : 10. Результаты реакции учитывают через 1 ч инкубации при 37 °С. Титром гемолитической сыворотки считают ее наибольшее разведение, вызывающее полный гемолиз. Если титр сыворотки составил, например, 1 : 1200, то в основной опыт РСК ее берут в титре 1 : 400.

Титрование комплемента. Перед проведением опыта основной раствор комплемента (1 : 10) разливают в ряд пробирок в количестве от 0,05 до 0,5 мл и, используя ИХН, доводят объем жидкости в каждой пробирке до 1,5 мл. Пробирки инкубируют при 37 °С 45 мин, затем добавляют в них гемолитическую систему и выдерживают еще 30 мин, после чего определяют титр комплемента (наименьшее его количество, вызывающее полный гемолиз). Рабочая доза комплемента в основном опыте РСК (в объеме 0,5 мл) должна быть выше титра на 20—30 %.

Титрование АГ. Для выявления антикомплемментарных свойств АГ титруют в присутствии рабочей дозы комплемента. Для РСК используют рабочую дозу АГ, составляющую примерно $\frac{1}{2}$ — $\frac{2}{3}$ титра. Антигены, в присутствии которых титр комплемента уменьшается более чем на 30 %, непригодны для реакции.

Проведение основного опыта РСК. Общий объем ингредиентов реакции — 2,5 мл, объем рабочей дозы каждого из них — 0,5 мл. Как видно из схемы проведения РСК (табл. 1.7), в первую пробирку вносят сыворотку в соответствующем разведении, АГ и комплемент, во вторую — сыворотку в соответствующем разведении, комплемент и ИХН (контроль сыворотки), в третью — АГ, комплемент и ИХН (контроль АГ).

Одновременно готовят гемолитическую систему, смешивая по 2 мл гемолитической сыворотки в тройном титре и 3%-й взвеси эритроцитов барана. Пробирки выдерживают 1 ч при 37 °С, затем в первые 3 пробирки (первая система) добавляют по 1 мл гемолитической системы (вторую систему). После тщательного смешивания ингредиентов пробирки вновь инкубируют 1 ч при 37 °С.

Таблица 1.7

Проведение основного опыта РСК

Этап (система)	Ингредиенты	Количество ингредиентов в пробирках, мл		
		Опыт	Контроль сыворотки	Контроль антигена
I	Исследуемая сыворотка в разведениях 1 : 5, 1 : 10, 1 : 20, 1 : 40 и т.д.	0,5	0,5	—
	Антиген (рабочая доза)	0,5	—	
	Комплемент (рабочая доза)	0,5	0,5	0,5
	ИХН	—	0,5	0,5
<i>Инкубирование при 37 °С в течение 1 ч</i>				
II	Гемолитическая система (гемолитическая сыворотка в тройном титре + 3%-я взвесь эритроцитов барана)	1,0	1,0	1,0
<i>Инкубирование при 37 °С в течение 1 ч</i>				
Пример учета реакции		Отсутствие гемолиза	Гемолиз	Гемолиз
Интерпретация результата: РСК положительна (в сыворотке имеются АТ, титр которых соответствует наибольшему разведению, где полностью отсутствует гемолиз)				

Результаты реакции учитывают предварительно — после термостатирования и окончательно — после 15—18 ч пребывания в холодильнике или при комнатной температуре. РСК, как правило, контролируют с использованием заведомо положительной и отрицательной сывороток.

При окончательном учете интенсивность реакции выражают плюсами: (++++) — резко положительная реакция, характеризующаяся полной задержкой гемолиза (жидкость в пробирке бесцветная, все эритроциты оседают на дно); (+++, ++) — положительная реакция, проявляющаяся усилением окраски жидкости вследствие гемолиза и уменьшением количества эритроцитов в осадке; (+) — слабо положительная реакция (жидкость интенсивно окрашена, на дне пробирки незначительное количество эритроцитов). При отрицательной реакции (–) наблюдается полный гемолиз, жидкость в пробирке имеет интенсивно розовую окраску — лаковая кровь (см. цв. вклейку, рис. 15).

Предложен ряд модификаций РСК, отличающихся повышенной чувствительностью и меньшим объемом используемых ингредиентов. Так, например, при вирусологических исследованиях объем ингредиентов для РСК на холоде — 1 мл (см. подразд. 3.2). Для капельной РСК берут 1 каплю сыворотки + 1 каплю антигена + + 1 каплю комплемента + 2 капли гемолитической системы.

РСК, несмотря на ее сложность, обладает относительно высокой чувствительностью и специфичностью, поэтому ее применяют для диагностики многих инфекционных заболеваний. С помощью РСК обнаруживают комплементсвязывающие АТ в сыворотке крови больных сифилисом (реакция Вассермана), сапом, хронической гонореей, риккетсиозами, вирусными заболеваниями и др.

При инфекционных заболеваниях АТ, связывающие комплемент, появляются в первые дни заболевания, однако титр их невысок. Обычно АТ накапливаются в высоких титрах на 7—14-й день заболевания. Поэтому наиболее достоверными являются данные, полученные при исследовании парных сывороток, взятых в начале заболевания и в период реконвалесценции.

1.4.5. Серологические реакции с использованием метки

В настоящее время широко применяются серологические реакции, в которых участвуют меченые тем или иным способом АТ или АГ. Серологические реакции с использованием метки позволяют быстро получить результаты, как правило, отличаются высокой чувствительностью и находят широкое применение для экспресс-диагностики вирусных и бактериальных инфекций.

Наиболее распространенными являются следующие виды меток:

1) флюорохромы и металлы лантаноидной группы, способные флюоресцировать при облучении ультрафиолетом, например флюоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ); такие метки используются в иммунофлюоресцентных реакциях;

2) ферритин — белок, содержащий до 23% железа, хорошо контрастирующий и поэтому применяющийся в качестве метки при иммуноэлектронной микроскопии;

3) ферменты, которые при взаимодействии с субстратом обуславливают его распад с образованием окрашенных (хромогенных) продуктов; используются для иммуноферментного анализа;

4) радиоактивные метки, применяемые в высокочувствительных реакциях радиоиммуноанализа.

Указанные серологические реакции имеют неодинаковую чувствительность и диагностическую ценность. Применение некоторых из них (например, радиоиммунологических) связано с использованием сложной регистрирующей аппаратуры, а также существенной биологической и экологической опасностью.

Реакция иммунофлюоресценции (РИФ). РИФ основана на использовании флюоресцеинизотиоцианата (ФИТЦ) или других флюорохромов, химически связанных (конъюгированных) с АТ. При этом меченые АТ (в составе иммунофлюоресцирующих антисывороток) сохраняют иммунологическую специфичность и вступают во взаимодействие со строго определенными корпускулярными АГ. Комплексы АГ с мечеными АТ можно легко определять по интенсивному желто-зеленому свечению при изучении препарата в люминесцентном микроскопе.

РИФ (реакция Кунса) может быть поставлена в нескольких вариантах.

Прямая РИФ предполагает применение иммунофлюоресцирующих АТ против искомого АГ.

Прямая РИФ ставится следующим образом: препарат окрашивают специфической меченой антисывороткой во влажной камере 30 мин при 25 °С, после чего 10 мин промывают при 25 °С соевым буферным раствором (рН 7,2).

Непрямая РИФ проводится в 2 этапа с использованием двух различных антисывороток. Вначале применяют немеченые АТ против искомого АГ, а на втором этапе реакции образовавшийся комплекс АГ-АТ обрабатывают люминесцирующей антисывороткой, содержащей меченые АТ против гамма-глобулинов того вида животного, на котором была получена немеченая антисыворотка, использованная на первом этапе реакции (антивидовая, антиглобулиновая сыворотка).

Например, если немеченая антисыворотка была получена путем иммунизации кроликов, то на втором этапе используют меченую антивидовую кроличью сыворотку, полученную путем иммунизации кроличьими гамма-глобулинами ослов или каких-либо других животных. При этом антиглобулиновые меченые АТ покрывают вторым слоем исследуемый АГ (первый слой — за счет немеченых АТ, которые, в свою очередь, служат АГ для антиглобулиновой сыворотки). В результате этого АГ становится видимым в люминесцентном микроскопе (как и в прямом варианте РИФ).

Непрямая РИФ предполагает обработку препарата вначале немеченой специфической антисывороткой во влажной камере 30 мин при 25 °С, после чего препарат промывают буферным раствором (как и при прямой РИФ). Далее препарат обрабатывают антивидовой меченой сывороткой во влажной камере 30 мин при 25 °С и снова промывают буферным соевым раствором.

Антикомплементарная РИФ предполагает применение меченых АТ против комплемента морской свинки. Используется в тех случаях, когда комплекс АГ-АТ способен фиксировать комплемент (используется комплемент морской свинки). Добавление к такой системе антикомплементарной меченой сыворотки позволяет вы-

являть АГ по специфическому свечению в люминесцентном микроскопе.

Антикомплементарная РИФ — метод, при котором препарат вначале обрабатывают немеченой специфической антисывороткой и комплементом морской свинки (1 : 10) во влажной камере в течение 30 мин при 25 °С, после чего промывают и обрабатывают антикомплементарной (против глобулинов морской свинки) меченой сывороткой в тех же условиях и промывают солевым буферным раствором.

Приготовленные препараты высушивают с помощью фильтровальной бумаги и изучают в люминесцентном микроскопе: сначала при помощи сухого объектива (40×), а затем, поместив на препарат каплю нефлюоресцирующего масла, с помощью иммерсионного объектива (90×). При этом обращают внимание не только на наличие зеленого или зелено-желтого свечения, но и его интенсивность, характер распределения свечения в изучаемой клетке.

Для исключения ложноположительных результатов реакцию сопровождают рядом контролей, среди которых особое значение имеет контроль с гетерологичным АГ (например, с бактериальной культурой, не соответствующей в антигенном отношении используемой антисыворотке). При изучении инфицированных культур клеток обязательно используют контроль с нормальной, неинфицированной культурой (для исключения аутофлюоресценции и неспецифического связывания меченых АГ с поверхностью клеток). Для подавления аутофлюоресценции препаратов можно использовать бычий альбумин, меченный родамином.

Достоинством не прямой и антикомплементарной РИФ является использование лишь одной светящейся сыворотки (антивидовой или, соответственно, антикомплементарной) при изучении различных АГ, что значительно упрощает и удешевляет реакцию.

РИФ используют для изучения различных АГ: культур бактерий, грибов, простейших; препаратов из материала от больных; инфицированных культур клеток, срезов тканей и др. Исследуемый материал помещают на стекло и фиксируют (чаще всего в ацетоне, 10 мин при комнатной температуре), после чего высушивают в течение 20 мин при 37 °С. Дальнейшая обработка препаратов зависит от применяемого варианта РИФ (см. цв. вклейку, рис. 16).

Реакция иммунофлюоресценции, сохраняя специфичность иммунологических реакций, отличается простотой и быстротой проведения. Непрямой вариант РИФ можно использовать не только для изучения АГ, но и для определения количества АГ в иммунной сыворотке. Вместе с тем, РИФ нельзя отнести к числу высокочувствительных реакций. Кроме того, не исключается возможность неспецифической адсорбции меченых АГ на препарате с

появлением ложноположительных результатов. Применение лантаноидной метки (металлы лантаноидной группы) существенно повышает чувствительность метода.

Иммуноферритиновая реакция. Данная реакция ставится с применением АТ, конъюгированных с ферритином. После обработки мечеными АТ изучаемых объектов (вирусов, бактерий, срезов инфицированных клеток) они становятся электронноплотными и могут быть выявлены при электронной микроскопии. Чаще всего эта реакция применяется в вирусологии.

Иммуноферментный анализ (ИФА). Метод основан на использовании в качестве метки АТ ферментов, способных разлагать субстрат и приводить к образованию окрашенных продуктов (хромогена). Конъюгированные с ферментом АТ сохраняют способность соединяться с гомологичным АГ. Интенсивность окраски хромогена соответствует количеству образовавшихся комплексов АГ-АТ + фермент.

В качестве ферментов чаще всего используют пероксидазу, щелочную фосфатазу. Субстратом для пероксидазы является перекись водорода, а хромогеном служат 5-аминосалициловая кислота, орто-фенилендиамин и другие вещества.

В настоящее время в микробиологии чаще всего используется *твердофазная модификация ИФА*. Ее суть заключается в том, что вначале на каком-либо твердом материале сорбируют АГ (или АТ) и лишь после этого добавляют остальные ингредиенты серологической реакции (рис. 1.28). Определение неизвестных антител включает в себя следующие этапы: 1) связывание известного антигена с пластиком лунки планшета; 2) внесение испытуемой сыворотки; 3) внесение конъюгата (меченой ферментом антиглобулиновой сыворотки); 4) внесение хромогенного субстрата. Определение неизвестных антигенов состоит из таких этапов: 1) связывание антител, специфичных для искомого антигена, с пластиком лунки планшета; 2) внесение антигенсодержащего материала; 3) внесение 2-х антител той же специфичности; 4) внесение конъюгата (меченой ферментом антиглобулиновой сыворотки); 5) вне-

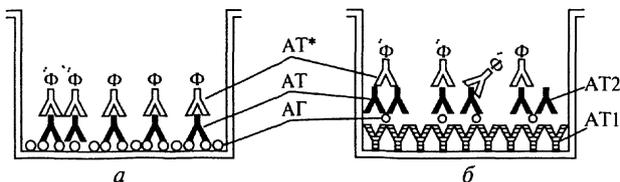


Рис. 1.28. Иммуноферментный анализ (твердофазный вариант):

а — определение неизвестных антител (серодиагностика), *б* — определение неизвестных антигенов (индикация)

сение хромогенного субстрата. В качестве твердофазного носителя АТ или АГ обычно используют пластиковые планшеты, шарики, пленки или пробирки, изготовленные из различных синтетических инертных материалов — полистирола, метакрила и др. Будучи адсорбированными на поверхности таких материалов, АТ или АГ даже в высушенном состоянии длительное время сохраняют свою иммунологическую специфичность и способность вступать в серологические реакции.

Существует много методических вариантов иммуноферментного выявления АГ; в большинстве случаев АГ улавливается АТ, присоединенными к твердой фазе. В результате инкубации с клиническим материалом исследуемый АГ присоединяется к АТ и, следовательно, — к твердой фазе. Затем «привязанный» АГ выявляют с помощью меченных ферментом АТ против этого АГ — прямой вариант ИФА. При непрямом варианте используются меченные ферментом антивидовые (антиглобулиновые) сыворотки. Количество присоединенного к твердой фазе фермента соответствует количеству АГ. Активность фермента выявляют и оценивают количественно по интенсивности окрашивания хромогена, модифицированного продуктами расщепления субстрата. Результаты реакции учитывают визуально или с помощью специального фотоэлектроколориметра. Применяются также автоматические анализаторы (ридеры).

Для проведения ИФА необходимы полистироловые планшеты, имеющие лунки с плоским дном и автоматические пипетки. Для количественного учета используют спектрофотометр — регистратор экстинции при длине волны 492 нм.

ИФА характеризуется весьма высокой чувствительностью и быстротой получения результатов (в течение 4—6 ч). Для повышения чувствительности твердофазной модификации ИФА необходимо применение высокоспецифичных АТ, например высокоаффинных моноклональных АТ.

Буферные растворы для проведения ИФА. *Буфер сенсibilизации* — 0,05 М натриево-карбонатно-бикарбонатный буфер (КББ, pH 9,5—9,7) для сорбции АГ или АТ на твердом носителе. Состав буфера: 1,18 г Na_2CO_3 ; 3,47 г NaHCO_3 ; 200 мг NaNO_3 . Объем буфера доводят до 1 л дистиллированной водой. Возможно использование фосфатного буфера (см. буфер инкубации).

Буфер инкубации — фосфатно-солевой раствор (pH 7,3—7,5), который используют для разведения компонентов, вводимых в реакцию после сорбции первого компонента на носителе. Состав буфера: 17,9 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 0,8 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 42,5 г NaCl ; 2,5 мл твина-20. Объем буфера доводят до 5 л дистиллированной водой, хранят при 20—25 °С.

Буфер для отмывания компонентов реакции — ИХН, содержащий 0,05 % твина-20. В качестве отмывочного буфера можно также использовать фосфатно-солевой раствор с 0,05 % твина-20.

Ортофенилендиамин готовят *ex tempore* следующим образом:

10 мг ортофенилендиамина, 6,1 мл 0,1 М лимонной кислоты, 6,4 мл 0,2 М $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (для полного растворения подогреть на водяной бане), 12,5 мл дистиллированной воды, 0,35 мл 3%-й H_2O_2 .

Растворяют 80 мг 5-аминосалициловой кислоты в 100 мл дистиллированной воды, доводят pH раствора до 6,0 *ex tempore* с помощью 1 М NaOH. Перед использованием на каждые 9 мл раствора добавляют 1 мл 0,05%-й H_2O_2 .

Методика проведения ИФА в лунках планшета. Первый этап ИФА — сорбция соответствующего разведения АТ или АГ (в концентрации 10—20 мкг/мл) в карбонатно-бикарбонатном буфере (в объеме 0,1 мл) на твердую фазу в течение 1—2 ч при 37 °С и 10—12 ч при 4 °С (сенсibiliзация). Затем отмывают лунки (для удаления несорбированного на носителе АТ или АГ) водопроводной водой, отмывочным буфером с 0,05 % твина-20 в течение 5 мин (два раза) при комнатной температуре. После этого вносят в каждую лунку (твердую фазу) по 0,1 мл 1%-го раствора БСА (бычьего сывороточного альбумина) на КББ и инкубируют в течение 1 ч при 37 °С для закрытия участков поверхности лунок, оставшихся свободными после сенсibiliзации. Лунку отмывают от несвязанного БСА и вносят исследуемый материал (АГ или АТ) по 0,1 мл в разведениях на фосфатно-солевом растворе (pH 7,2) с 0,05 % твина-20. Каждое разведение материала вводят в две лунки и помещают в термостат на 1—3 ч при 37 °С. Отмывают непрореагировавшие в иммунной реакции АГ или АТ и вносят по 0,1 мл конъюгированных АТ против исследуемого АГ или АТ в рабочем разведении на фосфатно-солевом растворе с 0,05 % твина-20. Затем их инкубируют в течение 2 ч при 37 °С. Несвязанный конъюгат трижды отмывают буфером.

В лунку вносят 0,1 мл смеси растворов субстрата и хромогена и выдерживают 30 мин в темноте при комнатной температуре. В процессе инкубации пероксида разрушает субстрат (H_2O_2) с образованием активного кислорода, который окисляет хромоген. В результате хромоген меняет цвет: ортофенилендиамин окрашивается в желтый цвет, а аминсалициловая кислота — в коричневый.

Для остановки реакции расщепления субстрата в лунку добавляют по 0,1 мл 1N H_2SO_4 (или 1M NaOH).

Контроль реакции — исследуемые АГ или АТ заменяют гомологичным компонентом реакции.

Контроль конъюгата — 0,1 мл 1%-го БСА на КББ + 0,1 мл конъюгированных АТ в рабочем разведении.

При визуальном учете выявляют то наибольшее разведение исследуемого материала, в котором окраска интенсивнее, чем в контроле (с БСА). При учете результатов реакции с помощью фотоэлектроколориметра положительным считается то наибольшее разведение исследуемого материала, где уровень экстинции не менее чем в 2 раза превышает уровень экстинции соответствующего разведения гетерологичного компонента реакции.

Для получения АТ, конъюгированных ферментом, необходимы высокоактивные преципитирующие сыворотки против АГ или против гло-

булинов животных или человека, из которых выделяют гамма-глобулиновую фракцию. Иммуноглобулины конъюгируют с ферментом при помощи глутаральдегида. Несвязанный фермент удаляют диализом или хроматографией на сефадексе. Для предупреждения микробной деградации в конъюганты вносят мертиолят до 0,01 % и хранят при 4 °С в замороженном или лиофильно высушенном состоянии.

Иммуноблоттинг. В основе этого метода лежит твердофазный вариант ИФА для обнаружения неизвестных АТ (см. выше). Обычно в качестве известного АГ для ИФА используют целые микробные клетки, вирусные частицы, фрагменты микробных клеток и т.п., которые фактически состоят из нескольких АГ, что обуславливает относительно невысокую специфичность этого метода. При постановке иммуноблоттинга вначале препарат известного АГ фракционируют — разделяют методом электрофореза в агарозном геле на фракции (отдельные АГ). После этого гель накладывают на нитроцеллюлозную бумагу (фильтр), плотно прижимают к ней и создают электрическое поле, в результате чего происходит перенос фракций на бумагу (блоттинг). При этом сохраняется взаиморасположение фракций и их расстояние от старта (электрофоретическая картина фракционирования). Далее обработку фильтра ведут так же, как при постановке ИФА (рис. 1.29, а). При учете результатов имеет значение появление окрашивания фильтра в виде 1 или нескольких полос на тех местах, где располагались особые (специфические) фракции АГ (рис. 1.29, б). Иногда в качестве метки для антиглобулиновой сыворотки применяют не фермент, а радиоактивный изотоп. В этом случае для учета результатов иммуноблоттинга применяют такие же средства, как при радиоиммунологическом анализе (см. ниже). Ввиду применения фракционированных АГ иммуноблоттинг имеет более высокую специфичность, по сравнению с обычными ИФА или РИА.

Радиоиммунологический анализ (РИА). АГ или АТ для РИА метят радиоактивным изотопом, чаще всего ^{125}I . Реакции РИА очень чувствительны, позволяют обнаружить 1—2 нг и менее исследуемого вещества. Для их проведения необходима специальная радиометрическая аппаратура.

Известны различные модификации РИА, из которых чаще всего применяется твердофазная. Как и при проведении твердофазной ИФА (см. выше) для постановки этой реакции АТ (АГ) сорбируют на твердофазном носителе: поверхности лунок планшетов, бус, пленок из полистирола или других полимерных синтетических материалов. Адсорбированные (иммобилизированные) АГ и АТ длительное время сохраняют способность вступать в серологические реакции.

Применяют три метода твердофазного РИА: конкурентный, обратный и непрямой (рис. 1.30).

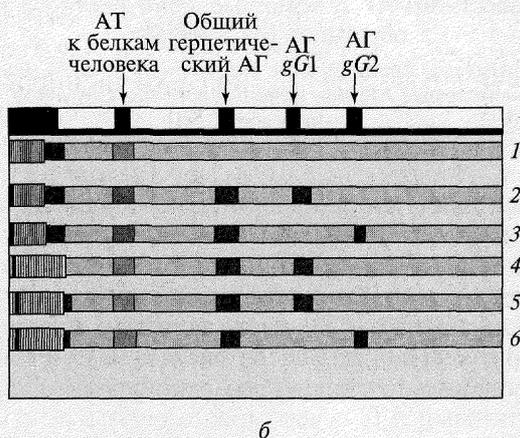
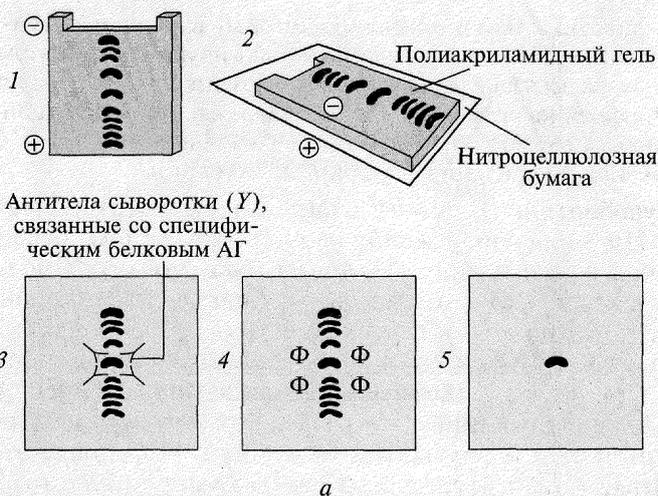


Рис. 1.29. Иммуноблотинг:

a — проведение анализа: 1 — разделение белковых антигенов в гель-электрофорезе; 2 — перенос фракций на нитроцеллюлозный фильтр; 3 — обработка фильтра испытуемой сывороткой; 4 — обработка фильтра конъюгатом (меченой ферментом антиглобулиновой сывороткой, Ф); 5 — вид фильтра после внесения хромогенного субстрата и окончательной промывки; б — выявление в иммуноблотинге антител к специфическим белкам вируса простого герпеса 1-го и 2-го типов (gG1 и gG2, соответственно): 1 — отрицательный контроль; 2, 4, 5 — сыворотки больных, инфицированных ВПП-1; 3, 6 — сыворотки больных, инфицированных ВПП-2

При конкурентном методе РИА на поверхности полистироловых лунок сорбируют известные АГ. Затем в лунки вносят исследуемый антигенсодержащий материал и спустя определенное вре-

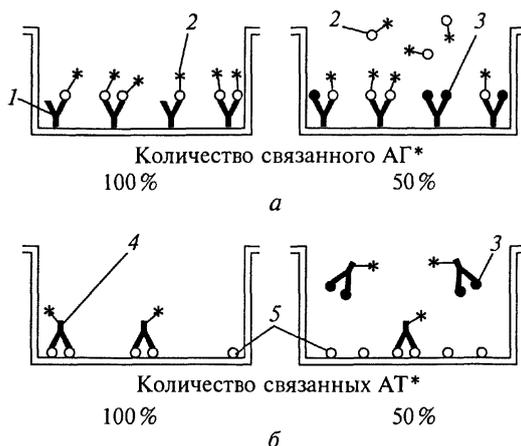


Рис. 1.30. Схема твердофазного радиоиммунологического анализа при определении неизвестного АГ с помощью конкурентного прямого (а) и обратного (б) методов:

1 — известные антитела, специфичные искомому АГ; 2 — меченые изотопом известные АГ; 3 — искомые АГ; 4 — меченые изотопом антитела к искомому АГ; 5 — известный АГ

мя, достаточное для специфического взаимодействия АГ с иммобилизованными АТ, добавляют меченый радиоактивным изотопом очищенный АГ той же специфичности.

Если в исследуемом материале присутствует АГ, соответствующий иммобилизованным АТ, часть активных центров последних блокируется. В таком случае внесенный в лунки меченый АГ будет в меньшей степени (по сравнению с контролем) соединяться с иммобилизованными АТ, о чем можно судить по радиоактивности жидкой части реагирующей смеси (см. рис. 1.30, а).

При проведении РИА *обратным методом* на поверхности лунок сорбируют очищенный немеченый АГ, гомологичный исследуемому АГ. В отдельной пробирке соединяют антигенсодержащий материал с мечеными АТ, специфичными в отношении АГ, иммобилизованного на поверхности лунок. Если в исследуемом материале содержится АГ, способный взаимодействовать с мечеными АТ, активные центры последних полностью или частично блокируются. В таком случае при внесении этой смеси в лунки с сорбированным АГ меченые АТ в меньшем количестве будут фиксироваться на их поверхности, о чем можно судить по степени радиоактивности содержимого лунок в сравнении с контролем (см. рис. 1.30, б).

Наиболее удобным является проведение твердофазного РИА *непрямым методом* с использованием антивидовых меченых АТ (метод двойных АТ) (см. выше). Непрямой метод РИА может быть

использован как для выявления неизвестных АГ, так и АТ (серодиагностика). В обоих случаях применяют антивидовую меченую сыворотку, содержащую АТ против соответствующих гамма-глобулинов. Для проведения серологической диагностики с помощью непрямого метода РИА на поверхности лунок сорбируют АГ, а затем добавляют разведенную сыворотку больного. При наличии в ней соответствующих АТ на поверхности лунок формируется комплекс АГ-АТ. При последующем внесении в лунки меченой изотопом антивидовой сыворотки АТ, содержащиеся в ней, адсорбируются на образовавшемся комплексе АГ-АТ (роль АГ в данном случае выполняют человеческие АТ — гамма-глобулины). Чем больше в сыворотке больного АТ, тем больше будет связанной с поверхностью лунок радиоактивной метки. Определение радиоактивности в жидкой фазе содержимого лунок позволяет судить о количестве АТ в сыворотке больного.

1.4.6. Реакция нейтрализации токсина

В основе этой реакции лежит способность специфической антитоксической сыворотки нейтрализовать экзотоксин. Для проведения реакции исследуемый материал, в котором предполагается наличие экзотоксина, смешивают с антитоксической сывороткой, выдерживают в термостате и вводят животным (морским свинкам, мышам). Контрольным животным вводят фильтрат исследуемого материала, не обработанный сывороткой. В том случае, если произойдет нейтрализация экзотоксина антитоксической сывороткой, животные опытной группы останутся живыми. Контрольные животные погибнут в результате действия экзотоксина.

1.5. Аллергические диагностические пробы

При многих инфекционных заболеваниях за счет активации клеточного иммунитета развивается повышенная чувствительность организма к возбудителям и продуктам их жизнедеятельности. На этом основаны аллергические пробы, используемые для диагностики бактериальных, вирусных, протозойных инфекций, микозов и гельминтозов. Аллергические пробы обладают специфичностью, но нередко они бывают положительными у переболевших и привитых.

Все аллергические пробы подразделяют на две группы — пробы *in vivo* и *in vitro*.

К первой группе (*in vivo*) относятся кожные пробы, осуществляемые непосредственно на пациенте и выявляющие аллергию немедленного (через 20 мин) и замедленного (через 24—48 ч) типов.

Аллергические пробы *in vitro* основаны на выявлении сенсibilизации вне организма больного. Их применяют тогда, когда по тем или иным причинам нельзя произвести кожные пробы, либо в тех случаях, когда кожные реакции дают неясные результаты.

Для проведения аллергических проб используют аллергены — диагностические препараты, предназначенные для выявления специфической сенсibilизации организма. Инфекционные аллергены, используемые в диагностике инфекционных заболеваний, представляют собой очищенные фильтраты бульонных культур, реже взвеси убитых микроорганизмов или АГ, выделенные из них.

В практике применяют выпускаемые промышленностью стандартные аллергены: туберкулин *PPD* (от англ. *purified protein derivate*) — сухое, очищенное белковое вещество микобактерий туберкулеза; антраксин — белковонуклеополисахаридный комплекс корпускулярного АГ *бацилл сибирской язвы*; бруцеллин и малеин — фильтраты бульонных культур возбудителей бруцеллеза и сапа; тулярин — убитая взвесь туляремийных бактерий в 3%-м глицерине и т. д.

1.5.1. Кожные пробы

Инфекционные аллергены вводят, как правило, внутрикожно или наочно, путем втирания в скарифицированные участки кожи. При внутрикожном способе в среднюю треть передней поверхности предплечья специальной тонкой иглой вводят 0,1 мл аллергена. Через 28—48 ч оценивают результаты реакции ГЗТ, определяя на месте введения размеры папулы.

Неинфекционные аллергены (пыльца растений, бытовая пыль, пищевые продукты, лекарственные и химические препараты) вводят в кожу уколом (прик-тест), наочно путем скарификации и втирания или внутрикожной инъекцией разведенного раствора аллергена. В качестве отрицательного контроля используют ИХН, в качестве положительного — раствор гистамина. Результаты учитывают в течение 20 мин (ГНТ) по величине папулы (иногда до 20 мм в диаметре), наличию отека и зуда. Внутрикожные пробы ставят в случае отрицательного или сомнительного результата прик-теста. По сравнению с последним, дозу аллергена уменьшают в 100—5000 раз.

Кожные пробы на наличие ГЗТ широко применяют для выявления инфицированности людей микобактериями туберкулеза (проба Манту), возбудителями бруцеллеза (проба Бюрне), лепры (реакция Митсуды), туляремии, сапа, актиномикоза, дерматомикозов, токсоплазмоза, некоторых гельминтозов и др. Особенности постановки и учета кожных проб при отдельных инфекциях приведены в соответствующих разделах гл. 2.

Так как аллергены, введенные в организм, вызывают дополнительную сенсибилизацию, а в отдельных случаях — тяжелые аллергические осложнения, необходим строгий контроль в подборе контингента для проведения кожных диагностических проб.

1.5.2. Пробы *in vitro*

Эти методы исследования безопасны для больного, достаточно чувствительны, позволяют количественно оценить уровень алергизации организма.

Существуют ситуации, когда лабораторная диагностика аллергии выходит на первый план. К ним относятся:

чрезмерно высокая чувствительность больного к аллергену, сопряженная с риском развития системных (жизнеугрожающих) реакций;

тяжелые аллергические реакции (например, анафилактический шок) в анамнезе;

обширные кожные поражения или выраженный дермографизм; невозможность отмены (на время тестирования) антигистаминных и других препаратов, мешающих постановке кожных проб.

В настоящее время разработаны тесты для определения сенсибилизации, основанные на реакциях *T*- и *B*-лимфоцитов, тканевых базофилов, выявлении общих специфических *IgE* в сыворотке крови и др. К ним относятся реакции торможения миграции лейкоцитов и бласттрансформации лимфоцитов, специфическое розеткообразование, базофильный тест Шелли, реакция дегрануляции тканевых базофилов, а также аллергосорбентные методы (определение специфических *IgE* в сыворотке крови).

Реакция торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ). РТМЛ основана на подавлении миграции моноцитов и других лейкоцитов под действием медиаторов, вырабатываемых сенсибилизированными лимфоцитами, в присутствии специфического аллергена.

Методика. На предметное стекло в двух или нескольких местах (в зависимости от количества испытуемых АГ) наносят по 4 капли исследуемой крови. Затем в одну каплю добавляют 2 капли среды 199, а в остальные — по одной капле этой же среды и одной капле испытуемого АГ. Капли тщательно перемешивают и наполняют смесью стеклянные капилляры длиной 7 мм и диаметром 0,6—0,7 мм. Капилляры запаивают с одного конца и центрифугируют при 1000 мин⁻¹ в течение 5 мин. В результате этого клетки крови оседают в капилляре ровным столбиком высотой в 1/3 капилляра. После этого запаивают второй конец капилляра и помещают капилляр в чашку Петри под углом 10—15°. Чашки с капиллярами выдерживают 24 ч при 37°C.

Результаты реакции учитывают под микроскопом путем измерения высоты столбика миграции клеток (в мм) с поверхности

клеточного осадка в питательную среду как в контрольном, так и опытном капиллярах. Затем вычисляют коэффициент или процент торможения миграции клеток по следующей формуле:

$$\frac{\text{Высота столбика в контроле} - \text{Высота столбика в опыте}}{\text{Высота столбика в опыте}} 100 \%$$

Реакцию считают положительной, если коэффициент торможения миграции клеток составляет 30 % и более.

Реакция бласттрансформации лимфоцитов (РБТ). В основе этой реакции лежит способность нормальных лимфоцитов периферической крови вступать в митоз и превращаться в бластные формы при культивировании их *in vitro* под действием *специфических* факторов — аллергенов и *неспецифических* стимуляторов митогенеза — митогенов (фитогемагглютинин, конканавалин А, липополисахариды и другие вещества).

Методика. Кровь из вены в количестве 3—5 мл переносят в пробирку с 1 мл гепарина, предварительно разведенного 1:100 средой Игла без антибиотиков. В пробирку добавляют 10%-й раствор желатина в количестве, равном $\frac{1}{10}$ объема взятой крови (0,3—0,5 мл) и инкубируют 20—40 мин при 37 °С. Затем отсасывают надосадочную жидкость (плазму) и подсчитывают число клеток обычным способом в камере Горяева. Оптимальным для реакции является содержание в 1 мл $1 \cdot 10^6$ клеток. Если количество клеток окажется большим, взвесь разводят до необходимой концентрации средой Игла, если меньшим, то взвесь центрифугируют и осадок суспензируют в необходимом количестве среды. Затем в суспензию добавляют антибиотики (пенициллин и стрептомицин), разведенные в среде Игла в таком объеме, чтобы конечная концентрация антибиотиков составляла 10 000 ЕД на 100 мл среды. Полученную суспензию разливают в специальные флаконы или пробирки по 2 мл. Один из флаконов является контрольным, в другие добавляют специфические или неспецифические митогены. Пробирки выдерживают 48—72 ч в термостате при 37 °С. Для учета результатов реакции переливают содержимое флаконов в центрифужные пробирки и центрифугируют. Надосадочную жидкость сливают, из осадка делают мазки, окрашивают одним из общепринятых способов и микроскопируют. Подсчитывают 200 лимфоцитов, в том числе количество неизменных клеток, клеток, перешедших в бластную форму, и переходных клеток.

Для определения процента бластной трансформации учитывают сумму бластов и переходных форм на 100 клеток. Аналогичный подсчет делают в контроле. При наличии специального оснащения митотическую активность определяют по интенсивности включения меченного радиоизотопами тимидина.

Известно, что в норме 40—90 % лимфоцитов способны превращаться в бластные формы. Снижение уровня трансформации под действием аллергенов или ФГА свидетельствует о патологии.

Реакция специфического розеткообразования. Розетки — характерные образования, возникающие *in vitro* в результате прилипания эритроцитов к поверхности иммунокомпетентных клеток. Розеткообразование может происходить спонтанно, поскольку Т-лимфоциты человека содержат рецепторы к эритроцитам барана. Спонтанное розеткообразование здоровых людей составляет 52—53 % и служит показателем функционального состояния Т-лимфоцитов. Этот феномен воспроизводится также и в том случае, если используют эритроциты, на которых фиксированы соответствующие аллергены.

Методика. Лимфоциты из крови выделяют с помощью специальных колонок или путем дифференциального центрифугирования в градиенте плотности, отмывают раствором Хенкса и подсчитывают в камере Горяева их количество в 1 мл, а затем для определения жизнеспособности окрашивают трипановым синим. Для танизации эритроцитов к 0,1 мл отмытых эритроцитов на 10 мин добавляют 5 мл таниновой кислоты в разведении 1 : 20 000 с последующей отмывкой в фосфатном буфере (рН 7,2) и суспензированием в 5 мл буфера. Аллерген фиксируют на танизированных эритроцитах при смешивании 1 мл взвеси эритроцитов в фосфатном буфере (рН 6,4) и 1 мл раствора аллергена. Смесь выдерживают в течение 30 мин при 20 °С, отмывают раствором Хенкса, содержащим нормальную человеческую сыворотку (1 : 10), а затем ресуспензируют эритроциты в 2 мл раствора Хенкса.

Лимфоциты, выделенные из крови больного, смешивают с сенсibilизированными эритроцитами в соотношении 1 : 4 (на 1 млн лимфоцитов 4 млн эритроцитов). Для реакции используется следующий контроль: 1) смесь обработанных аллергеном эритроцитов с несенсibilизированными лимфоцитами; 2) необработанные эритроциты с лимфоцитами обследуемого больного. Опытные и контрольные пробирки инкубируют 2 ч при 37 °С, после чего учитывают результаты реакции. Подсчитывают 1000 лимфоцитов и определяют процент «розеток». «Розеткой» считают лимфоцит, к которому прилипло не менее трех эритроцитов. Для оценки сенсibilизации организма тем или иным аллергеном сравнивают результаты опыта и контроля.

Реакция дегрануляции тканевых базофилов. Методика основана на том, что под действием аллергена происходит дегрануляция тканевых базофилов крысы, предварительно сенсibilизированных цитотфильными АТ из сыворотки крови больного.

Методика. На предметные стекла, предварительно обработанные 0,3%-м раствором нейтрального красного, наносят 0,05 мл сыворотки крови больного, 0,05 мл аллергена и 0,05 мл взвеси тканевых базофилов, полученных путем промывания раствором Тирода без глюкозы брюшной полости забитой крысы. Смесь накрывают покровным стеклом, края которого смазывают вазелином. Препараты выдерживают 10—16 мин при

37 °С, а затем микроскопируют. Контроль реакции дегрануляции: 1) взвесь тканевых базофилов и аллерген; 2) взвесь клеток и исследуемая сыворотка. В контроле дегрануляция не должна превышать 10 %. Подсчитывают 100 тканевых базофилов, учитывая нормальные и дегранулированные. Дегрануляция проявляется более слабой окраской гранул, появлением вакуолей, неровными краями клеток, их набуханием, разрывами.

Результаты реакции учитывают по формуле

$$x = H_1 - H_2,$$

где H_1 — % дегрануляции в опыте; H_2 — % дегрануляции в контроле.

При дегрануляции 10—20 % реакцию считают слабopоложительной; при 20—30 % — положительной; при 30 % и более — резко положительной.

Базофильный тест Шелли. Известно, что базофильные гранулоциты человека или кролика также дегранулируются в присутствии сыворотки больного и аллергена, к которому чувствителен данный пациент.

Методика. Лейкоциты получают из гепаринизированной крови путем ее центрифугирования при 2000 об/мин в течение 3 мин. На предметном стекле с предварительно нанесенной краской (0,3%-й раствор нейтрального красного в спирте) смешивают в равных объемах лейкоциты кролика, сыворотку больного и аллерген, накрывают покровным стеклом, заклеивая края в парафин для предупреждения высыхания. Одновременно ставят 3 контроля: 1) лейкоциты кролика + 2 равных объема ИХН; 2) лейкоциты кролика + сыворотка больного + ИХН и 3) лейкоциты кролика + аллерген + ИХН.

Препараты выдерживают в течение 1 ч при комнатной температуре и микроскопируют с иммерсионной системой. Подсчитывают 20—25 базофильных гранулоцитов, учитывая число неизмененных и измененных клеток. Тест считают положительным при дегрануляции не менее чем $\frac{1}{3}$ базофильных гранулоцитов.

Определение антител класса *IgE in vitro*. Лабораторная диагностика заболеваний, в основе которых лежит ГНТ, основана на определении аллергенспецифических *IgE* анти-*IgE*. При использовании радиоактивной метки (см. подразд. 1.4.5) метод носит название радиоаллергосорбентного теста (РАСТ), но чаще в качестве метки используют фермент или флюоресцирующее вещество (ФАСТ). Время анализа — 6—7 часов. Принцип метода: фиксированный на твердой основе известный аллерген инкубируют с сывороткой крови больного; находящиеся в сыворотке специфические *IgE* анти-*IgE* связываются с аллергеном и, таким образом, остаются фиксированными на основе и могут вступать в специфическое взаимодействие с добавляемыми мечеными анти-*IgE*. Результаты реакции обычно выражают в единицах РАСТ или МЕ (при использовании соответствующего стандартного препарата). Результаты аллергосорбентного исследования имеют высокую степень корреляции с результатами кожного тестирования.

1.6. Изучение иммунного статуса организма

Иммунный статус — это комплекс клинико-лабораторных показателей, отражающих структурно-функциональное состояние иммунной системы индивида в данный период времени.

Иммунный статус определяется количеством и активностью циркулирующих лимфоцитов и макрофагов, состоянием системы комплемента, факторов неспецифической резистентности, количеством и функцией киллерных клеток, концентрацией иммуноглобулинов, специфических АТ, интерлейкинов, гормонов тимуса и другими показателями.

Оценка иммунного статуса проводится в клинике при трансплантации органов и тканей, при аутоиммунных и аллергических заболеваниях, для выявления иммунной недостаточности, при назначении лечения и для контроля его эффективности. В зависимости от возможностей лаборатории и обстоятельств оценка иммунного статуса чаще всего базируется на комплексе следующих показателей:

- данные общего клинического обследования;
- состояние факторов неспецифической резистентности;
- сведения о показателях гуморального иммунитета;
- данные о показателях клеточного иммунитета;
- дополнительные тесты.

Общее клиническое обследование. Данные общего клинического обследования включают в себя жалобы пациента, анамнез, описание клинического состояния, общий анализ крови (включая абсолютное число лимфоцитов), биохимические исследования.

Знакомство врача с больным начинается обычно с паспортных данных и жалоб. Уже на этом этапе врач может отметить профессию и стаж работы пациента (наличие профессиональных вредностей). Из жалоб больного следует обратить внимание на рецидивирующую оппортунистическую инфекцию, аллергию. При сборе анамнеза важно узнать, какие заболевания были перенесены в детстве, особенно вирусные и паразитарные, часто оставляющие после себя иммунодефицит. Отмечают наличие наследственных заболеваний, аллергий, злокачественных новообразований. Полезно также расспросить пациента о перенесенных травмах и операциях, о наличии хронических соматических заболеваний и тех лекарственных препаратов, которые он принимает.

При осмотре больного обращают внимание на чистоту кожных покровов и слизистых, на которых можно обнаружить проявления оппортунистических инфекций.

При пальпации и перкуссии обращают внимание на состояние центральных (тимус) и периферических (лимфатические узлы, селезенка) органов иммунной системы, их размер, спаянность с окружающими тканями, болезненность.

При перкуссии и аускультации необходимо фиксировать симптомы, характерные для оппортунистических инфекций при поражении внутренних органов.

Заканчивается этот раздел общим анализом крови, который дает врачу представление о картине крови, о состоянии иммунокомпетентных клеток (абсолютное число лимфоцитов, фагоцитов).

Показатели неспецифической резистентности. Определение показателей неспецифической резистентности организма включает оценку фагоцитоза, системы комплемента, колонизационной резистентности.

Функциональную активность фагоцитов оценивают по их подвижности, адгезии, поглощению, дегрануляции клеток, внутриклеточному киллингу и расщеплению захваченных частиц, образованию активных форм кислорода. С этой целью используют такие тесты, как определение фагоцитарного индекса, НСТ-тест (нитросиний тетразолий), хемилюминесценцию и др.

Систему комплемента обычно оценивают в реакции гемолиза и результат учитывают по 50%-му гемолизу. Колонизационную резистентность определяют по степени дисбиоза различных биотопов организма (чаще всего дисбиоз толстой кишки).

Показатели гуморального иммунитета. Показателями гуморального иммунитета являются: иммуноглобулины разных классов в сыворотке крови, специфические АТ, катаболизм иммуноглобулинов, гиперчувствительность немедленного типа, количество *B*-лимфоцитов в периферической крови, бласттрансформация *B*-лимфоцитов под действием *B*-клеточных митогенов и другие тесты.

Концентрацию иммуноглобулинов разных классов в сыворотке крови обычно определяют методом радиальной иммунодиффузии по Манчини. Титр специфических АТ (изогемагглютинины групп крови, АТ, образующиеся после вакцинации, например противокоревые или противостолбнячные, и др.) в сыворотке крови выявляют с помощью различных иммунологических реакций: РА, РНГА и др. Для определения катаболизма иммуноглобулинов используют радиоизотопные метки.

Число *B*-лимфоцитов в периферической крови выявляют с помощью кластерного анализа (определение специфических рецепторов с помощью моноклональных АТ) или реакции розеткообразования ЕАС-РОК (эритроциты в присутствии АТ и комплемента образуют розетки с *B*-лимфоцитами).

Бласттрансформация *B*-лимфоцитов происходит при их стимуляции *B*-клеточными митогенами, такими, как туберкулин, лактонос и др. При оптимальных условиях культивирования показатель бластной трансформации может достигать 80 %. Подсчет бластов проводят под микроскопом, с использованием специальных

гистохимических методов окраски или с помощью радиоактивной метки (по включению в ДНК клетки тимидина, меченного тритием).

Показатели клеточного иммунитета. Определение показателей клеточного иммунитета, характеризующих иммунный статус организма, включает постановку кожных проб с аллергенами, контактную сенсибилизацию динитрохлорбензолом (ДНХБ), определение количества *T*-лимфоцитов в периферической крови и субпопуляций *T*-лимфоцитов, бласттрансформацию *T*-лимфоцитов под действием *T*-клеточных митогенов, определение гормонов тимуса, а также уровня секретируемых цитокинов.

Для постановки кожных аллергических проб используются АГ, к которым в норме должна быть сенсибилизация, например проба Манту с туберкулином. Для оценки индукции первичного иммунного ответа используют контактную сенсибилизацию ДНХБ.

Число *T*-лимфоцитов в периферической крови определяют, используя реакцию розеткообразования *E-РОК* (эритроциты барана образуют с *T*-лимфоцитами спонтанные розетки); субпопуляции *T*-лимфоцитов — с помощью реакции розеткообразования *EA-РОК*. На мембране *T*-хелпера имеется рецептор к *Fc*-фрагменту *IgM*, а на мембране *T*-супрессора — рецептор к *Fc*-фрагменту *IgG*, поэтому *T*-хелперы образуют розетки с эритроцитами, покрытыми антиэритроцитарными АТ класса *IgM*, а супрессоры образуют розетки с эритроцитами, покрытыми антиэритроцитарными АТ класса *IgG*.

Более точным и современным методом определения популяций и субпопуляций *T*-лимфоцитов является кластерный анализ, основанный на использовании моноклональных АТ к рецепторам лимфоцитов и проточного цитофлуориметра. После определения субпопуляций *T*-лимфоцитов рассчитывают соотношение хелперов и супрессоров — T_4/T_8 (в норме оно около двух).

Для определения бласттрансформации *T*-лимфоцитов их стимулируют такими *T*-клеточными митогенами, как конканавалин *A* или фитогемагглютинин. Под влиянием митогенов зрелые лимфоциты трансформируются в лимфобласты, которые можно подсчитать под микроскопом или обнаружить по радиоактивной метке.

Оценку гормонов тимуса чаще всего проводят, определяя уровни $\alpha 1$ -тимозина и тимулина, отражающих функции эпителиальных клеток стромы тимуса. Для выявления уровня секретируемых цитокинов (интерлейкины, миелопептиды и др.) наиболее перспективными являются иммуноферментные методы, основанные на применении моноклональных АТ к двум различным эпитопам цитокина. С этой целью можно также поставить РТМЛ.

Дополнительные тесты. В качестве дополнительных тестов для оценки иммунного статуса можно использовать определение бак-

терицидности сыворотки, содержания С-реактивного белка в сыворотке крови, ревматоидных факторов и других аутоантител, титрование С₃, С₄ компонентов комплемента.

Таким образом, оценка иммунного статуса проводится на основании постановки большого числа лабораторных тестов, позволяющих оценить состояние гуморального, клеточного звена иммунной системы и факторов неспецифической резистентности. Некоторые из предложенных тестов сложны в исполнении, требуют дорогостоящих иммунохимических реагентов и лабораторного оборудования, а также высокой квалификации персонала и доступны ограниченному кругу лабораторий. Все тесты условно делят на два уровня (табл. 1.8).

Таблица 1.8

Оценка иммунного статуса при скрининговых и углубленных исследованиях

Тест	
1-го уровня	2-го уровня
Определение количества и морфологии лимфоцитов в периферической крови (абс. и %)	Гистохимический анализ лимфоидных органов
ЕАС-розеткообразование	Анализ поверхностных маркеров мононуклеарных клеток с использованием моноклональных АТ
Определение сывороточных иммуноглобулинов	Бласттрансформация В- и Т-лимфоцитов
Определение фагоцитарной активности лейкоцитов	Определение цитотоксичности
Кожные тесты	Определение активности ферментов, ассоциированных с иммунной недостаточностью
Рентгенография и рентгеноскопия лимфоидных органов, а также других внутренних органов (прежде всего легких) в зависимости от клинических показаний	Определение синтеза и секреции цитокинов
	Определение гормонов тимуса
	Анализ респираторного взрыва фагоцитов
	Определение компонентов комплемента
	Анализ смешанных клеточных культур

Тесты 1-го уровня могут быть выполнены в любой клинической иммунологической лаборатории первичного звена здравоохранения. Они используются для первичного выявления лиц с иммунопатологией.

При определении каких-либо отклонений от нормы для более точной диагностики могут быть использованы тесты 2-го уровня, которые ставят в специализированных лабораториях.

1.7. Молекулярно-биологические методы диагностики

Молекулярно-биологические методы диагностики позволяют обнаружить в образцах, взятых от больного, при вскрытии или из окружающей среды молекулы НК возбудителя. Их специфичность обусловлена *индивидуальностью* геномов — нуклеотидных последовательностей ДНК и РНК организмов и основана на принципе *комплементарности* — соответствии друг другу нуклеотидных пар (А-Т, Г-Ц), позволяющем гибридизоваться сходным фрагментам НК (в том числе эталонному и искомому фрагментам). Высокую чувствительность эти методы приобрели с применением полимеразной цепной реакции (ПЦР).

1.7.1. Полимеразная цепная реакция

Суть ПЦР состоит в циклическом удвоении (амплификации) определенного участка ДНК с помощью специфических праймеров (затравок) особых ферментов-полимераз. После первого цикла из одного фрагмента ДНК образуется два, после второго — четыре и далее увеличение количества ДНК идет в геометрической прогрессии. В конечном итоге, даже если в образце присутствовала всего одна молекула НК, образуется достаточное количество ДНК, чтобы ее можно было легко выявить обычными физико-химическими методами — хроматографией или электрофорезом.

Для того чтобы удвоение (амплификация) началось, необходимо иметь олигонуклеотидную последовательность из 20—30 аминокислотных остатков, комплементарную определенному участку ДНК возбудителя (праймер). Праймеры получают, исходя из известных генов различных возбудителей, в специальных аппаратах — синтезаторах.

Необходимо подчеркнуть, что обязательным условием проведения полимеразной цепной реакции является знание нуклеотидной последовательности того или иного объекта исследования (вирус, бактерия и др.). В настоящее время в банках данных имеются практически полные сведения о геноме различных патогенных микробов.

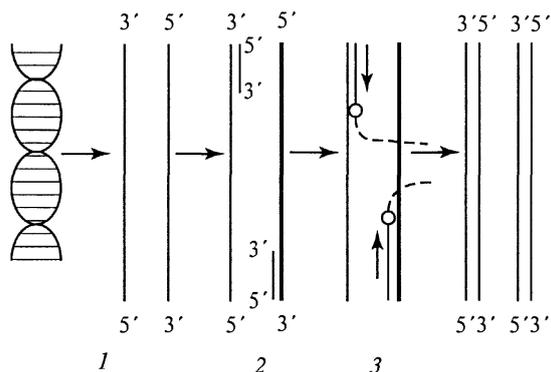


Рис. 1.31. Схема этапов ПЦР:

1 — денатурация («плавление») ДНК; 2 — присоединение («отжиг») праймеров; 3 — достраивание комплементарной нити ДНК (элонгация)

Для проведения ПЦР необходимо два праймера, каждый из которых комплементарен одной из цепей двунитчатой молекулы ДНК. При этом 3'-концы этих синтетических олигонуклеотидов должны быть направлены навстречу друг другу (рис. 1.31).

Для начала реакции в одной пробирке собирают: исследуемую ДНК, два праймера, дезоксинуклеозид-трифосфаты четырех видов, фермент полимеразу, выделенную из термофильных микроорганизмов *Thermus aquaticus* и буферную смесь, оптимальную для работы данной полимеразы. Полученную смесь прогревают в течение 1 мин при 94 °С, при этом комплементарные нити ДНК разъединяются. Этот этап называют денатурацией ДНК («плавлением»).

Затем температуру снижают до 45—65 °С (в зависимости от состава олигонуклеотидов) и выдерживают ее 1,0—1,5 мин. При этом к образовавшимся в результате денатурации одноцепочечным ДНК присоединяются праймеры — один к 3'-концу выбранного для удвоения участка, второй — к 5'-концу. Этот этап называют «отжигом». На третьем этапе поддерживается температура 72 °С. Это оптимальная температура для работы применяемой в ПЦР полимеразы. Данный фермент, используя дезоксинуклеозидтрифосфаты, содержащиеся в смеси, достраивает комплементарные цепи ДНК, начиная с 3'-концов праймеров навстречу друг другу. Этот этап называется «элонгация» (удлинение).

Циклическое повторение трех приведенных температурных режимов выполняется с помощью автоматических устройств — термоциклеров (амплификаторов).

Как правило, проводится 30 циклов, что теоретически позволяет получить 2^{30} копий участка ДНК возбудителя.

1.7.2. Секвенирование ДНК

Секвенирование ДНК с использованием принципов полимеразного копирования включает следующие этапы.

1. С помощью ПЦР накапливают достаточное количество копий исследуемого участка ДНК.

2. С помощью щелочного гидролиза полученные молекулы ДНК нарезают на фрагменты различной длины. Например, если исследуется последовательность длиной в 5 нуклеотидов, после этого этапа будет получена смесь отрезков ДНК длиной 1, 2, 3, 4 и 5 нуклеотидов (рис. 1.32).

3. К полученной смеси добавляют дидезоксинуклеотиды (аденин, тимидин, гуанин и цитозин), каждый из которых помечен своим красителем. Меченые дидезоксинуклеотиды присоединяются к комплементарным нуклеотидам на 3'-конце каждого фрагмента. И дальнейшее удлинение цепочки на этом прекращается в силу особенностей химической структуры дидезоксинуклеотидов. Таким образом, фрагменты разной длины оказываются помеченными разными метками в зависимости от того, какой нуклеотид находится на их 3'-конце.

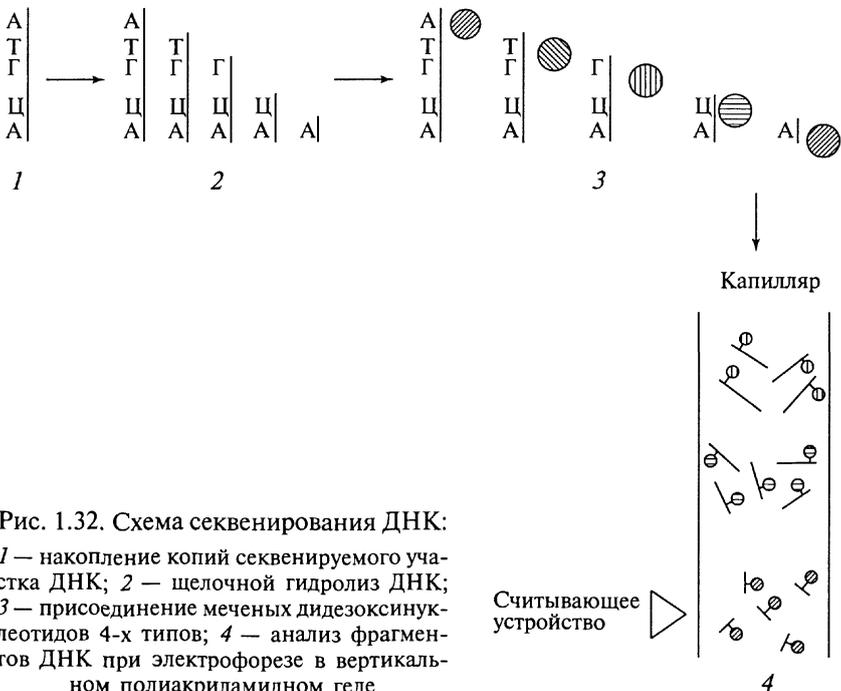


Рис. 1.32. Схема секвенирования ДНК:

1 — накопление копий секвенируемого участка ДНК; 2 — щелочной гидролиз ДНК; 3 — присоединение меченых дидезоксинуклеотидов 4-х типов; 4 — анализ фрагментов ДНК при электрофорезе в вертикальном полиакриламидном геле

4. Полученная смесь меченых фрагментов ДНК подвергается электрофорезу в денатурирующем вертикальном полиакриламидном геле. При этом первыми будут двигаться фрагменты, имеющие наименьшую молекулярную массу — в нашем примере цепочки ДНК длиной в 1 нуклеотид. Все они будут нести метку, соответствующую этому нуклеотиду — первому в последовательности. Следующими мимо оптического датчика пройдут цепочки ДНК длиной в 2 нуклеотида — метка на их конце будет соответствовать второму нуклеотиду в последовательности исследуемой ДНК. И так далее, пока последними не пройдут наиболее длинные фрагменты. Следовательно, когда электрофорез закончится, будет получена четкая последовательность нуклеотидов в исследуемом фрагменте.

Электрофорез производится в автоматическом режиме с помощью специального аппарата — секвенатора. Фрагменты ДНК проходят в геле, заполняющем капилляры аппарата, мимо лазерного устройства, считывающего сигналы специфической метки. Полученные результаты обрабатываются компьютером, который и выстраивает вероятную последовательность нуклеотидов. При использовании секвенатора вся вышеописанная процедура является относительно несложной.

1.7.3. Гибридизация нуклеиновых кислот

Гибридизация — это процесс, в ходе которого одноцепочечная НК-мишень связывается с зондом — комплементарной молекулой, помеченной радиоактивным изотопом или ферментом. В качестве зондов могут использоваться как ДНК, так и РНК. ДНК-зонды являются двухцепочечными и перед применением их необходимо денатурировать (например, нагреванием), чтобы получить одноцепочечные фрагменты.

РНК-зонды, как правило, одноцепочечные молекулы, и их денатурация перед применением не требуется. Поскольку в исследуемом материале, как правило, присутствует множество различных НК, зонд должен вначале «отыскать» в этой сложной смеси своего комплементарного «партнера» и только потом образовать с ним комплекс.

Если гибридизация проводится не в растворе, а на фильтрах, этот метод называют блот-гибридизацией.

Существует два способа переноса НК на фильтры:

1. Прямое нанесение растворов НК на фильтр (дот- или слот-блоты)

2. Перенос НК на мембранные фильтры после их фракционирования в агарозном геле (Саузерн- или Нозерн-блоты).

Дот-блот позволяет ответить только на один вопрос: есть ли в данном образце искомая последовательность; как правило, дот-

блот используется для обнаружения НК возбудителя в материале от больного.

Саузерн- и Нозерн-блоты позволяют обнаружить изменения в размере молекул, т.е. выявить возможные структурные нарушения. Как правило, эти модификации используются для выявления генетических нарушений на уровне макроорганизма и потому подробно здесь не рассматриваются.

Методика дот-блот гибридизации ДНК. Исследование проводят в несколько этапов.

1. Исследуемую ДНК обрабатывают ультразвуком для получения отдельных коротких фрагментов (70 Вт, 1—2 мин).

2. Денатурируют полученные фрагменты в кипящей водяной бане (10 мин).

3. Наносят ДНК непосредственно на мембранный фильтр.

4. Фиксируют ДНК на фильтре: а) прожариванием при 80 °С в вакууме (нитроцеллюлозный фильтр) либо б) УФ-облучением в течение 3—5 минут (нейлоновый фильтр).

5. Проводят предгибридизацию со специальным буфером при 65 °С в течение 2—4 часов.

6. Добавляют гибридизационный буфер, содержащий денатурированный зонд, и проводят гибридизацию при 65 °С в течение 16 часов.

7. Выявляют наличие или отсутствие метки методами РИА или ИФА.

Дот-блот гибридизация РНК проводится практически по той же схеме, но для денатурации РНК используют глиоксаль или формальдегид, а гибридизацию проводят при 42 °С.

ГЛАВА 2 МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ОТДЕЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Биологическая классификация и клиническое значение бактерий претерпевают изменения по мере введения в практику новых методов исследования и накопления клинического опыта. Современное состояние этого вопроса отражено в нижеприведенных таблицах (табл. 2.1, 2.2).

В соответствии с 9-м изданием «Определителя бактерий» Берджи, патогенные и условно-патогенные для человека бактерии относятся к эубактериям трех категорий:

I — грамотрицательные;

II — грамположительные;

III — лишенные клеточной стенки (микоплазмы).

Эти бактерии входят в 14 из 35 известных групп бактерий.

блот используется для обнаружения НК возбудителя в материале от больного.

Саузерн- и Нозерн-блоты позволяют обнаружить изменения в размере молекул, т.е. выявить возможные структурные нарушения. Как правило, эти модификации используются для выявления генетических нарушений на уровне макроорганизма и потому подробно здесь не рассматриваются.

Методика дот-блот гибридизации ДНК. Исследование проводят в несколько этапов.

1. Исследуемую ДНК обрабатывают ультразвуком для получения отдельных коротких фрагментов (70 Вт, 1—2 мин).

2. Денатурируют полученные фрагменты в кипящей водяной бане (10 мин).

3. Наносят ДНК непосредственно на мембранный фильтр.

4. Фиксируют ДНК на фильтре: а) прожариванием при 80 °С в вакууме (нитроцеллюлозный фильтр) либо б) УФ-облучением в течение 3—5 минут (нейлоновый фильтр).

5. Проводят предгибридизацию со специальным буфером при 65 °С в течение 2—4 часов.

6. Добавляют гибридизационный буфер, содержащий денатурированный зонд, и проводят гибридизацию при 65 °С в течение 16 часов.

7. Выявляют наличие или отсутствие метки методами РИА или ИФА.

Дот-блот гибридизация РНК проводится практически по той же схеме, но для денатурации РНК используют глиоксаль или формальдегид, а гибридизацию проводят при 42 °С.

ГЛАВА 2 МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ОТДЕЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Биологическая классификация и клиническое значение бактерий претерпевают изменения по мере введения в практику новых методов исследования и накопления клинического опыта. Современное состояние этого вопроса отражено в нижеприведенных таблицах (табл. 2.1, 2.2).

В соответствии с 9-м изданием «Определителя бактерий» Берджи, патогенные и условно-патогенные для человека бактерии относятся к эубактериям трех категорий:

I — грамотрицательные;

II — грамположительные;

III — лишенные клеточной стенки (микоплазмы).

Эти бактерии входят в 14 из 35 известных групп бактерий.

Патогенные и условно-патогенные для человека бактерии

Группа	Категория	Группа (категория) бактерий	Таксоны
1	I	Спирохеты	Роды <i>Treponema</i> , <i>Borrelia</i> , <i>Leptospira</i>
2	I	Аэробные и микроаэрофильные подвижные спиральные и изогнутые грамотрицательные бактерии	Роды <i>Campylobacter</i> , <i>Helicobacter</i> , <i>Spirillum</i> , <i>Wolinella</i>
4	I	Грамотрицательные аэробные и микроаэрофильные палочки и кокки	Роды <i>Achromobacter</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Agrobacterium</i> , <i>Afipia</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Bacteroides</i> (виды <i>B. gracilis</i> и <i>B. urealyticus</i>) <i>Bordetella</i> , <i>Brucella</i> *, <i>Burkholderia</i> *, <i>Flaviomonas</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Francisella</i> *, <i>Kingella</i> , <i>Legionella</i> * <i>Moraxella</i> , <i>Morococcus</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Stenotrophomonas</i>
5	I	Факультативно-анаэробные грамотрицательные палочки: 1) семейства энтеробактерий 2) вибрионов 3) пастерелл 4) не отнесенные к ним роды	1) роды <i>Cedecea</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Edwardsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Ewingella</i> , <i>Hafnia</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Kluyvera</i> , <i>Leclercia</i> , <i>Morganella</i> , <i>Pantoea</i> , <i>Proteus</i> , <i>Providencia</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> , <i>Shigella</i> , <i>Tatumella</i> , <i>Yersinia</i> *; 2) роды <i>Aeromonas</i> , <i>Plesiomonas</i> , <i>Vibrio</i> * 3) роды <i>Actinobacillus</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Pasteurella</i> 4) роды <i>Calymmobacterium</i> , <i>Capnocytophaga</i> , <i>Cardiobacterium</i> , <i>Chromobacterium</i> , <i>Eikenella</i> , <i>Gardnerella</i> , <i>Streptobacillus</i>
6	I	Грамотрицательные анаэробные прямые, изогнутые и спиральные бактерии	Роды <i>Anaerobiospirillum</i> , <i>Anaerorhabdus</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Bilophila</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Porphyromonas</i> , <i>Prevotella</i>
8	I	Анаэробные грамотрицательные кокки	род <i>Veillonella</i>

Группа	Категория	Группа (категория) бактерий	Таксоны
9	I	Риккетсии и хламидии: 1) семейства риккетсий 1) бартоnell 1) хламидий	1) роды <i>Coxiella*</i> , <i>Ehrlichia</i> , <i>Rickettsia*</i> 2) род <i>Bartonella</i> 3) род <i>Chlamydia</i> , <i>Chlamydophila</i>
17	II	Грамположительные кокки	Роды <i>Alloiococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Gemella</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Peptococcus</i> , <i>Peptostreptococcus</i> , <i>Planococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Stomatococcus</i> , <i>Streptococcus</i>
18	II	Спорообразующие грамположительные палочки и кокки	Роды <i>Bacillus*</i> , <i>Clostridium</i>
19	II	Не образующие спор грамположительные палочки правильной формы	роды <i>Erysipelothrix</i> , <i>Listeria</i>
20	II	Не образующие спор грамположительные палочки неправильной формы	Роды <i>Actinomyces</i> , <i>Arcanobacterium</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Gardnerella</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Mobiluncus</i> , <i>Propionibacterium</i> , <i>Rothia</i>
21	II	Микобактерии	Род <i>Mycobacterium</i>
22, 25, 26	III	Актиномицеты	Роды <i>Actinomadura</i> , <i>Gordona</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Oerskovia</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Tsakamurella</i>
30	III	Микоплазмы	Роды <i>Mycoplasma</i> , <i>Ureaplasma</i>

Примечание. Подчеркнуты роды, содержащие один или несколько безусловно-патогенных видов (вариантов); * отмечены роды, в состав которых входит один или несколько возбудителей особо опасных инфекций.

Отбирая материал для обнаружения возбудителя той или иной инфекции и трактуя полученный результат микробиологического исследования, врач должен ориентироваться не только на вид и вариант выделенного микроорганизма, но и его патогенный потенциал, численность (для условно-патогенных), а также биотоп, из которого он выделен.

Таблица 2.2

**Частота обнаружения бактериальных видов
в материале из различных биотопов тела человека
и их этиологическое значение**

Бактерии	Частота обнаружения и этиологическое значение					
	РТ	ЖКТ	МПТ	КР	Г	У
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	—	—	—	—	C1	C2
<i>Acidaminococcus fermentans</i>	—	C1	—	—	—	—
<i>Acinetobacter</i> spp.	B2	—	B2	B2	B2	—
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	—	—	—	—	C2	—
<i>Actinomadura madurae</i>	—	—	—	C2	—	—
<i>Actinomyces</i> spp.	A2	—	B2	B2	C2	—
<i>Aerococcus viridans</i>	B1	—	—	—	—	—
<i>Aeromonas</i> spp.	—	B2	—	B2	—	—
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	C2	—	—	C2	—	—
<i>Alcaligenes</i> spp.	—	B2	C2	—	—	—
<i>Anaerobiospirillum succimi producens</i>	C2	—	—	—	—	—
<i>Arachnia propionica</i>	B1	—	—	—	—	—
<i>Arcanobacterium haemolyticum</i>	B3	—	—	C2	—	—
<i>Azotobacter</i> spp.	—	—	—	—	C1	—
<i>Bacillus anthracis</i>	C3	—	—	C3	—	—
<i>Bacillus</i> spp.	B1	B2	C1	B1	B2	—
<i>Bacteroides</i> spp.	A2	A2	A2	B2	C2	C2
<i>Bartonella bacilliformis</i>	—	—	—	C3	—	—
<i>Bartonella henselae</i>	—	—	—	C3	—	—
<i>Bifidobacterium</i> spp.	B1	B1	C1	B2	C2	C2
<i>Bilophila wadsworthia</i>	—	—	C2	—	—	—
<i>Bordetella pertussis</i>	B3	—	—	—	—	—
<i>Borrelia</i> spp.	B1	—	—	—	—	—
<i>Brucella</i> spp.	C3	—	—	—	C3	—

Бактерии	Частота обнаружения и этиологическое значение					
	РТ	ЖКТ	МПТ	КР	Г	У
<i>Calymmatobacterium granulomatis</i>	—	—	C3	—	—	—
<i>Campylobacter</i> spp.	B1	B3	C2	—	—	—
<i>Capnocytophaga</i> spp.	B2	—	—	—	—	—
<i>Cardiobacterium hominis</i>	B1	—	—	—	—	—
<i>Chlamidia</i> spp.	B3	—	B2	—	—	—
<i>Chlamidia trachomatis</i>	—	—	—	—	B3	C2
<i>Clostridium</i> spp.	B2	A2	A2	B2	C2	C2
<i>Corynebacterium diptheriae</i> (токсигенные)	C3	—	—	C3	C3	C3
<i>Corynebacterium</i> spp.	B1	B1	B2	B2	B2	C1
<i>Coxiella burnetii</i>	C3	—	—	—	—	—
<i>Ehrlichia</i> spp.	—	—	—	C3	—	—
<i>Eikenella corrodens</i>	B2	—	—	—	—	—
<i>Enterobacteriaceae</i>	B2	A2	A2	B2	B2	B2
<i>Enterococcus</i> spp.	C1	A2	B2	B2	—	—
<i>Erysi pelothrix</i> spp.	—	—	—	C3	—	—
<i>Eubacrerium</i> spp.	—	A1	—	B2	—	C1
<i>Flavobacterium</i> spp.	C2	—	C2	B2	—	—
<i>Francisella tularensis</i>	C3	—	—	—	C3	—
<i>Fusobacterium</i> spp.	A2	A2	B1	B2	C2	C2
<i>Gardnerella vaginalis</i>	—	—	B2	—	—	—
<i>Gemella</i> spp.	B1	—	—	—	—	—
<i>Haemophilus influenzae</i>	—	—	—	—	—	B3
<i>Haemophilus influenzae</i> биовар III (<i>H. aegyptius</i>)	—	—	—	—	B3	—
<i>Haemophilus ducreyi</i>	—	—	B3	—	—	—
<i>Haemophilus</i> spp.	A2	—	—	—	—	—
<i>Helicobacter pylori</i>	—	B3	—	—	—	—

Продолжение табл. 2.2

Бактерии	Частота обнаружения и этиологическое значение					
	РТ	ЖКТ	МПТ	КР	Г	У
<i>Kingella</i> spp.	C2	—	—	—	—	—
<i>Lactobacillus</i> spp.	B1	B1	A1	—	C2	—
<i>Legionella</i> spp.	B2	—	—	—	—	—
<i>Leptospira interrogans</i>	—	—	C3	—	—	—
<i>Leptospira</i> spp.	—	—	—	C3	C3	—
<i>Leptotrichia buccalis</i>	B1	—	—	—	—	—
<i>Listeria</i> spp.	—	—	C2	C2	—	—
<i>Micrococcus</i> spp.	A1	—	—	A1	—	—
<i>Mobiluncus</i> spp.	—	—	B2	—	—	—
<i>Moraxella catarrhalis</i>	B2	—	B1	—	B1	B2
<i>Moraxella</i> spp.	B1	—	B1	B2	B2	—
<i>Mycobacterium</i> spp.	B2	B2	B2	B2	C2	C2
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	B3	—	—	—	C3	—
<i>Mycoplasma hominis</i>	—	—	B2	—	—	—
<i>Mycoplasma</i> spp.	—	C1	—	—	—	—
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	C3	C3	B3	—	B3	—
<i>Neisseria meningitidis</i>	B2	—	C3	—	B3	—
<i>Neisseria</i> spp.	A1	B1	B1	B2	B1	—
<i>Nocardia</i> spp.	B3	—	—	C2	C3	—
<i>Oerskovia</i> spp.	—	—	—	C2	—	—
<i>Pasteurella</i> spp.	C2	—	—	C2	—	—
<i>Pediococcus</i> spp.	—	C1	—	—	—	—
<i>Peptococcus</i> spp.	—	—	—	—	—	C2
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	A2	B2	B1	B2	C2	C2
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	—	C2	—	C2	—	—
<i>Porphyromonas</i> spp.	A2	—	A2	—	—	—
<i>Prevotella</i> spp.	A2	—	A2	—	—	—
<i>Propionibacterium</i> spp.	—	—	B1	A2	B2	B2

Бактерии	Частота обнаружения и этиологическое значение					
	РТ	ЖКТ	МПТ	КР	Г	У
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	—	—	—	—	—	B2
<i>Pseudomonas</i> spp.	—	B2	B3	B2	B2	—
<i>Rhodococcus</i> spp.	C2	—	—	C2	—	—
<i>Rickettsia</i> spp.	—	—	—	B3	—	—
<i>Rothia dentocariosa</i>	B1	—	—	—	—	—
<i>Ruminococcus bromii</i>	—	C1	—	—	—	—
<i>Selenomonas</i> spp.	C1	B1	—	—	—	—
<i>Spirillum minus</i>	—	—	—	C3	—	—
<i>Staphylococcus</i> spp.	A2	B2	A2	A2	A2	B2
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	B2	—	—	B2	—	—
<i>Stomatococcus mucilaginosus</i>	B1	—	—	—	—	—
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	—	—	—	C2	—	—
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	B2	—	—	—	—	B3
<i>Streptococcus pyogenes</i>	B2	—	—	—	—	—
<i>Streptococcus</i> spp.	A2	B2	B2	B2	B2	B2
<i>Streptomyces somaliensis</i>	—	—	—	C2	—	—
<i>Succinimonas</i> spp.	—	B1	—	—	—	—
<i>Succinivibrio</i> spp.	—	B1	—	—	—	—
<i>Treponema pallidum</i>	—	—	B3	—	B3	—
<i>Treponema</i> spp.	B2	—	—	B3	—	—
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	—	—	B1	—	—	—
<i>Veillonella</i> spp.	A1	B2	—	B2	C2	C2
<i>Vibrio</i> spp.	B1	B2	—	C2	—	C2
<i>Wolinella recta</i>	B1	—	—	—	—	—

Примечания: а) РТ — респираторный тракт, ЖКТ — желудочно-кишечный тракт, МПТ — мочеполовой тракт, КР — кожа и раневое отделяемое, Г — глаза, У — уши; б) присутствуют в клиническом материале: А — часто, В — нечасто, С — редко; в) 1 — редко (если когда-либо) имеют этиологическое значение; 2 — иногда бывают причиной заболевания; 3 — обычно бывают причиной заболевания.

2.1. Грамположительные кокки

2.1.1. Стафилококковая инфекция

Стафилококки могут вызывать оппортунистические, в том числе внутрибольничные инфекции. Наибольшее клиническое значение наряду с «традиционными» видами — *Staphylococcus aureus* (золотистым), *Staphylococcus epidermidis* (эпидермальным) и *Staphylococcus saprophyticus* (сапрофитическим) — имеют так называемые коагулазоотрицательные стафилококки (*S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*, *S. schleiferi*, *S. warneri*). Внутрибольничные инфекции часто обусловлены метициллинрезистентными *S. aureus* (MRSA), имеющими повышенную вирулентность и устойчивость ко многим антимикробным препаратам.

При заболеваниях, вызванных стафилококками, исследуют гной, раневое отделяемое, пунктаты из полостей и абсцессов, материал со слизистых оболочек, кровь, мокроту, мочу, спинномозговую жидкость; в случае пищевых отравлений — рвотные массы, испражнения больных, остатки пищи; при профилактических исследованиях — смывы с инструментов и оборудования, стерилизованные материалы медицинского назначения, воздух.

При открытых гнойных поражениях материал берут ватным тампоном после удаления верхнего слоя гноя, в котором могут находиться непатогенные стафилококки и другие микроорганизмы, попавшие с кожи или из воздуха. При наличии закрытых гнойных очагов делают пункцию и выливают гной из шприца в стерильную пробирку. Отделяемое слизистой оболочки снимают сухим тампоном. Мочу, мокроту собирают в стерильные пробирки и банки. Кровь (5—20 мл), взятую шприцем из локтевой вены, и спинномозговую жидкость с соблюдением правил асептики сеют у постели больного во флакон, содержащий 100—200 мл сахарного бульона (рН 7,2—7,4), или на среду для контроля стерильности. Стафилококки хорошо размножаются и на простых средах, однако лучше использовать обогащенные среды, так как септицемия может быть вызвана не только стафилококками, но и прихотливыми микроорганизмами (стрептококками, анаэробами и др.).

Микроскопия. Гной, мокроту, отделяемое зева и другие материалы, содержащие высокие концентрации возбудителя, подвергают световой микроскопии. Гной густой консистенции вносят в каплю стерильной воды, делают мазок тампоном или петлей и окрашивают по Граму. Шаровидные клетки стафилококков окрашиваются в сине-фиолетовый цвет и располагаются небольшими скоплениями, попарно или короткими цепочками (см. цв. вклейку, рис. 2, а). Микроскопия не может служить единственным методом лабораторной диагностики, так как не позволяет с уверен-

ностью дифференцировать, например, стафилококки и стрептококки, поэтому наряду с микроскопическим проводят бактериологическое исследование материала.

Бактериологическое исследование. В 1-й день исследования петлей или шпателем материал засевают в чашки с 5%-м кровяным, а также желточно- или молочно-солевым агаром, которые инкубируют 18—24 ч при 37 °С и столько же — на свету при комнатной температуре (для более четкого пигментирования колоний). Солевые среды ввиду высокого содержания хлорида натрия являются селективными для стафилококков, рост большинства сопутствующих микроорганизмов на них подавляется.

На 2-й день изучают выросшие колонии: стафилококки образуют выпуклые, ровные непрозрачные колонии средней величины белого, лимонно-желтого или золотистого цвета (гемолитические или негемолитические). Пигментообразование лучше заметно на молочно-солевом агаре. На желточно-солевом агаре большая часть патогенных стафилококков вызывает лецитиназную (лецитовителлазную) реакцию, проявляющуюся в образовании вокруг колонии зоны помутнения с радужным венчиком в отраженном свете. При микроскопии в мазках обнаруживают грамположительные кокки, расположенные гроздьями.

Для выделения чистой культуры подозрительные колонии пересевают на скошенный ПА.

На 3-й день проверяют чистоту выделенной культуры, ставят тесты и делают посевы для ее идентификации (табл. 2.3). Обязательно определяют чувствительность штамма к антибиотикам, а при необходимости — фаговар (с использованием набора типовых стафилококковых бактериофагов).

На 4-й день проводят окончательную идентификацию культур по культурально-морфологическим, биохимическим тестам, чувствительности к антибиотикам и др.

От сходных по морфологии бактерий стафилококки дифференцируют по каталазному и бензидиновому тестам, устойчивости к бацитрацину (0,04 ЕД, диск), лизостафину (200 мкг/мл), эритромицину (0,4 мкг/мл) и фуразолидону (100 мкг, диск), а также другим тестам.

Для выявления *плазмокоагулазы* выделенную агаровую культуру в виде густой взвеси вносят в пробирку с 0,5 мл цитратной плазмы кролика и тщательно эмульгируют. Пробирки выдерживают в вертикальном положении при 37 °С и наблюдают за появлением коагуляции — свертывания плазмы (обычно положительный результат отмечается через 2—6 ч).

Для проведения *реакции хлопьеобразования* (аутоагглютинации) в пробирку наливают плазму и на расстоянии 0,5 см выше ее уровня растирают петлей чистую агаровую культуру стафилококка, затем петлей вносят плазму в культуру. При положительном результате

Таблица 2.3

Дифференциальные признаки клинически значимых стафилококков

Признак	Вид						
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. schleiferi</i>	<i>S. warneri</i>
Каротиноидный пигмент	+	—	—	V	V	—	V
Плазмокоагулаза	+	—	—	—	V	—	—
Хлопьеобразующий фактор	+	—	—	—	(+)	+	—
Термостабильная ДНКаза	+	—	—	—	—	+	—
Щелочная фосфатаза	+	+	—	—	—	+	—
Уреаза	V	+	+	—	V	—	+
Устойчивость к новобиоцину	—	—	+	—	—	—	—
Устойчивость к полимиксину В	+	+	—	—	V	—	—
Анаэробная ферментация до кислоты:							
маннита	+	—	V	V	—	—	V
трегалозы	+	—	+	+	+	V	+
маннозы	+	(+)	—	—	+	+	—
мальтозы	+	+	+	+	+	—	(+)
сахарозы	+	+	+	+	+	—	+
туранозы	+	V	+	V	V	—	V

Примечание. «—» — отрицательная реакция; «+» — положительная реакция; «(+) — слабоположительная реакция; «V» — вариабельная реакция.

на стенке пробирки сразу же появляются отчетливые хлопья агглютината.

Для определения *ДНКазной активности* суточные культуры стафилококков засевают бляшками в чашку Петри с ДНК-содержащим агаром.

Навеску нуклеиновой кислоты из расчета 10 мг/мл ДНК помещают в дистиллированную воду, добавляя на каждые 20 мл воды 1 мл 0,8%-го раствора едкого натра, и прогревают до полного растворения. К расплав-

ленному и охлажденному до 50 °С МПА асептически добавляют полученный раствор ДНК до концентрации 1 мг/мл (на 9 мл МПА — 1 мл раствора ДНК). Используют также сухой ДНК-содержащий агар.

Через сутки в чашку вносят 5 мл 1 *n* раствора соляной кислоты и через 3—5 мин наблюдают появление вокруг бляшек зоны просветления, свидетельствующей о наличии ДНКазы.

Лизоцимную активность стафилококков считают дополнительным признаком патогенности. Для ее обнаружения засевают бляшками суточную агаровую культуру стафилококка на плотную питательную среду с глубинным посевом суспензии *Micrococcus luteus*. При выделении лизоцима вокруг колонии стафилококков образуются зоны лизиса микрококка.

Определение фаговара культур имеет важное эпидемиологическое значение для выявления источника инфекции и путей заражения. Основной международный набор стафилококковых фагов состоит из 21 типа, разделенных на 4 группы. Наибольшее значение при внутрибольничных стафилококковых инфекциях имеют представители фаговаров 77 и 80. Вместе с тем довольно часто (до 40 % случаев) встречаются нетипируемые штаммы стафилококков.

Для *выделения гемокультуры* стафилококков посев крови в сахарном бульоне выдерживают при 37 °С в течение 18—24 ч. Стафилококк вызывает равномерное помутнение среды. На 2-й день (или позже, в зависимости от темпов размножения) из бульонной культуры готовят и микроскопируют окрашенные по Граму мазки, затем пересевают ее на скошенный МПА и в чашку с кровавым агаром для выявления гемолитической активности. На 3-й день получают культуру на скошенном агаре и изучают так же, как культуру, выделенную из гноя или других материалов.

Для посева экссудата, гноя из не вскрытых абсцессов, флегмон используют МПА или 5%-й кровавый агар, инкубируют при 37 °С в течение 18—24 ч, выделяют чистую культуру и проводят ее идентификацию вышеописанными методами.

При *пищевых отравлениях* исследуемый материал микроскопируют, затем сеют в чашки с МПА и в бульон, содержащий 1 % глюкозы (для обогащения). Материал, загрязненный сопутствующей микрофлорой, засевают на кровавый агар, содержащий 6—7 % хлорида натрия. На такой среде подавляется рост энтеробактерий и бацилл, а стафилококки растут хорошо и проявляют гемолитическую активность. Посевы инкубируют при 37 °С. На следующий день изучают колонии, выделяют и, далее, идентифицируют чистые культуры. Стафилококки, вызывающие пищевые отравления, образуют золотистый, реже белый пигмент, вызывают гемолиз и коагулируют плазму.

Для выявления *продукции энтеротоксина* культуру стафилококка засевают в специальную питательную среду.

На 1000 мл дистиллированной воды добавляют 20 г пептона, 1 г гидрофосфата натрия, 1 г гидрофосфата калия, 5 г хлорида натрия, 0,1 г хлорида кальция, 0,2 г хлорида магния, 0,8 агар-агара (рН 7,0—7,2). Стерилизуют 20 мин при 115 °С.

Посевы помещают в атмосферу с 20 % CO₂ и инкубируют при 37 °С в течение 3—4 сут, а затем фильтруют через мембранные фильтры № 3 и 4. Полученный фильтрат объемом 10—15 мл смешивают с равным количеством теплого молока и скармливают котяткам в возрасте 1—2 мес или же вводят фильтрат им в желудок с помощью зонда. При наличии энтеротоксина через 30—60 мин у котят возникает рвота — основной признак отравления, а через 2—3 ч появляется понос, продолжающийся в течение 2—3 дней, в тяжелых случаях возможен летальный исход. Фильтрат можно вводить котяткам внутрибрюшинно, после прогревания его при температуре 100 °С в течение 30 мин (для инактивации термолабильных фракций токсина). В настоящее время токсигенность выделенных культур стафилококков определяют в опыте *in vitro* с помощью реакции диффузной преципитации в геле (см. подразд. 1.4.2).

Стафилококки могут находиться в воздухе операционных перевязочных, родильных палат и других больничных помещений. Для их обнаружения делают посевы воздуха на желточно-солевой агар.

К 100 мл расплавленного МПА, содержащего 7,5 г хлорида натрия, добавляют 20 мл стерильной желточной взвеси, перемешивают и разливают в чашки. Для приготовления желточной взвеси желток куриного яйца асептически извлекают, отмывают от белка, помещают во флакон с бусами, добавляют 200 мл ИХН и встряхивают до полного смешивания; хранят в холодильнике.

Серологическое исследование. Для подтверждения стафилококковой инфекции серодиагностика имеет вспомогательное значение. Определение стафилококкового антитоксина в сыворотке крови при диагностике хронических стафилококковых инфекций (остеомиелит, септикопиемия и др.) имеет большее значение, так как бактериологические исследования, проводимые на фоне массивной антибиотикотерапии, как правило, остаются безрезультатными. Можно использовать РНГА с эритроцитарным стафилококковым антигеном (эритроциты нагружены α-токсином стафилококка).

В основе другой реакции лежит метод подавления гемолитической активности стафилококкового токсина антитоксином сыворотки больного. Для этого к определенной дозе стафилококкового токсина прибавляют сыворотку больного, разведенную 1 : 5, 1 : 10, 1 : 15, 1 : 20 и т.д., тщательно перемешивают и к смеси добавляют 0,05 мл эритроцитов кролика. Результаты реакции учитывают после инкубирования пробирок в течение 1 ч при температуре 37 °С и такого же периода при комнатной температуре.

Количество сыворотки, в смеси с которым гемолиз слабый или не обнаруживается, считают ее титром.

У практически здоровых детей, так же как и у лиц, перенесших, например стафилококковую инфекцию кожи, титр стафилококкового антитоксина не превышает 0,5 — 4 АЕ/мл. У больных с хроническими стафилококковыми инфекциями титр, как правило, выше.

2.1.2. Стрептококковая инфекция

Хотя многочисленные представители рода *Streptococcus* в норме составляют значительную долю нормальной микрофлоры пищеварительного, дыхательного и генитального тракта, некоторые из них могут вызывать оппортунистические инфекции разной локализации и тяжести: фарингиты, ангины, отиты, пневмонии, скарлатину и другие заболевания дыхательного тракта и ЛОР-органов; рожистое воспаление, флегмоны, нагноения ран и другие заболевания кожи и подкожной клетчатки; послеродовые гнойно-воспалительные осложнения, менингит, сепсис. Тяжелыми осложнениями стрептококковой инфекции являются ревматизм и гломерулонефрит. Наибольшее клиническое значение имеют *Streptococcus pyogenes* (пиогенный стрептококк, группа А по Лэнсфилд), *Streptococcus pneumoniae* (пневмококк, см. ниже), *Streptococcus agalactiae* (β-гемолитические стрептококки группы В), β-гемолитические стрептококки групп С и G. В последнее время доказана этиологическая роль стрептококков группы D (эндокардиты, менингиты), а также ряда «зеленящих» стрептококков, постоянно обитающих на слизистых оболочках (бактериемии, эндокардиты, глубокие абсцессы печени и мозга).

При заболеваниях, вызванных стрептококками, материалом для исследования, в зависимости от локализации и формы инфекции, являются гной, кровь, отделяемое слизистой оболочки, моча, мокрота, спинномозговая жидкость, раневое отделяемое. Берут его так же, как при заболеваниях, вызванных стафилококками. При взятии материала из полости рта ополаскивание не проводят, а интервал после приема пищи должен быть не менее 2 ч. Если материал невозможно доставить в лабораторию в течение 2 ч, его помещают в транспортные среды или среду накопления (сахарный бульон, тиогликолевая среда).

Микроскопия. В мазках из гноя, отделяемого слизистой оболочки, окрашенных по Граму, стрептококки располагаются короткими цепочками (см. цв. вклейку, рис. 2, б), иногда в виде диплококков или единичных кокков. В последнем случае стрептококки нельзя отличить от стафилококков, поэтому для более детального изучения обнаруженных кокков обязательно проводят бактериологическое исследование. Это необходимо и для правиль-

ного выбора препаратов этиотропного лечения. В качестве экспресс-диагностики иногда стрептококки определяют в нативном материале методом иммунофлюоресценции.

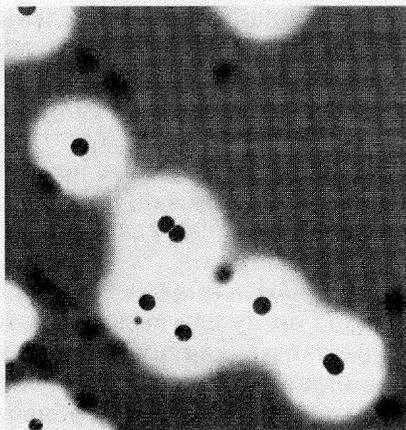
Бактериологическое исследование. Гной, отделяемое слизистой оболочки, мочу, мокроту, спинномозговую жидкость сеют в чашку Петри с 5%-м кровяным агаром (лучше использовать дефибрированную баранью кровь) и в пробирку с сахарным бульоном. Для выделения стрептококков из контаминированного материала используют селективные среды (в кровяной агар и среду накопления вводят антибиотики — колистин, налидиксовую кислоту, которые подавляют рост сопутствующих микроорганизмов). Хотя стрептококки дают рост на воздухе, посеvy лучше инкубировать в анаэробной атмосфере при 37 °С. Инкубация в атмосфере CO₂ стимулирует рост бета-гемолитических стрептококков, не относящихся к группе А. С этими целями применяют анаэроустат или эксикатор с горящей свечой.

Через 24—48 ч изучают колонии и рост в сахарном бульоне. В сахарном бульоне большинство пиогенных стрептококков дает придонный или пристеночный рост в виде хлопьев или зерен, вся среда остается прозрачной, другие стрептококки могут давать интенсивное помутнение среды с образованием компактного осадка. На плотных средах *Streptococcus pyogenes* растет с образованием нескольких типов колоний: мелких, плоских, суховатых колоний зёрнистой структуры (вирулентные штаммы, содержащие М-протеин); относительно крупных, блестящих, вязких с ровным краем (вирулентные, содержащие капсулу). По росту на кровяных средах выделяют три группы стрептококков: β -гемолитические (вызывают полный гемолиз эритроцитов с обесцвечиванием и просветлением среды вокруг колоний), α -гемолитические (вызывают неполный гемолиз с формированием зеленоватой зоны вокруг колоний, обусловленной образованием метгемоглобина) и негемолитические (среда вокруг колоний не изменена). «Зеленящие» стрептококки образуют блестящие или матовые мелкие колонии сероватого цвета. Негемолитические стрептококки, как правило, не имеют клинического значения. На рис. 2.1 представлены характерные для стрептококков гемолитические реакции.

В окрашенных мазках из колоний стрептококков не отмечается типичного расположения кокков в виде цепочек. Клетки располагаются одиночно, попарно или небольшими скоплениями. В мазке из культуры в жидкой среде обнаруживают типичные цепочки стрептококков.

Подозрительные колонии пересевают на кровяной агар или в бульонную среду для накопления чистой культуры и ее дальнейшей идентификации. В ходе идентификации учитывают культурально-морфологические особенности культуры, ставят каталазный тест, определяют группу, вид и серовар стрептококка.

Рис. 2.1. Гемолитические реакции стрептококков на кровяном агаре: обширные зоны β -гемолиза вокруг колоний *Streptococcus pyogenes* (светлые) и небольшие зоны α -гемолиза «зеленящих» стрептококков (темные)



Группы стрептококка классифицируют по наличию полисахаридного антигена, для выявления которого используют реакцию преципитации с групповыми сыворотками (*A*, *B*, *C* и т.д.). Подавляющее большинство стрептококков группы *A* относятся к виду *S. pyogenes*, поэтому нередко данные названия используют как синонимы. Для быстрого определения группы стрептококка применяют реакцию латекс-агглютинации или коагглютинации с диагностикумами, «нагруженными» антителами соответствующих групповых сывороток (реакцию ставят с антигенными экстрактами из исследуемого материала или культур на различных этапах бактериологического исследования). Большинство клинически значимых стрептококков относится к группе *A*.

В зависимости от принадлежности к той или иной группе по Лэнсфилд и характера гемолиза проводят тесты для дальнейшей идентификации и дифференциации видов стрептококков. Для идентификации β -гемолитических стрептококков применяют тест *PYR* (на пирролидониламидопептидазу), *SAMP*-тест (на белок синергидного гемолиза), тест Фогеса — Проскауэра (на образование ацетона), чувствительность к антибиотику бацитрацину (0,04 ЕД, диск), галотолерантность (рост в присутствии 6,5% хлорида натрия), гидролиз гиппурата натрия, ферментацию трегалозы, сорбита и др. Для идентификации α -гемолитических стрептококков наряду с *SAMP*-тестом (см. ниже) используют тесты на чувствительность к желчи, оптохину, гидролиз эскулина и др. (см. подразд. 2.1.3, 2.1.4).

Для выявления стрептококков групп *A* и *B* можно применять также ИФА и методы генодиагностики (ДНК-ДНК-гибридизация).

Хотя *S. pyogenes* легко отличимы по антигенной структуре и положительному *PYR*-тесту, их можно спутать с энтерококками,

также дающими положительный результат в тесте на пирролидо-ниламидопептидазу. Стрептококки группы *B* (*S. agalactiae*), как правило, положительны в *САМР*-тесте, нечувствительны к бацитрацину и гидролизуют гиппурат натрия.

Чувствительность стрептококков к антибиотикам во многом прогнозируема, однако появляются сообщения об устойчивости некоторых штаммов, в частности, к пенициллинам, поэтому у выделенной культуры проверяют чувствительность к антимикробным препаратам.

Исследование крови. Посев крови в сахарный бульон или специальную среду для выделения гемокультур стафилококков производят так же, как при стафилококковых заболеваниях. При наличии стрептококка на дне флакона появляется хлопьевидный придонный осадок. В мазках обнаруживаются длинные цепочки стрептококков. Микроскопия позволяет дать предварительный ответ о наличии или отсутствии стрептококка. Для выделения чистой культуры и определения характера гемолиза делают пересев в чашку с кровяным агаром. Через сутки (3-й день исследования) появляются типичные мелкие колонии, окруженные зоной гемолиза. Дальнейшие этапы исследования описаны выше.

Для диагностики скарлатины, как правило, лабораторные исследования не применяют. В отдельных случаях высевают отделяемое слизистой оболочки зева и выделяют стрептококки различных серогрупп.

Каталазный тест. Чистую культуру ватным тампоном, деревянной или стеклянной палочкой вносят в каплю 3%—10%-го раствора перекиси водорода на стекле и растирают круговыми движениями. В присутствии каталазы перекись разлагается с образованием хорошо видимых пузырьков кислорода. У стрептококков каталазная активность отсутствует.

PYR-тест. В небольшое количество бульона с 0,01 % *L*-пирролидонил- β -нафтиламина вносят полную петлю агаровой культуры стрептококка и инкубируют при 37 °С в течение 4 ч. Если после внесения 1 капли специального реактива развивается ярко-красное окрашивание, это свидетельствует о гидролизе субстрата (положительная реакция).

САМР-тест. *S. agalactiae* вырабатывают внеклеточный протеин, способный усиливать лизис эритроцитов β -лизином стафилококка (белок синергидного гемолиза). Для его определения на чашку с кровяным агаром засевают перпендикулярными штрихами испытуемую культуру стрептококка и суточную бульонную культуру стандартного β -гемолитического штамма *Staphylococcus aureus*. В качестве положительного и отрицательного контролей засевают соответственно культуры *S. agalactiae* и *S. pyogenes* (также перпендикулярно штриху со стафилококками). Засеянную среду инкубируют 18 ч при 37 °С. При положительном *САМР*-тесте на месте пере-

сечения стафилококка и *S. agalactiae* видна зона усиления гемолиза в виде «крыла бабочки» (см. цв. вклейку, рис. 17).

Серологическое исследование. Серодиагностику стрептококковых инфекций проводят у больных хронически текущими заболеваниями, леченных большими дозами антибиотиков и сульфаниламидных препаратов, т. е. когда выделение возбудителя бактериологическими методами представляет большие трудности, а также при оценке активности ревматического процесса, выявлении микробоносительства. Она предусматривает определение в крови специфических стрептококковых антител к токсинам, в частности к стрептолизину О и гиалуронидазе.

Определение антистрептолизина О основано на его способности нейтрализовать гемолитическую активность стрептолизина О. Для этого делают серийные разведения сыворотки больного и к ним прибавляют коммерческий препарат стрептолизина О. Смесь выдерживают при 37 °С в течение 15 мин, после чего во все пробирки добавляют по 0,2 мл взвеси эритроцитов кролика. Пробирки вновь помещают в термостат на 1 ч, а затем учитывают результаты и определяют титр реакции. В парных сыворотках, взятых в остром периоде заболевания с интервалом 7—10 дней, отмечается увеличение титров антител: к О-стрептолизину до 500 и более, к гиалуронидазе — до 1000 и более международных единиц. Следует отметить, что АТ к стрептолизину О не образуются при кожных формах стрептококковой инфекции, вызванной стрептококками группы А.

2.1.3. Пневмококковая инфекция

Пневмококки (стрептококки пневмонии) — *Streptococcus pneumoniae* являются возбудителями крупозной пневмонии, очаговой пневмонии и других оппортунистических заболеваний дыхательных путей, ползучей язвы роговицы, нагноительных процессов в среднем ухе, верхнечелюстной пазухе, а также сепсиса и менингита.

Исследованию подвергают мокроту, гной, спинномозговую жидкость, кровь, органы трупа.

Микроскопия. Из исследуемого материала (кроме крови) готовят два мазка, один из которых окрашивают по Граму, а другой для обнаружения капсул — по Бурри, Бурри—Гинсу или по Козловскому. Возбудитель пневмококковой инфекции в тушевом препарате по Бурри показан на рис. 1.4. Для выявления капсулы микроорганизмы и каплю туши, нанесенные на поверхность стекла, смешивают круговыми движениями для получения обычного мазка. Тушь предварительно разводят в ИХН при соотношении 1 : 4. Мазок высушивают на воздухе, не фиксируют и окрашивают в течение 2—3 мин формолгенциановым фиоле-

товым (10 мл 40%-го формалина и 1,5 г генцианового фиолетового). При микроскопии на черно-сером фоне видны неокрашенные капсулы, в которых попарно располагаются ланцетовидные клетки бактерий фиолетового цвета. Можно применять и другие красители: 3%-й щелочной раствор метиленового синего, 0,33%-й водный раствор фуксина (см. цв. вклейку, рис. 5). На основании данных микроскопии ориентировочно судят о наличии возбудителя. Более достоверные данные получают при бактериологическом исследовании.

Бактериологическое исследование. Для выделения чистой культуры 5—10 мл крови сеют в сыровоточный бульон (1 часть сыровотки + 3 части МПБ, pH 7,2—7,4), в сахарный бульон или в специальную среду с дефибрированной кровью лошади и дрожжевым экстрактом. После 18—24-часовой инкубации материал пересевают на 10%-й кровяной агар в чашку. Спинномозговую жидкость центрифугируют и осадок сеют на кровяной агар.

Непосредственный посев материала на питательные среды (мокрота, гной) обычно не дает положительного результата, так как в присутствии сапрофитов, особенно гнилостных микроорганизмов, рост пневмококков подавляется. Поэтому гной и мокроту предварительно обрабатывают (выбирают комочки, растирают их в фарфоровой ступке, добавляя 1 мл ИХН) и для проведения биопробы вводят внутрибрюшинно белым мышам. Они очень чувствительны к пневмококку и погибают от септицемии через 18—72 ч. Труп мыши вскрывают, кровь из сердца, кусочки внутренних органов и перитонеальную жидкость сеют в чашку с кровяным агаром и в пробирку с сыровоточным бульоном для подрашивания. Колонии пневмококка напоминают колонии стрептококка: мелкие, почти плоские, непрозрачные, с ореолом зеленого цвета, реже полного гемолиза. Характерно вдавление в центре колонии.

На основании морфологических и культуральных свойств трудно дифференцировать пневмококки от «зеленящих» стрептококков. Для этого применяют реакцию растворения пневмококков желчью: 1 мл бульонной культуры вносят в стерильную пробирку и добавляют 0,5 мл бычьей желчи (дезоксихолата). Через 10—15 мин инкубирования в термостате происходит полный лизис пневмококков, а культура «зеленящего» стрептококка желчью не лизируется.

Для дифференциации с другими стрептококками используют также тест с инулином (пневмококк расщепляет инулин с образованием кислоты) и оптохином (в его присутствии рост пневмококков подавляется). Окончательную идентификацию культур (особенно выделенных из закрытых полостей) проводят в серологических реакциях, позволяющих идентифицировать капсульный АГ пневмококка.

2.1.4. Энтерококковая инфекция

Энтерококки способны вызывать разнообразные оппортунистические инфекции: урологические, раневые, послеоперационные инфекции, воспалительные заболевания кишечного тракта, холецистит, панкреатит, септицемии, эндокардиты, отиты, менингит, причем по числу вызываемых внутрибольничных уроинфекций они уступают лишь *E. coli*, а по числу бактеремий — лишь стафилококкам. Из 16 известных представителей рода наибольшее клиническое значение имеют виды *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium*.

Диагностика энтерококковой инфекции основана на обнаружении и количественной оценке возбудителя в патологическом материале бактериоскопическим и бактериологическим методами.

Материалами для исследования при различных формах инфекции являются кровь, моча, раневое отделяемое, кусочки пораженных тканей, спинномозговая жидкость и др. Особенности взятия материала такие же, как при стрептококковых инфекциях. Пересылать материал в лабораторию можно в любых транспортных средах или даже на сухом тампоне, но исследование желательно начать не позже 2 ч после взятия материала.

Микроскопия. Микроскопическое исследование дает возможность предположить присутствие энтерококков в материале при их высокой концентрации. Из материала готовят и окрашивают по Граму мазки. Энтерококки имеют вытянутые грамположительные клетки (коккобациллы) размером до 1 мкм, которые располагаются отдельно, попарно или короткими цепочками. В мазках с тиогликолевого бульона клетки выглядят овальными. Микроскопическая картина позволяет заподозрить энтерококковую инфекцию, для подтверждения которой необходимо выделение и идентификация возбудителя.

Бактериологическое исследование. Для выделения энтерококков применяют посевы на 5%-й кровяной агар, а для материалов, контаминированных сопутствующей микрофлорой, — на селективные среды, содержащие азид натрия или антибиотики (колистин, налидиксовую кислоту, цефалексин, азтреонам). Для обогащения материала применяют посев на сахарный бульон (МПБ + + 0,2 % глюкозы). Посевы инкубируют на воздухе при 37 °С 24—48 ч. На кровяных средах энтерококки образуют мелкие или средних размеров округлые колонии серо-белого цвета с ровным краем, иногда с зоной β-гемолиза (*E. faecalis*) или α-гемолиза. На жидкой среде дают диффузное помутнение.

Из подозрительных колоний готовят мазки, окрашенные по Граму, и в случае однородности микроорганизмов остаток колонии пересевают для накопления чистой культуры на сектор кровяного агара.

После инкубирования в тех же условиях проводят окончательную идентификацию и дифференциацию выделенной культуры с похожими микроорганизмами, определяют ее чувствительность к антибиотикам. С этой целью у культуры определяют подвижность, ставят каталазный тест (как и стрептококки, они не обладают каталазой), тест на устойчивость к теллуриту калия, желчи, повышенному содержанию NaCl в среде (6,5%), гидролиз эскулина, *PYR*-тест и др.

Внутри рода энтерококки по отношению к манниту, сорбозе и аргинину подразделяют на 5 биохимических групп. Виды *E. faecalis* и *E. faecium* принадлежат ко II-й группе (образуют кислоту из маннита, но не сорбозы и гидролизуют аргинин). В отличие от *E. faecalis* бактерии вида *E. faecium* чувствительны к теллуриту, ферментируют арабинозу, не утилизируют пируват, могут ферментировать раффинозу. До 90% клинических штаммов энтерококков принадлежат к виду *E. faecalis*. Идентификацию энтерококков можно проводить также по антигенной структуре: они вступают в реакцию с сывороткой к стрептококкам группы D по Лэнсфилд (или латекс-диагностикумом «нагруженным» соответствующими антителами).

Желчно-эскулиновый тест проводят для оценки способности микроорганизмов гидролизовать эскулин в присутствии 40% желчи. Культуру засевают на желчно-эскулиновый агар в чашке или пробирке (на скошенную часть) и инкубируют 18—24 ч при 37°C. Энтерококки гидролизуют эскулин до глюкозы и эскулетина, который реагирует с цитратом железа, входящим в состав среды, в результате чего образуется коричнево-черный преципитат. При отрицательной реакции цвет среды не меняется.

Ввиду распространения внутрибольничных штаммов энтерококков, устойчивых к ванкомицину и аминогликозидам, необходимо проверять наличие чувствительности выделенных штаммов к этим и другим антибиотикам.

2.2. Грамотрицательные аэробные и микроаэрофильные палочки и кокки

2.2.1. Менингококковая инфекция

Менингококковую инфекцию вызывают менингококки — *Neisseria meningitidis* (бактерии 3-й группы патогенности). Материалом для исследования служит отделяемое носоглотки, спинномозговая жидкость, кровь, соскоб из элементов геморрагической сыпи на коже, секционный материал.

Менингококки очень чувствительны к колебаниям температуры, поэтому материал сразу же сеют на питательные среды или

немедленно, не допуская охлаждения, отправляют в лабораторию, где до посева сохраняют в термостате.

Отделяемое слизистой оболочки носовой части глотки снимают специальным клювовидным (изогнутым под углом) тампоном. Наиболее результативным является немедленный посев носоглоточной слизи на плотные питательные среды с тщательным разобщением бактериальных клеток. Если время доставки в лабораторию превышает 3 ч, то тампон помещают в пробирку с 3 мл среды обогащения (содержит 0,1 % агар-агара, 20 % сыворотки и 20 ЕД/мл ристомицина) и ставят в термостат при 37 °С (после подращивания материал высевает на сывороточный агар).

Микроскопия. Микроскопическое исследование спинномозговой жидкости и крови дает возможность определить наличие возбудителя. Если спинномозговая жидкость имеет вид гноя, то мазки готовят без ее предварительной обработки; при незначительной мутности спинномозговую жидкость центрифугируют и из осадка делают мазки. Окрашивают их по Граму, водным раствором основного фуксина и/или метиленовым синим. При окраске по Граму форменные элементы спинномозговой жидкости могут изменяться, что осложняет обнаружение возбудителя. Менингококки имеют вид диплококков бобовидной формы, соприкасающихся вогнутыми краями и расположенных внутри цитоплазмы лейкоцитов. Часто обнаруживается нежная капсула. При менингококцемии менингококки иногда можно обнаружить в мазках крови. Для этого готовят препарат толстой капли и без фиксации окрашивают его 2—3 мин водным раствором метиленовой сини, лишнюю окраску смывают водопроводной водой и высушивают препарат на воздухе. На голубом фоне препарата видны окрашенные в темно-синий цвет лейкоциты, а между ними множество мелких, темно-синих кокков, расположенных в виде кучек, парно или по одному.

Экспресс-диагностика основана на обнаружении в спинномозговой жидкости или крови больного специфического антигена, осуществляется с помощью латекс-агглютинации, ИФА, встречного иммуноэлектрофореза с групповыми преципитирующими антисыворотками. Эти методы приобретают особое значение при неэффективности микроскопической диагностики и посевов.

Бактериологическое исследование. Менингококк растет на специальных питательных средах с нативным белком (бульон или агар с сывороткой, асцитической жидкостью или кровью). Для исследования материала, обильно контаминированного нормофлорой (мазки из носоглотки), применяют посев на плотные селективные среды с антибиотиками (ристомицином, ванкомицином, колистином и нистатином). Спинномозговую жидкость лучше сеять после центрифугирования (3000 об/мин в течение 5 мин). Засевают 2—3 капли полученного осадка на поверхность подогретой пи-

тательной среды в чашке и инкубируют при 37 °С в атмосфере с повышенным содержанием CO₂ (используют CO₂-инкубатор, газогенераторные пакеты или эксикатор с зажженной свечой). Остаток спинномозговой жидкости используют для РВИЭФ и других методов индикации возбудителя. Как правило, одновременно с прямым посевом материал засевают на среду обогащения (например, полужидкую сывороточную среду) с последующим пересевом на плотные среды для выделения чистой культуры.

На 2—3-й день инкубации менингококки образуют мелкие, круглые, выпуклые, прозрачные колонии. В мазках, приготовленных из этих колоний, обнаруживают полиморфные диплококки и тетракокки (картина настолько пестрая, что создается впечатление смешанной культуры). Колонии пересевают на скошенный сывороточный агар. Если в «прямых» посевах материала рост отсутствует, культуру выделяют из спинномозговой жидкости, залитой полужидким агаром (со среды обогащения).

На 3-й день исследования для идентификации чистой культуры у нее выявляют оксидазную активность и делают посев на среды с углеводами (табл. 2.4). Менингококки обладают оксидазой, ферментируют глюкозу и мальтозу с образованием кислоты, лактозу, сахарозу и фруктозу не ферментируют, полисахарид из сахарозы не образуют, не растут в присутствии 0,2 % желчи. Для выявления оксидазной активности на кусочек фильтровальной бумаги, смоченной каплей свежеприготовленного 1%-го раствора солянокислого парадиэтилфенилендиамина, петлей наносят культуру менингококков. Культуры, обладающие оксидазной активностью, в течение 30—60 с вызывают вначале порозовение, а затем почернение бумаги с реактивом. Для определения способности образовывать полисахарид культуры нейссерий засевают на бескрахмальную среду с 1 % сахарозы и инкубируют при 37 °С в течение 24—48 ч, после чего на рост наносят каплю иодного раствора Люголя. В случае образования полисахарида сразу развивается буро-лиловое окрашивание.

Для дифференциации менингококка и непатогенных нейссерий (*Neisseria mucosa*, *Neisseria sicca* и др.) используют свойство последних расти на простых питательных средах, а также способность образовывать колонии при комнатной температуре (22 °С).

Для обнаружения менингококка в крови во флаконы с 50 мл бульона, содержащего 0,1 % агар-агара, засевают 5—10 мл крови, асептически взятой из вены. Через сутки делают пересев культуры на сывороточный агар. Выделение и идентификация культур осуществляются таким же образом, как и при исследовании спинномозговой жидкости.

Выделенную культуру типируют в РА с менингококковыми сыворотками к сероварам А, В и С. Серовар менингококка определяют с целью дальнейшего эпидемиологического анализа.

Таблица 2.4

Основные дифференциально-диагностические свойства нейссерий

Вид	Рост на МПА	Потребность в CO ₂	Желтый пигмент	Образование кислоты из					Образование полисахарида из сахарозы	Нитрат-редуктаза
				глюкозы	мальтозы	сахарозы	фруктозы	лактозы		
<i>N. gonorrhoeae</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>N. meningitidis</i>	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>N. subflava</i>	+	-	+	+	+	+/-	+/-	-	-/+*	-
<i>N. flava</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
<i>N. mucosa</i>	+	-	+/-	+	+	+	+	-	+	+
<i>N. sicca</i>	+	-	+/-	+	+	+	+	-	+	-
<i>N. lactamica</i>	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-

Примечание. * *N. subflava* биовара *perflava* положительны в данном тесте.

Серологическое исследование. Серодиагностику применяют в качестве вспомогательного метода (в основном для эпидемиологического анализа). Ставят РНГА с эритроцитами, нагруженными группоспецифическими полисахаридными АГ или ИФА с теми же антигенами.

2.2.2. Гонококковая инфекция

Возбудителем гонореи являются гонококки (*Neisseria gonorrhoeae*) — морфологически сходные с менингококком (бактерии 3-й группы патогенности). Для диагностики применяют микроскопический, бактериологический и серологический методы.

Микроскопия. Это исследование является основным методом диагностики острой гонореи и бленнореи. Материал для исследования: отделяемое из уретры, предстательной железы, канала шейки матки, конъюнктивы и др. Из мочеиспускательного канала материал берут следующим образом: наружное отверстие его вытирают ватой, смоченной стерильным ИХН, надавливают пальцем на заднюю стенку мочеиспускательного канала изнутри снаружи (у женщин для этого вводят во влагалище указательный палец) и выдавливают каплю гноя. Секрет предстательной железы получают путем ее массажа. Отделяемое слизистой оболочки шейки матки извлекают тампоном после введения во влагалище зеркала Куско. При бленнорее отделяемое конъюнктивы снимают петлей. Готовят не менее два мазков на предметном стекле. Мазки фиксируют в фиксирующей жидкости и окрашивают щелочным раствором метиленового синего и по Граму. При микроскопии гонококки имеют вид бобовидных грамотрицательных диплококков, расположенных, подобно менингококкам, внутри клеток (нейтрофильных гранулоцитов), а также внеклеточно (см. цв. вклейку, рис. 18). Окраска по Граму позволяет дифференцировать гонококки со стафилококками и другими бактериями.

Для получения более четких очертаний гонококков мазки следует фиксировать с помощью диметилсульфоксида (ДМСО). На мазок наливают ДМСО до полного высыхания, затем окрашивают.

При хронической гонорее в мазках обнаруживается большое количество сопутствующих микроорганизмов, а морфология возбудителя может меняться: наблюдаются диплококки с неодинаковыми по величине и форме клетками. При неадекватном лечении сульфаниламидами и антибиотиками происходят значительные изменения формы и величины гонококков: крупные шаровидные, величиной до размеров эритроцита, либо мелкие пылевидные — *L*-формы.

В связи с тем что в исследуемом материале могут находиться и другие грамотрицательные бактерии, сходные с гонококками, применяют методы индикации. Так, мазки обрабатывают флюо-

ресцирующими антителами против гонококков и при люминесцентной микроскопии наблюдают свечение клеток гонококков (прямая РИФ). Бактериоскопическое исследование, особенно при хронической, леченой гонорее, а также гонорее у женщин не всегда дает положительный результат, поэтому используют другие методы диагностики.

Бактериологическое исследование. Его проводят в тех случаях, когда гонококки в мазках не обнаруживают или находят нетипичные, измененные формы. Культуральное исследование необходимо для контроля излеченности, при диагностике заболевания у детей, для судебно-медицинской экспертизы. Ввиду особой чувствительности гонококка к охлаждению материал для исследования по возможности не транспортируют. Кроме того, гонококк очень чувствителен ко многим антимикробным веществам, поэтому за 1—2 дня до посева необходимо исключить применение больным антисептиков и прекратить антибактериальную терапию.

При хронической гонорее перед исследованием для повышения вероятности выявления возбудителя проводят провокацию биологическим методом: однократное внутримышечное введение гоновакцины взрослым в количестве 500 млн микробных тел, детям старше 3-х лет — 100—200 млн микробных тел, детям старше 3-х лет — 100—200 млн микробных тел. Детям до 3-х лет гоновакцину не вводят. Провокация может быть также термической, механической и алиментарной.

Посев производят непосредственно после взятия материала.

Для культивирования гонококка используют МПА (рН 7,4) с добавлением асцитической жидкости ($\frac{1}{3}$) — асцит-агар.

Применяются также среды следующего состава, мл:

Среда № 1

МПА из кроличьего мяса или бычьих сердец, рН 7,4—7,5.....	100
Гидролизат казеина	2
Дрожжевой аутолизат	2
Сыворотка крови крупного рогатого скота	20

Среда № 2

МПА из кроличьего мяса, рН 7,4	100
Гемогидролизат	2
Дрожжевой аутолизат	2
Сыворотка крови крупного рогатого скота	20

Среда № 3

МПА из кроличьего мяса, рН 7,4	100
Среда 199	20
Дрожжевой аутолизат	2
Сыворотка крови крупного рогатого скота	20

Среда № 4

МПА из кроличьего мяса, рН 7,4	100
Куриный желток	10
Сыворотка крови крупного рогатого скота	20

Для подавления роста сопутствующей микрофлоры в среду рекомендуется добавить антибиотики: полимиксин М (25 ЕД/мл среды), ристомицина сульфат (20 ЕД/мл среды).

Если нет возможности начать бактериологическое исследование на месте, для сохранения жизнеспособности гонококков материал после взятия помещают в транспортные среды, хранят при 4—15 °С не более 24 ч, а затем пересевают на вышеуказанные среды.

Посевы культивируют при 37 °С в атмосфере с 10 % CO₂. Гонококк дает рост обычно через 24 ч в виде мелких колоний, напоминающих росу, бесцветных или слегка желтоватых. Края колонии ровные, поверхность блестящая и гладкая. Характерным признаком является ранний аутолиз центральной части колоний.

Выделенные чистые культуры идентифицируют по морфологическим, тинкториальным и биохимическим свойствам. Основные дифференциально-диагностические свойства гонококков представлены выше (см. табл. 2.4). У выделенных культур обязательно проверяют чувствительность к антимикробным препаратам, в первую очередь пенициллинам.

Серологическое исследование. Серодиагностику проводят при хронической гонорее, когда у больного отсутствуют выделения и провести бактериоскопическое или бактериологическое исследование не представляется возможным. В этих случаях сыворотку крови больного исследуют в РСК или РНГА со стандартным гонококковым антигеном.

ПЦР. В настоящее время разработаны тест-системы для ПЦР-диагностики гонококковой инфекции, по чувствительности и специфичности превосходящие культуральный метод, в том числе при использовании проб, взятых неинвазивными методами (например, мочи). При этом имеется возможность выявления генов антибиотикоустойчивости у штаммов *N. gonorrhoeae*. Широко внедряется в практику комбинированный тест (мультиплексная ПЦР) для выявления *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamidia trachomatis* и *Trichomonas vaginalis*.

2.2.3. Туляремия

Возбудителем туляремии — острой зоонозной болезни, поражающей лимфатический аппарат, является *Francisella tularensis* (бактерии 2-й группы патогенности). Для лабораторной диагностики этого заболевания применяют иммунологический метод (середи-

агностику и аллергические пробы), а также биологический и бактериологический методы исследования.

Аллергические пробы и серологическую диагностику проводят в обычных больничных условиях и микробиологических лабораториях. Обнаружение и выделение туляремийных бактерий производят в специальных лабораториях. При взятии, пересылке и работе с материалом, подозрительным на содержание туляремийных бактерий, соблюдают те же меры предосторожности, что и при других особо опасных инфекциях.

Серологическое исследование. В сыворотке больных определяют специфические агглютинины, которые появляются с 10—12-го дня болезни. Для этого ставят развернутую РА с туляремийным корпускулярным диагностикумом (убитые формалином бактерии). При

Таблица 2.5

Схема проведения развернутой РА для диагностики туляремии

Ингредиенты и последовательность операций	Количество ингредиентов в пробирках, мл						
	Опытные					Контроль	
	1	2	3	4	5	сыворотки	диагностикума
ИХН, мл	–	0,5	0,5	0,5	0,5	–	0,5
Сыворотка больного в разведении 1 : 25, мл	0,5	0,5	–	–	–	0,5	–
<i>Приготовление серийных разведений</i>							
Полученное разведение сыворотки	1 : 25	1 : 50	1 : 100	1 : 200	1 : 400	1 : 25	–
Туляремийный диагностикум, мл	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	–	0,5
<i>Перемешивание и инкубирование</i> (2 ч при 37 °С + 18—20 ч при комнатной температуре)							
Полученное разведение сыворотки	1 : 50	1 : 100	1 : 200	1 : 400	1 : 800	1 : 25	–
Пример учета реакции	+	+	–	–	–	–	–
Интерпретация результата: реакция агглютинации положительна в титре 1 : 100							

массовых обследованиях проводят ускоренную РА на предметных стеклах (кровянокапельную пробу).

Развернутая РА. Для развернутой РА на 10—15-й день болезни у больного берут 2—3 мл крови из локтевой вены. Полученную сыворотку последовательно разводят в ИХН от 1 : 25 до 1 : 400 (табл. 2.5). В каждую пробирку с 0,5 мл разведенной сыворотки добавляют по 0,5 мл туляремийного диагностикума, в результате чего получают конечные разведения сыворотки (от 1 : 50 до 1 : 800). Реакцию сопровождают контролем сыворотки и диагностикума.

Пробирки помещают на 2 ч в термостат. Предварительно результаты реакции учитывают после извлечения пробирок из термостата, а окончательно — после пребывания их в течение 18—20 ч при комнатной температуре.

Диагностическое значение имеет обнаружение агглютининов в титре 1 : 100 и выше. Рекомендуется исследовать парные сыворотки (второй раз спустя 7—10 дней после первичного исследования). Увеличение титра антител в 4 и более раз имеет высокую диагностическую ценность.

Кровянокапельная РА. Кровь из пальца в виде толстой капли наносят на предметное стекло и добавляют в нее равный объем дистиллированной воды, чтобы вызвать гемолиз. Рядом с кровью помещают каплю туляремийного диагностикума, обе капли смешивают стеклянной палочкой. У больных туляремией в серопозитивном периоде (при титре антител 1 : 100 и выше) агглютинация происходит немедленно. Иногда сыворотки крови больных туляремией перекрестно реагируют с бруцеллезным диагностикумом (ввиду наличия общих антигенов у бруцелл и туляремийных бактерий). У лиц, перенесших туляремию, в течение длительного времени в крови обнаруживаются специфические агглютинины. Эти особенности надо учитывать при интерпретации результатов серодиагностики.

Весьма чувствительным методом серологической диагностики туляремии является РНГА. Она может быть положительной уже в конце первой — начале второй недели заболевания. В качестве антигена используют туляремийный эритроцитарный диагностикум (бараньи эритроциты, «нагруженные» туляремийным антигеном). У больных туляремией титры антител в этой реакции могут составлять 1 : 1280—1 : 2560 и выше.

Для выявления антител к *Francisella tularensis* применяют также метод ИФА.

Аллергологическое исследование. Аллергические пробы применяют для ранней диагностики туляремии (с 5-го дня от начала заболевания развивается ГЗТ на туляремийный аллерген). Используют два вида тулярина и соответственно два способа их введения — кожный и внутрикожный. Так как концентрации аллергена (убитых нагреванием бактерий) в двух видах тулярина различны, недопустимо использовать один препарат вместо другого.

Внутрикожный тулярин вводят в дозе 0,1 мл внутрь кожи ладонной части предплечья (предварительно обработанной спиртом). Результаты пробы учитывают в динамике через 24—48 ч путем осмотра и пальпации места введения препарата. Наличие выраженного инфильтрата и гиперемии диаметром 1,0 см и более расценивается как положительная реакция. У отдельных больных возможно образование пустулы и даже некроза кожи на месте введения препарата, лимфангоита, регионарного лимфаденита с повышением температуры тела до 37,5—38,0 °С в течение 24—48 ч. Накожную пробу ставят путем втирания стерильным оспопрививальным пером 1 капли накожного тулярина в скарифицированный участок кожи, предварительно обработанный спиртом. Учет проводят, как описано выше; положительной считается реакция при размерах участка гиперемии и инфильтрата 0,5 см и более.

У вакцинированных или переболевших туляремией лиц в течение ряда лет аллергические пробы могут оставаться положительными (анамнестическая реакция).

Иммунологическое исследование, таким образом, имеет ряд ограничений. Более достоверные результаты дает выделение возбудителя туляремии.

Биологический и бактериологический методы. Материалом для исследования от больных, в зависимости от клинической формы туляремии, может быть кровь, пунктат из бубона, соскоб из язвы, отделяемое конъюнктивы, налет из зева, мокрота и др. Исследуют также органы павших и больных животных, переносчиков (слепни, клещи, комары), объекты внешней среды (вода, пищевые продукты, воздух).

Выделить культуры возбудителя от больного путем непосредственного посева материала на среды почти никогда не удастся. Более надежным является биологический метод. Материал (по возможности взятый до начала антибиотикотерапии) вводят 3—5 мышам или 2 морским свинкам подкожно, накожно, внутрибрюшинно и/или через рот. Зараженных животных содержат в особых условиях (как при диагностике чумы). Если экспериментальные животные на протяжении 7—15 дней не погибают, их забивают и трупы вскрывают. При наличии туляремии обнаруживают патологоанатомические изменения: продуктивный процесс с некрозом, увеличенные лимфоузлы, селезенка, печень, геморрагический компонент не выражен. Кровь, костный мозг, участки внутренних органов и лимфатических узлов трупа животного сеют, втирая в поверхность одной из сред: желточной, МакКоя, глюкозистинового агара с кровью и антибиотиками.

Желточная среда. Среда состоит из трех частей яичных желтков и двух частей ИХН (рН 7,0—7,4). Ее разливают в стерильные пробирки по 5 мл и свертывают 60 мин при 75 °С. На следующий день среду прогревают 30 мин при 82—85 °С. Для контроля стерильности среду поме-

щают в термостат на 2 сут. После посева пробирки оставляют почти в горизонтальном положении для фиксации микроорганизмов на поверхности среды. Для предупреждения высыхания среды пробирки закрывают резиновыми колпачками (присутствие конденсата обязательно) и культивируют посевы при 37 °С. На 3—5-й день, а иногда на 20-й и позже появляются нежные мелкие колонии, рост которых напоминает шагреньевую кожу.

Глюкозоцистиновый агар с кровью. К расплавленному МПА добавляют 0,05—0,1 % цистина и 1 % глюкозы (рН 7,2—7,4), кипятят несколько минут, охлаждают до 45—50 °С и добавляют 5—10 % дефибрированной кроличьей крови. На глюкозоцистиновой среде колонии бактерий туляремии влажные, молочно-белого цвета.

Возбудитель туляремии хорошо размножается в желточном мешке 12-дневного куриного эмбриона, в жидких питательных средах он растет плохо.

Одновременно с посевом из того же материала готовят мазки-отпечатки и окрашивают их по Романовскому—Гимзе. Возбудители туляремии — мелкие (0,2—0,7 мкм) кокковидные и палочковидные бактерии. В мазках из органов они располагаются внутриклеточно и в виде скоплений, образуя нежную капсулу. В качестве экспресс-диагностики возбудитель обнаруживают в материале методами ИФ и ИФА.

Выделенную чистую культуру идентифицируют по морфологическим, антигенным и биологическим свойствам, определяют ее чувствительность к антибиотикам.

Свежевыделенные патогенные бактерии туляремии биохимически мало активны. Они могут ферментировать глюкозу, выделять сероводород, при дальнейшем культивировании приобретают способность сбраживать мальтозу, маннозу и непостоянно другие углеводы. Для идентификации выделенной культуры ставят РА с туляремийной агглютинирующей сывороткой и РИФ с люминесцирующей сывороткой. Вирулентность культуры устанавливают путем заражения чувствительных животных.

Для выделения культуры туляремийных бактерий из воды заражают чувствительных животных осадком, полученным после ее центрифугирования или фильтрации.

При исследовании пищевых продуктов их промывают МПБ, центрифугируют и осадок вводят животным.

В энзоотических очагах проводят плановые систематические исследования для выделения возбудителя туляремии от грызунов (по вышеописанной методике).

ПЦР. Факторы патогенности *F. tularensis* изучены недостаточно, поэтому в качестве мишеней для праймеров используют видоспецифическую последовательность гена хромосомной ДНК (*TUL4*). Для повышения чувствительности и специфичности метода применяют мультиплексную ПЦР.

2.2.4. Бруцеллез

Возбудители бруцеллеза — хронической зоонозной инфекции — относятся к роду *Brucella*. Для человека патогенны виды: *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis* и *Brucella canis* (их относят к бактериям 2-й группы патогенности).

Для диагностики бруцеллеза используют иммунологический (серодиагностика и аллергопроба), бактериологический и биологический методы исследования. Серологическую диагностику и аллергические пробы для диагностики бруцеллеза производят в обычных микробиологических лабораториях. Чистую культуру бруцелл выделяют и идентифицируют в лабораториях особо опасных инфекций.

Серологическое исследование. Для серодиагностики бруцеллеза ставят РА с сывороткой больного (реакция Райта), ускоренную РА на стекле (реакция Хеддльсона), опсоно-фагоцитарную пробу, РСК и РИФ.

Реакцию Райта ставят в начале 2-й недели болезни. В качестве диагностикума используют взвесь убитых нагреванием и фенолом бруцелл, окрашенную генциановым фиолетовым или метиловым фиолетовым. Для реакции Райта и Хеддльсона выпускается единый цветной бруцеллезный диагностикум, содержащий антигены трех патогенных для человека бруцелл.

Реакцию Райта ставят «объемным» методом (см. подразд. 1.4.1), но сыворотку разводят в ИХН, содержащем 0,5 % фенола. Пробирки помещают в термостат на 2 ч, а затем оставляют на 18—20 ч при комнатной температуре. Реакцию считают положительной при титре 1:200 и сомнительной при титре 1:50. Реакция Райта может быть положительной у привитых и больных, поэтому по мере развития заболевания ее повторяют, учитывая нарастающие титра антител.

Реакцию агглютинации Хеддльсона (табл. 2.6) ввиду быстрого учета и простой техники постановки чаще используют в очагах

Таблица 2.6

Схема реакции агглютинации Хеддльсона

Ингредиенты	Зоны пластинки и количество ингредиентов, мл					
	Опыт (номер квадрата)				Контроли	
	1	2	3	4	сыворотки	антигена
ИХН	—	—	—	—	0,03	0,03
Сыворотка больного	0,08	0,04	0,02	0,01	0,02	—
Бруцеллезный диагностикум	0,03	0,03	0,03	0,03	—	0,03

бруцеллеза (в полевых условиях). Стеклянную пластинку делят восковым карандашом на 6 квадратов и наносят микропипеткой неразведенную испытуемую сыворотку в количествах 0,08; 0,04; 0,02; 0,01 и 0,02 мл, добавляют тот же диагностикум, что и для реакции Райта (по 0,03 мл к каждой дозе сыворотки), кроме последней (5-й квадрат), в которую вносят 0,03 мл ИХН (контроль сыворотки). В 6-м квадрате находится 0,03 мл антигена и 0,03 мл ИХН (контроль диагностикума).

Капли сыворотки и антигена смешивают стеклянной палочкой и после легкого покачивания стекла учитывают результаты реакции, которая развивается уже в первые минуты в виде появления мелкозернистого окрашенного агглютината. Отсутствие агглютинации во всех дозах сыворотки оценивается как отрицательная реакция, наличие агглютинации в 1-й дозе (0,08 мл сыворотки) — сомнительная, во 2-й (0,04 мл) — слабоположительная, в 3-й или 4-й дозах (0,02—0,01 мл) — положительная, во всех дозах — резко положительная реакция. Недостатком реакции агглютинации Хеддльсона является нередко наблюдаемый положительный результат у здоровых людей за счет нормальных антител. Поэтому с сыворотками, давшими положительную реакцию Хеддльсона, обязательно ставят РА в пробирках.

При острой, подострой и хронической форме бруцеллеза антитела в сыворотке больных можно обнаружить с помощью РИФ, которая более чувствительна, чем реакция агглютинации.

С помощью РНГА у больных острым и подострым бруцеллезом можно обнаружить агглютинины в 90—100 % случаев.

Высокую диагностическую ценность в острой фазе бруцеллеза имеет метод ИФА, позволяющий выявить в сыворотке больных антибруцеллезные антитела класса *IgM*. Они в отличие от *IgG* появляются в ранние сроки после заражения.

При бруцеллезе весьма специфична РСК. Положительный результат регистрируется с 20—25-го дня заболевания и длительно сохраняется.

Аллергологическое исследование. *Внутрикожную аллергическую пробу Бюрне* используют для выявления состояния ГЗТ к аллергенам бруцелл у больных и переболевших бруцеллезом. Ее ставят с 15—20-го дня заболевания. Внутрикожно в область средней трети предплечья вводят 0,1 мл бруцеллина (см. подразд. 1.5.1). Положительной считают реакцию в том случае, если через сутки на месте введения появляются болезненность, гиперемия и инфильтрация кожи размером в среднем 3×3 см (слабо положительная — размером 1×1 см, резко положительная — 6×6 см). Аллергическая реакция бывает положительной в течение многих лет после перенесенного заболевания и у привитых.

Бактериологическое исследование. Для выделения чистой культуры бруцелл от больных исследуют кровь, пунктат костного мозга,

мочу, молоко, кусочки органов. Кроме того, исследуют абортированные плоды животных, околоплодные воды и участки плаценты, молоко, воздух и другие объекты внешней среды. Ввиду высокой контагиозности бруцелл при работе с материалом необходимо неукоснительно соблюдать правила работы с возбудителями особо опасных инфекций.

Посев крови для выделения гемокультуры проводят в первые дни болезни при наличии лихорадки; при отрицательных результатах исследование многократно повторяют (бактериemia наблюдается длительное время — в течение 1 года и более).

Из локтевой вены асептически берут не менее 10 мл крови и засевают по 5 мл в 2 флакона с 50 мл печеночного или асцитического бульона (рН 7,1—7,2) или МПБ с добавлением 1 % глюкозы, 2 % глицерина и антифаговой сыворотки (для инаktivации бруцеллезного бактериофага). Один флакон помещают в обычные аэробные условия, другой — в герметично закрывающийся сосуд, содержащий 10 % углекислого газа, или СО₂-инкубатор. Учитывая медленный рост бруцелл, посеvy выдерживают при 37 °С до 1 месяца. Через каждые 4—5 дней делают отсеvy на скошенный печеночный агар или эритроцит-агар. На жидких средах бруцеллы растут с образованием легкого помутнения и небольшого слизистого осадка. На плотных средах колонии появляются не ранее чем через 48 ч: округлые, диаметром до 5 мм, серовато-белые, блестящие, прозрачные с янтарным оттенком в проходящем свете. При формировании изолированных колоний на плотной среде получают чистую культуру и определяют вид бруцелл (см. ниже).

Пунктат костного мозга для *выделения миелокультуры* сеют на те же среды. Установлено, что миелокультуры при бруцеллезе удается получить в 1,5—2 раза чаще, чем гемокультуры.

Мочу для *выделения уринокультуры* асептически берут в конце лихорадочного периода катетером и центрифугируют. Из осадка делают посеvy в чашки с печеночным агаром, содержащим генциановый фиолетовый в разведении 1 : 200 000 для подавления роста грамположительной микрофлоры. Уринокультуры удается выделить в 9—14 % случаев. Применяют и другие селективные среды.

Молоко животных (коз, овец, коров) центрифугируют и 0,1—0,2 мл сливок засевают в чашки с печеночным агаром, содержащим генциановый фиолетовый или другую селективную среду.

Наибольшую высеваемость бруцелл получают при посевах исследуемого материала в желток свежего куриного яйца или желточный мешок куриного эмбриона. Кровь больного разводят 1 : 3 цитратным бульоном и вводят в несколько яиц по 0,1—0,2 мл. Зараженные яйца или куриные эмбрионы выдерживают 5 дней при 37 °С, затем 0,3—0,5 мл содержимого желточного мешка переносят на плотные и в жидкие питательные среды. Посевы изучают каждые 2—3 дня.

Таблица 2.7

Дифференциальные признаки видов и биоваров патогенных бруцелл

Вид, биовар	Потребность в CO ₂	Образование H ₂ S	Рост в присутствии			РА с мочью и сывороткой к АГ			Лизис фагом	Окисление								
			фуксина	тионина		А	М	R		L-Аланин	L-Аспарагин	Глутаминовая к-та	L-Арабиноза	D-Галактоза	D-Рибоза	D-Ксилитоза	L-Аргинин	L-Лизин
				1 : 25 000	1 : 50 000													
<i>B. melitensis</i>																		
1	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	
2	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	
3	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	
<i>B. abortus</i>																		
1	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
2	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
3	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
4	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
5	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
6	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
7	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
8	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
9	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
<i>B. suis</i>																		
1	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	
2	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	
3	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	
4	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	
<i>B. canis</i>																		
	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	

Примечание. «-» — отрицательная реакция; «+» — положительная реакция.

При окраске мазков по методу Козловского бруцеллы окрашиваются в розовый цвет.

Окраска по Козловскому. Мазок фиксируют в пламени, окрашивают 3%-м водным раствором сафранина с подогреванием над пламенем до появления паров, промывают водой и докрашивают в течение 1,0—1,5 мин 1%-м водным раствором метиленового синего, снова промывают водой и высушивают.

Бруцеллы не ферментируют углеводы, не свертывают молоко и не разжижают желатин. Различные виды бруцелл содержат разные антигены, поэтому идентифицируют их в РА с моноспецифическими сыворотками против антигенов А, М, R.

Бруцеллы дифференцируют также по способности к росту в отсутствие повышенной концентрации углекислого газа, выделению сероводорода, чувствительности к специфическому бактериофагу и бактериостатическому действию анилиновых красителей (табл. 2.7).

Биологическое исследование. Это исследование проводится только в специальных лабораториях. Наиболее восприимчивыми животными являются морские свинки и белые мыши (при любом методе заражения). Кровь больных вводят животным внутрибрюшинно (морским свинкам 2—3 мл, белым мышам — 0,5—1,0 мл), осадок мочи и сливки, отцентрифугированные из молока животных, вводят подкожно.

Через 20—30 дней после заражения берут кровь у морской свинки (или мыши) и ставят РА. Затем животных забивают, вскрывают и делают посевы крови, взятой из сердца, взвеси из внутренних органов и лимфатических узлов. Идентификацию возбудителя ведут, как описано выше.

ПЦР. Учитывая сложность культивирования бруцелл, применение ПЦР позволяет при значительном повышении чувствительности метода обнаружения возбудителя существенно сократить сроки анализа. В качестве мишеней для праймеров используют участок генома *B. abortus*, кодирующий иммуногенный белок (BCSP31), или фрагмент гена, кодирующего синтез мембранного белка с массой 43 кДа. Чувствительность метода — 100 клеток в образце.

2.2.5. Сап и мелиоидоз

Мелиоидоз и сап — зоонозные особо опасные инфекции, протекающие в форме острой или хронической септицемии или септикопиемии, с поражением кожи, легких, печени, почек и других органов и тканей. Возбудители сапа (*Burkholderia mallei*) и мелиоидоза (*Burkholderia pseudomallei*) относятся к бактериям 2-й группы патогенности и по свойствам близки псевдомонадам, к которым их относили до недавнего времени.

В основе диагностики лежит выделение возбудителя, биопроба и иммунологические исследования.

Материалом для исследования служат кровь, моча, рвотные массы, кал, мокрота, гнойное отделяемое язв, содержимое абсцессов, отделяемое конъюнктивы, носа и носоглотки.

Взятие материала, его транспортировку в лабораторию и изучение проводят с соблюдением режима, принятого при работе с возбудителями особо опасных инфекций.

Бактериологическое исследование. Взятый материал засевают на МПА, кровяной агар, МПБ с 3—5 % глицерина. Для подавления роста сопутствующей микрофлоры используют селективные среды, содержащие красители — кристаллический фиолетовый (1 : 200 000), бриллиантовый зеленый (1 : 1 000 000) и др., а также антибиотики (гентамицин, колистин и др.). Для выделения возбудителя мелиоидоза можно использовать среду МакКонки с добавлением колистина или без него.

Для выделения гемокультуры 10 мл крови больного засевают в 250 мл МПБ. Материал твердой консистенции измельчают, суспензируют в ИХН и засевают на МПБ с глицерином.

Через 20—24 ч инкубирования при 37 °С на МПБ наблюдается рост культуры в виде равномерного помутнения среды и образо-

Таблица 2.8

Дифференциальные признаки некоторых клинически значимых псевдомонад и близких к ним микроорганизмов

Вид микроорганизмов	Признаки											
	Оксидаза	Цетримид (рост)	Рост при 42 °С	Газ из нитрата	Подвижность	Желатин	Аргинин	Лизин	Глюкоза (к-та)	Лактоза (к-та)	Мальтоза (к-та)	Ксилоза (к-та)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	+	-	V	+	+	-	-	-	+	-	+	+
<i>Burkholderia mallei</i>	V	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>Burkholderia cepacia</i>	+	V	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	-	V	-	+	+	-	+	+	V	+	V
<i>Comamonas acidovorans</i>	+	-	V	-	+	-	-	-	-	-	-	-

Примечание. «-» — отрицательная реакция; «+» — положительная реакция; «V» вариабельная реакция

вания складчатой пленки. На МПА с глицерином через 48 ч образуются небольшие складчатые колонии с кремовым, серо-белым оттенком или гладкие, слизистые колонии. Культуры *B. pseudomallei* издают своеобразный ароматный запах.

Идентификацию выделенной культуры проводят на основании изучения физиолого-биохимических признаков и антигенных свойств (табл. 2.8).

Характерными признаками возбудителя сапа являются потребность в присутствии глицерина для роста, отсутствие подвижности, способности расти при 42 °С и разжижать желатину, для возбудителя мелиоидоза — биполярность при окраске методом Грама и другими антилиновыми красителями, гемолиз кроличьих эритроцитов на 2%-м кровяном агаре, свертывание молока, окисление лактозы, мальтозы, ксилозы и других сахаров.

Антигенные свойства возбудителя определяют в РА со специфическими сыворотками.

Биологическое исследование. Заражение экспериментальных животных с целью диагностики мелиоидоза и сапа находит широкое применение. Морских свинок или золотистых хомячков заражают различными методами (подкожным, внутрибрюшинным и др.).

При введении исследуемого материала на слизистые оболочки развиваются гнойный конъюнктивит, ринит или вагинит с образованием язв; увеличиваются и нагнаиваются лимфатические узлы, повышается температура тела; на 6—8-й день появляются судороги и наступает смерть.

При подкожном заражении животного на месте введения образуется припухлость, через 2—3 дня — некроз, язва с подрытыми краями; лимфатические узлы увеличиваются, становятся плотными, нагнаиваются, в органах появляются пиемические очаги; животное погибает примерно на 20-й день после заражения.

У самцов морских свинок при внутрибрюшинном введении исследуемого материала на 2—3-й день после заражения возникает перитонит и орхит (*скротальный феномен*). Посев органов павших животных позволяет выделить возбудителя заболевания.

Для ускоренной диагностики сапа и мелиоидоза применяется РИФ. Мазки из заразного материала обрабатывают соответствующими флюоресцирующими сыворотками. При наличии возбудителя в материале отмечается характерное свечение.

Серологическое исследование. Серодиагностика имеет вспомогательное значение и проводится с помощью РСК, РА, РНГА. РА нередко дает ложноположительные результаты у больных сапом и даже у здоровых лиц. РНГА с мелиоидозным антигеном может давать положительные результаты при сальмонеллезе, бруцеллезе, туляремии. Более специфичной и чувствительной является РСК. Положительный результат наблюдают уже в конце первой недели болезни. Диагностический титр — 1:20. Следует учитывать, что

РСК с мелиоидозным антигеном может быть положительной и при сапе.

Аллергологическое исследование. При подозрении на сап на внутреннюю сторону предплечья строго внутрикожно вводят 0,1 мл аллергена из клеток *B. mallei* — *маллеина* (в разведении 1 : 100). Учитывают, как и другие реакции ГЗТ, через 24—48 ч. У больных реакция положительна со 2—3-й недели заболевания.

Мелиоидозный аллерген — уитморин обладает выраженными дерматонекротическими свойствами, поэтому кожная аллергическая проба с этим аллергеном не нашла широкого применения в медицинской практике.

2.2.6. Инфекции, вызываемые бордетеллами

К роду бордетелл относятся *Bordetella pertussis* (возбудитель коклюша), *Bordetella parapertussis* (возбудитель паракоклюша) — бактерии 3-й группы патогенности и *Bordetella bronchiseptica*, которые иногда вызывают острые воспалительные процессы в верхних дыхательных путях человека (чаще профессиональное заболевание). Из-за большого числа стертых форм и сходства симптомов этих заболеваний особую значимость в клинической диагностике приобретают лабораторные методы исследования. «Золотым стандартом» в диагностике является выделение и идентификация возбудителя.

Бактериологическое исследование. При бактериологической диагностике коклюша и паракоклюша производят посев мокроты методом «кашлевых пластинок». Для этого в момент приступа кашля перед ртом больного на расстоянии 8—12 см помещают открытую чашку Петри с питательной средой (картофельно-глицериновый агар по Борде, молочно-кровяной или казеиново-угольный агар) и выдерживают в течение 6—8 кашлевых толчков. Чашку закрывают и помещают в термостат при 37 °С. Если кашель отсутствует, отделяемое слизистой оболочки с задней стенки глотки собирают клювовидным тампоном через рот или тампоном через нижние носовые ходы и сеют на чашки с указанными выше питательными средами. При взятии материала следует избегать попадания на тампон материала (микрофлоры) со слизистой оболочки щек, языка, миндалин (для этого используют шпатель). Следует учитывать также, что на сухом ватном тампоне бордетеллы быстро отмирают в результате высушивания и действия токсичных для них компонентов ваты. Если нет возможности немедленно посеять материал, его берут тампоном, смоченным в ИХН. Материал доставляют в лабораторию как можно быстрее и засевают на селективные среды в течение 2 ч после взятия. При посеве взятый тампоном материал тщательно растирают по поверхности агара (от периферии к центру чашки) для получения хорошо изолированных колоний. Такое исследование проводят дваж-

ды. Наибольшая высеваемость приходится на первую неделю болезни, затем количество положительных результатов уменьшается.

Картофельно-глицериновый агар по Борде. Сварить 100 г мелко нарезанного картофеля с 200 мл 4%-го глицерина; растворить 5 г агара в 150 мл 0,6%-го хлорида натрия; к 150 мл агара прибавить 50 мл отвара и стерилизовать. Накануне посева расплавить и остудить до 50 °С среду и прибавить 30—50 % дефибрированной крови кролика. Для подавления сопутствующей флоры в готовую среду рекомендуют добавлять 15—25 ЕД пенициллина.

Мазки из клинического материала или изолированных колоний для индикации возбудителя можно обрабатывать специфическими люминесцирующими сыворотками (прямая РИФ). Ответ получают через 2—6 ч. Хорошие результаты дает индикация нуклеиновых кислот возбудителей коклюша и паракоклюша с помощью ПЦР.

На 3—5-е сут после посева на агаре появляются типичные мелкие колонии *B. pertussis* — выпуклые, влажные, блестящие, серые, напоминающие капли ртути. Колонии паракоклюшных бордетелл несколько крупнее. Из колоний делают мазки и окрашивают их по Граму. Возбудитель коклюша имеет вид мелких овоидных грамотрицательных палочек.

При положительном результате остатки колоний используют для проведения РА на стекле с коклюшной и паракоклюшной сыворотками, разведенными 1 : 10. Затем выделяют чистую культуру и идентифицируют ее по ряду признаков (табл. 2.9).

Типирование возбудителя проводят в РА на стекле с факторными (монорецепторными) диагностическими сыворотками.

Серологическое исследование. Серодиагностику проводят при отрицательных результатах других исследований. Для этого начиная со 2—3-й недели заболевания можно исследовать сыворотку крови в РСК или РА. В связи с массовым проведением прививок, приводящих к появлению в крови здоровых людей специфических антител, необходимо исследовать парные сыворотки. Нарастание титра антител в динамике заболевания подтверждает диагноз. Антигеном в серологических реакциях служит взвесь живых культур бордетелл. В качестве дополнительного контроля рекомендуется при проведении реакций использовать коклюшную и паракоклюшную иммунные сыворотки. Диагностическим титром у непривитых и ранее не болевших считается разведение сыворотки 1 : 80.

Наиболее чувствительной и удобной для выявления коклюша является РНГА.

Для оценки иммунологической перестройки организма детей, вакцинированных АКДС-вакциной, проводят реакцию нейтрализации антигена с коклюшным эритроцитарным антительным диагностикумом. Эта реакция более чувствительна, чем РА.

Таблица 2.9

Дифференциально-диагностические признаки бордетелл

Тест	Вид микроорганизмов			
	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. bronchiseptica</i>	<i>B. avium</i>
Время появления колоний, сут	3—6	2—3	1—2	1—2
Размеры колоний (в мм) через 72 ч после посева	1—2	2—4	2—4	2—4
Рост на МПА	—	+	+	+
Изменение цвета питательной среды	—	+	—	—
Оксидаза	+	—	+	+
Наличие уреазы	—	+	+	—
Подвижность	—	—	+	+
Восстановление нитратов в нитриты	—	—	+	—
Утилизация цитрата	—	—	+	+
Образование пигмента из тирозина	—	+	—	—
Видовой агглютинин	1	14	12	10

Примечание. «—» — отрицательная реакция; «+» — положительная реакция.

С целью серологической диагностики можно также использовать ИФА. Этот метод позволяет дифференцировать антитела, образовавшиеся в острый период заболевания от поствакцинальных.

2.2.7. Легионеллез

Легионеллез — сапронозная инфекционная болезнь, передаваемая с водными аэрозолями и характеризующаяся развитием специфической пневмонии, поражением других органов и систем, а также высокой летальностью. Основной возбудитель — *Legionella pneumophila* — относят к микроорганизмам 2-й группы патогенности. Причиной легионеллеза могут быть и другие виды легионелл (чаще *Legionella micdadei*, реже *Legionella bozemanii* или *Legionella dumoffii*).

Диагностика базируется на клинико-эпидемиологических данных и лабораторном исследовании. Основным методом диагно-

стики является бактериологический (его чувствительность составляет 70 %, специфичность — 100 %). Для подтверждения диагноза используют также выявление специфических антител в сыворотке крови (серодиагностику). Ввиду тяжелого течения заболевания и часто массового характера заболеваемости применяют экспресс-диагностику. Материалом для исследования от больных людей служат мокрота, бронхо-легочный аспират, кусочки из пораженных участков легких, взятые при биопсии или аутопсии, сыворотка крови, по показаниям — моча. Исследование по выделению возбудителя рекомендуется проводить сразу после взятия материала или в течение 1 ч после него.

Микроскопия материала имеет невысокую диагностическую ценность, однако обнаружение в окрашенных препаратах полиморфных грамтрицательных палочек при соответствующих клинико-эпидемиологических данных позволяет заподозрить легионеллез.

Бактериологическое исследование. Биопсийный и другой материал засевают на специальные среды (например, угольно-дрожжевой агар с *L*-цистеином и пирофосфатом железа, селективные среды с антибиотиками, шоколадный агар и др.). Питательной основой этих сред, как правило, является дрожжевой экстракт и α -кетоглутарат. Активированный уголь необходим для связывания токсических продуктов, образующихся в процессе роста культур, и оптимизации показателя поверхностного натяжения. Для придания селективных свойств в состав сред для легионелл обычно вводят 3 антибиотика (полимиксин В, анизомидин и ванкомицин или цефомандол), которые задерживают рост грамположительных бактерий, грибов и грамтрицательных бактерий соответственно. Посев желательно делать одновременно на селективную и неселективную среду, так как встречаются чувствительные к антибиотикам штаммы возбудителя.

Засеянные чашки инкубируют во влажной атмосфере 2—14 сут при 35 °С. Наличие 2—5 % CO₂ в атмосфере стимулирует рост легионелл. Обычно на 2—3-и сут на плотных средах вырастают колонии легионелл. На неселективных средах они значительно мельче, чем на селективных, так как их рост могут подавлять сопутствующие микроорганизмы, особенно дрожжевые грибы. Колонии округлые ровные, под микроскопом имеют пятнистую поверхность, в косопроходящем свете дают красно-сине-зеленое свечение; для них характерна липкая консистенция («тянутся» за петлей).

При идентификации и дифференциации выделенных культур учитывают их тинкториально-морфологические, антигенные и другие свойства. При окраске по Граму вместо сафранина лучше использовать фуксин (в этом случае лучше видны тонкие бледно-розовые палочки). Возбудители легионеллеза, как правило, не дают флюоресценции при облучении длинноволновым ультрафиолетом,

подвижны. В отличие от других возбудителей легионеллеза, *L. pneumophila* гидролизует гиппурат натрия, а *L. micdadei* не разжижает желатин и не имеет коричневого пигмента. Возбудители отличаются также по антигенной структуре и по составу жирных кислот. Идентификацию по антигенной структуре проводят чаще методом прямой РИФ с поликлональными люминесцирующими сыворотками. Определение состава жирных кислот, как и геноидентификацию, проводят только в специализированных лабораториях.

Методы индикации возбудителя (экспресс-диагностика). Для быстрого обнаружения патогенных для человека легионелл в исследуемом материале применяют прямую РИФ (исследование мокроты), а также ИФА, РИА и реакцию агглютинации латекса (исследование мочи). Чувствительность этих методов составляет 25—90 %, специфичность — более 85 %. Результаты исследования получают через несколько часов; недостатком является ограниченное количество выявляемых серогрупп легионелл.

Для выявления ДНК легионелл разработано несколько вариантов ПЦР, основанных на амплификации гена *tip* (кодирует поверхностный макрофаг-индуцирующий белок), гена цитолизина и ряда других маркеров. Наиболее широко применяется двухэтапная ПЦР-диагностика: вначале — предварительное определение легионелл с универсальными для семейства праймерами (чувствительность — 30—50 клеток в образце), а затем проводят внутривидовую идентификацию *L. pneumophila* с использованием высокоспецифичных праймеров. Использование ПЦР позволяет также обнаруживать легионеллы в объектах внешней среды и изучать их связи в различных микробиоценозах.

Серологическое исследование. Для серодиагностики, как правило, используют непрямую РИФ (в динамике). При этом в качестве антигена используют клетки убитых нагреванием или формалином легионелл эталонного штамма. Чувствительность метода составляет 70—80 %, специфичность — более 95 %. Этот метод является вспомогательным ввиду перекрестных реакций и позднего нарастания титра антител. Сероконверсия обычно отмечается в течение 3 нед, но до 15 % сероконверсий приходится на срок 3—6 нед. Для повышения специфичности реакции исследуемую сыворотку адсорбируют взвесью перекрестно-реагирующих антигенов.

2.2.8. Инфекция, вызываемая *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa — синегнойная палочка, являясь распространенным условно-патогенным микроорганизмом, вызывает ряд оппортунистических инфекций. В их числе: отит, нагноения поврежденных кожных покровов и слизистых оболочек (в том числе

ожогов, ран), инфекции мочевыводящих путей, менингит, менингоэнцефалит, энтерит, пневмонию, бактериемию (септицемию), эндокардит, кератит, остеомиелиты, артриты. Несмотря на наличие патогномичных симптомов (синдром *ectyma gangrenosa* и др.), основным методом подтверждения инфекции является выделение возбудителя и определение его чувствительности к антимикробным средствам.

Материал для исследования — гной, отделяемое ран, моча, спинномозговая жидкость, кровь, кал и др. Его берут по возможности до начала антибиотикотерапии или во время паузы между антимикробными воздействиями в соответствии с правилами асептики, не допуская контаминации. Если невозможно взять материал непосредственно из очага инфекции, исследованию подлежит отделяемое из очага (моча, мокрота и т. п.).

Бактериологическое исследование. В мазках из исследуемого материала обнаруживают прямые грамтрицательные палочки длиной 1—3 мм, расположенные беспорядочно, или короткими цепочками, часто в цитоплазме фагоцитов (в деформированном виде). В нативных препаратах псевдомонады подвижны.

Материал засевают для получения изолированных колоний и выделения чистой культуры на плотные среды: МПА, кровяной агар, среду Эндо или Плоскирева, ЦПХ-агар, среды с цетримидом (четвертичное аммониевое соединение). После инкубирования в течение 18—24 ч при 37 °С отмечают выросшие колонии, характерные для каждой среды, микроскопируют материал из них и остаток колонии пересевают для накопления на скошенный МПА или полиуглеводную среду типа агара Олькеницкого. На МПА, например, синегнойная палочка образует колонии средних размеров с запахом фиалки или жасмина. До 80 % культур имеют важный диагностический признак — выделяют водорастворимый пигмент *пиоцианин*, окрашивающий в сине-зеленый цвет (в щелочной среде при доступе кислорода) питательную среду, а также отделяемое и перевязочный материал. Многие культуры обладают также другим пигментом — *пиовездином* (флюоресцеином), который при облучении ультрафиолетом дает желто-зеленое свечение. Последний встречается и у других псевдомонад.

Среда Олькеницкого и другие дифференциальные среды с глюкозой в столбике при росте синегнойной палочки не изменяется. Выделенную чистую культуру подвергают окончательной идентификации (см. табл. 2.8), проводят фаготипирование и обязательно определяют чувствительность к антибиотикам. Последнее необходимо, в частности, для правильного индивидуального подбора этиотропного лекарственного средства.

Определение *оксидазы* реактивом с 1 % диметилфенилендиамина и 1 % α -нафтола в 96%-м этиловом спирте, как и *каталаз*-

ной активности с помощью 3%-го раствора H_2O_2 , проводят по стандартным методикам.

Тест окисления-ферментации глюкозы проводят в пробирках со средой Хью—Лейфсона столбиками, в одну из которых заливают вазелиновое масло. Пробирки выдерживают в термостате при $37^\circ C$ в течение четырех суток с ежедневным учетом результатов. Изменение цвета открытой среды с травянисто-зеленого на желтый свидетельствует об окислении глюкозы (см. цв. вклейку, рис. 9, а, б). Под вазелиновым маслом цвет среды не изменяется (синегнойная палочка относится к «неферментирующим» бактериям).

Выделение газа из нитрата калия определяют следующим образом: культуру засевают в МПБ, содержащий 1 % нитрата калия и поплавков, заливают вазелиновым маслом. Посевы инкубируют 48 ч при $37^\circ C$. При положительном результате отмечается помутнение и образование газа, в контроле без вазелинового масла — только помутнение.

Чувствительность к антибиотикам синегнойной палочки определяют строго в соответствии с унифицированным методом.

2.3. Факультативно-анаэробные грамотрицательные палочки

2.3.1. Инфекции, вызываемые *Escherichia coli* (эшерихиозы)

Род *Escherichia* включает большое количество микроорганизмов, обладающих рядом общих свойств, но отличающихся по биохимическим, антигенным и патогенным свойствам. В состав вида *Escherichia coli* наряду с непатогенными (банальными) кишечными палочками входят патогенные варианты: ЭГКП (энтерогеморрагические кишечные палочки) — возбудители энтерогеморрагического эшерихиоза с гемолитико-уремическим синдромом, ЭИКП (энтероинвазивные), вызывающие дизентериеподобные заболевания, ЭТКП (энтеротоксигенные), вызывающие холероподобный эшерихиоз — так называемую диарею путешественников, ЭПКП (энтеропатогенные) — возбудители детских энтеритов и другие возбудители кишечных инфекций, а также уропатогенные эшерихии — возбудители инфекций мочевых путей. Другие эшерихии, являясь условно-патогенными, могут вызывать оппортунистические инфекции: пневмонии, нагноения ран и полостей, менингиты, сепсис. Помимо *Escherichia coli*, такими свойствами могут обладать другие представители рода: *Escherichia hermannii*, *Escherichia vulneris*. При накоплении в пищевых продуктах эшерихии могут стать причиной пищевого отравления.

Ввиду сходства морфологических и тинкториальных свойств патогенных и условно-патогенных эшерихий с другими энтеро-

бактериями микроскопический метод неинформативен и в диагностике практически не используется. В основе диагностики заболеваний, вызванных эшерихиями, лежит выделение возбудителя и определение его принадлежности к той или иной патогенной группе (на основании антигенной структуры и выявления факторов патогенности и/или патогенных свойств — токсинов, адгезинов, инвазинов, а также их генетических детерминант).

Бактериологическое исследование. Материалом для исследования служат фекалии, которые берут у больного трижды в первые сутки от начала болезни с интервалом 3—4 ч, а также рвотные массы, промывные воды желудка и кишечника, кровь (при сепсисе), гной (при гнойно-воспалительных процессах), отделяемое слизистой оболочки зева, носа, моча, мокрота (при пневмонии); от трупов — содержимое кишечника, кровь, кусочки селезенки, легких и других органов. При подозрении на пищевую токсикоинфекцию исследуют также остатки пищи, смывы с посуды и рук обслуживающего персонала, медикаменты, применяемые *per os*.

Для выделения эшерихий используют среды Эндо и Плоскирева, а для выделения *Escherichia coli* O157: H7 (ЭГКП, продуцирующих веротоксин — шигаподобный цитотоксин) — среду МакКонки с сорбитом. Посевы лучше делать у постели больного.

Через 18—24 ч инкубации при 37 °С изучают характер колоний на плотных средах (см. цв. вклейку, рис. 7, а). Эшерихии «патогенных сероваров» по культуральным свойствам и способности ферментировать лактозу не отличаются от банальных эшерихий, обитающих в кишечнике человека (за исключением лактозоотрицательных ЭИКП). Поэтому принадлежность выделенных микроорганизмов к патогенным группам вначале устанавливают по антигенной структуре с помощью РА. При этом отмечают на среде любые 10 лактозоположительных колоний и агглютинируют их на стекле смесью ОК-сывороток «патогенных серогрупп». Смесью готовят таким образом, чтобы конечное разведение каждой сыворотки составляло 1 : 10. Отрицательная РА свидетельствует об отсутствии патогенных *E. coli*.

При росте на среде МакКонки с сорбитом ЭГКП образуют бесцветные колонии в отличие от других эшерихий, которые ферментируют этот углевод и образуют красные колонии.

Подозрительные колонии (при положительном результате РА — оставшаяся часть колоний) пересевают на комбинированную скошенную полиуглеводную среду (Рассела, Клигера и т. п.).

На 3-й день учитывают изменения на комбинированном агаре (см. цв. вклейку, рис. 8, б). Ферментацию глюкозы с образованием кислоты или кислоты и газа выявляют по изменению цвета столбика агара (пожелтение среды, нарушение ее целостности), ферментацию лактозы (и сахарозы) — по пожелтению скошенной части среды. При отсутствии ферментации углеводов среда может

Дифференциация клинически значимых видов энтеробактерий

Вид	Тест																			
	Индол	Метилловый красный	Ацетоин	Цитрат	Сероводород	Мочевина	Фенилаланин	Лизин	Аргинин	Орнитин	Подвижность	Желатин	Глюкоза (газ)	Лактоза (к-га)	Сахароза (к-га)	Маннит (к-га)	Дульцит (к-га)	Рамноза (к-га)	Ксилоза (к-га)	
Патогенные																				
<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	-	-	-	-	+	-	∇	+	-	+	+	∇	+	∇	+	+	
<i>Shigella dysenteriae</i>	∇	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	∇	-	-
<i>Shigella flexneri</i>	∇	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Shigella boydii</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
<i>Salmonella*</i>	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
<i>Salmonella</i> серовара Typhi	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+
<i>Salmonella</i> серовара Paratyphi A	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	∇	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+

<i>Yersinia pestis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Условно-патогенные																			
<i>Citrobacter freundii</i>	V	+	-	+	+	V	-	-	V	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
<i>Citrobacter koseri</i>	+	+	-	+	+	V	-	-	+	+	+	-	+	V	V	+	V	+	+
<i>Edwardsiella tarda</i>	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	+	+	-	V	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
<i>Hafnia alvei</i>	-	V	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	V	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	V	+	+
<i>Morganella morganii</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	-	+	V	V	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
<i>Proteus vulgaris</i>	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+
<i>Proteus vulgaris</i>	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+
<i>Providencia alcalifaciens</i>	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Providencia rettgeri</i>	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>Providencia stuartii</i>	+	+	-	+	-	V	+	-	-	-	+	-	-	-	V	-	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	V	-	+	+	-	-	-

Примечание. «+» — положительный результат; «-» — отрицательный результат; «V» — вариабельный результат (через 1—2 дня при 37 °С); * большинство сероваров

зашелачиваться (за счет выделения аминов при разложении белка) и приобретать красный цвет.

На 4-й день исследования проверяют чистоту культуры, определяют ее основные физиолого-биохимические свойства (засевают культуру на среды Гисса и другие дифференциальные среды); проводят серотипирование выделенной культуры путем постановки ориентировочной РА на стекле с поливалентной ОК-сывороткой, а затем — развернутой РА с адсорбированными групповыми сыворотками для определения ОК-серогруппы. Дифференциальные биохимические признаки эшерихий представлены ниже (табл. 2.10).

Для типирования по К-антигену в один ряд пробирок с разведениями диагностической ОК-сыворотки вносят суспензию живой (негретой) культуры, а для определения О-антигена в другой ряд пробирок вносят гретую (кипяченную в течение 1 — 2 ч) взвесь бактерий. Кипячение или автоклавирование разрушает поверхностно расположенный К-антиген, который мешает определению О-антигена. Через сутки инкубирования при 37 °С гомологичные сыворотке штаммы агглютинируются до титра или до половины титра.

Культуру, давшую развернутую РА с одной из сывороток, сеют на остальные дифференциальные среды для окончательной идентификации.

Большую диагностическую ценность имеет обнаружение у выделенных культур (или непосредственно в патологическом материале) факторов патогенности: адгезинов, энтеротоксинов, цитотоксинов и др. Для этого иногда применяют методы иммуно- и генодиагностики (РА, ИФА, РП в геле, ДНК-зонды, ПЦР), а также экспериментальные модели (заражение культур ткани, лабораторных животных).

Адгезивность и инвазивность определяют на культурах тканей *Нер-2* или *HeLa* (см. подразд. 1.3.4, 3.1). Для этого бульонную культуру бактерий в логарифмической фазе суспензируют в культуральной среде и в строго определенном количестве вносят в емкости с монослоем эукариотических клеток. Через 3 ч инкубирования при 37 °С в присутствии CO₂ клетки ткани отмывают фосфатным буфером, фиксируют и окрашивают (для определения индекса адгезивности) или покрывают свежей культуральной средой, содержащей гентамицин (для уничтожения внеклеточно расположенных бактерий), и продолжают инкубировать в течение 1 ч, после чего многократно промывают монослой, фиксируют и окрашивают его клетки (для определения индекса инвазивности). Индексы вычисляют как среднее количество микробных клеток, взаимодействующих с одной эукариотической (при этом изучают не менее 100 эукариотических клеток в препарате).

Поскольку многие гены патогенности эшерихий находятся в составе плазмид вирулентности, для обнаружения патогенных

эшерихий применяют ДНК-зонды, приготовленные из рестрикционных фрагментов таких плазмид. Колонии эшерихий выращивают на поверхности нитроцеллюлозных фильтров, наложенных на поверхность питательного агара, лизируют их и с помощью ДНК-зондов определяют в лизатах нуклеотидные последовательности, кодирующие у патогенных эшерихий синтез факторов адгезии, инвазии и/или соответствующих токсинов (см. подразд. 1.7).

Для ускоренной идентификации возбудителя в исследуемом материале применяют прямую или непрямую РИФ. В этом случае предварительный результат получают через 1—2 ч. Для быстрого отбора подозрительных колоний (например, *Escherichia coli* O157:H7 на агаре с сорбитом), кроме агглютинирующих сывороток, используют латексные диагностикумы, покрытые соответствующими антителами (реакция латексной агглютинации).

Для выявления источника инфекции и путей заражения у выделенного штамма определяют фаговар и колициногеновар.

Серологическое исследование. Серодиагностика является вспомогательным методом и направлена на обнаружение (например, в ИФА) антител разных классов к эшерихиям и их динамики: смена специфических антител класса *IgM* на *IgG* свидетельствует об остром инфекционном процессе, тогда как наличие в сыворотках антител только класса *IgG* характерно для бактерионосительства. Уточнить диагноз эшерихиоза помогает также обнаружение антител в РА с гретой культурой аутоштамма, но положительный результат получают нерегулярно. Результаты исследования сывороток имеют значение в основном для эпидемиологического анализа.

Таким образом, диагностику эшерихиозов проводят преимущественно путем выделения возбудителя, его идентификации и дифференциации с непатогенными эшерихиями (по антигенным и патогенным свойствам).

2.3.2. Инфекции, вызываемые сальмонеллами брюшного тифа и паратифов

Брюшной тиф и паратифы *A* и *B* — острые антропонозные инфекции, вызываемые сальмонеллами и сопровождающиеся бактериемией, интоксикацией и характерным язвенно-некротическим поражением лимфатического аппарата тонкой кишки. В состав рода *Salmonella*, по современным данным, входят два вида сальмонелл: *Salmonella enterica* (с 6 подвидами) и *Salmonella bongori*. По антигенной структуре различают более 2400 сероваров сальмонелл, большинство из которых принадлежит подвиду *Salmonella enterica* ssp. *enterica* (так называемые сальмонеллы 1-й ДНК-группы, куда отнесены возбудители тифо-паратифозных заболеваний и сальмо-

неллезов). Их дифференциация возможна только на основе лабораторных методов. Возбудитель брюшного тифа — *Salmonella* серовара Typhi (*Salmonella enterica* spp. *enterica* ser. *typhi*, прежнее название *Salmonella typhi*), паратифа А — *Salmonella* серовара Paratyphi А, паратифа В — *Salmonella* серовара Paratyphi В. Они, как и большинство других сальмонелл, являются безусловно-патогенными микроорганизмами и относятся к 3-й группе патогенности.

Выбор материала и метода микробиологической диагностики этих заболеваний зависит от стадии патогенеза. На первой неделе заболевания возбудитель выделяют из крови (гемокультура), с конца второй и на третьей неделе — из мочи (уринокультура) и испражнений (копрокультура); возможно исследование костного мозга (выделение миелокультуры), скарификата розеол (розеолокультура), а также (по показаниям) ликвора, содержащего двенадцатиперстной кишки, секционного материала. У реконвалесцентов исследуют испражнения и желчь (выделение биликультуры). Начиная со второй недели заболевания проводят серологическое исследование.

Бактериологическое исследование. Выделение и идентификация возбудителя является основным методом диагностики тифо-паратифозных заболеваний. Материалом для исследования служат кровь, кал, моча, желчь, отделяемое из скарифицированных розеол, а в отдельных случаях — пунктат костного мозга, спинномозговая жидкость, гной из септических очагов, некротизированные ткани и др.

Наиболее ранним и надежным методом бактериологической диагностики является выделение возбудителей из крови (*гемокультура*). Сальмонеллы брюшного тифа и паратифов содержатся в крови в течение всего лихорадочного периода и даже в первые дни нормальной температуры (особенно при брюшном тифе у вакцинированных). В ранние сроки от начала заболевания интенсивность бактериемии выше, чем в конце лихорадочного периода, поэтому для проведения исследования в начале болезни необходимо 10 мл крови, а в более поздние сроки — 15—20 мл.

Кровь берут асептически непосредственно у постели больного во время подъема температуры тела и засевают для накопления сальмонелл на 10%-й желчный бульон или среду Рапопорт.

Среда Рапопорт. Представляет собой 10%-й желчный бульон с добавлением 1 % маннита или 2 % глюкозы, 1 % индикатора Андрее; во флакон со средой помещают поплавки для улавливания газа; соотношение крови и среды должно быть 1 : 10.

Засеянные флаконы инкубируют при 37 °С 18—24 ч. При размножении сальмонелл в результате расщепления маннита или глюкозы рН среды сдвигается в кислую сторону и она приобретает красный цвет. Появление в поплавке газа свидетельствует о ве-

роятном присутствии «паратифозных» сальмонелл, так как они расщепляют указанные углеводы до кислоты и газа.

На 2-й день исследования материал со среды накопления пересевает на чашки с плотными средами (Плоскирева, Эндо, Мак-Конки) для выделения чистой культуры. На дифференциально-диагностических средах через 18—24 ч инкубации обнаруживают бесцветные колонии, так как сальмонеллы не ферментируют лактозу (см. цв. вклейку, рис. 7, б). После учета характера роста на чашках делают пересев на комбинированную полиуглеводную среду.

На 3-й день отмечают изменения комбинированной среды: закисление среды в столбике агара свидетельствует о ферментации глюкозы (в случае газообразования появляются также разрывы среды), сероводород обнаруживают по почернению среды (см. цв. вклейку, рис. 8, з). После проверки чистоты культуру засевают на дифференциальные среды для идентификации и на скошенный агар для серотипирования (см. табл. 2.10).

На 4-й день исследования учитывают изменения сред «пестрого» ряда, окончательные результаты реакции агглютинации и выдают ответ. В ходе серотипирования вначале ставят ориентировочную РА на стекле с поливалентной *O*-сывороткой, а затем с монорецепторными *O*- и *H*-сыворотками. Пользуясь схемой Кауфмана—Уайта, определяют *O*-серогруппу и серовар выделенной сальмонеллы. Гемокультура сальмонелл брюшного тифа может не агглютинироваться *O*-сыворотками ввиду присутствия у нее *Vi*-антигена. Для его разрушения культуру выдерживают в течение 15 мин в кипящей воде и повторно тестируют с теми же *O*-сыворотками.

Для внутривидового типирования (с целью определения источника инфекции и путей передачи) проводят пробу с сальмонеллезными фагами: выделенную культуру засевают газоном на питательный агар в чашке Петри, куда затем наносят по 1 капле типовых фагов, подсушивают и инкубируют при 37 °С 18—20 ч. Наличие лизиса культуры («стерильного пятна» в газоне роста) позволяет определить принадлежность выделенного штамма к определенному фаговару. Совпадение фаговаров у штаммов данного вида свидетельствует об общности их происхождения.

Посев крови в среде накопления оставляют на несколько суток в термостате, так как в некоторых случаях размножение возбудителей в желчных средах происходит медленно. Пересевы на скошенный агар, среды Олькеницкого и Эндо производят на 3—4-й, 6-й и 10-й день инкубации. Отрицательный ответ выдают на 11-й день.

Следует отметить, что сальмонеллы иногда выделяют из крови хронических бактерионосителей при резком изменении состояния их иммунореактивности (гельминтозы, злокачественные опухоли и т. д.).

Испражнения для исследования берут в стерильные пробирки или баночки, не содержащие следов дезинфицирующих веществ,

в количестве 3—5 г. Сеют фекалии на среду Плоскирева, висмут-сульфитный агар, среду Эндо в чашках, а также на среды накопления (селенитовую, магниевую, тетрагидратную, Кауфмана, Мюллера) с последующей 18—24-часовой инкубацией при 37 °С. При невозможности немедленного посева испражнения помещают в глицериновый консервант (30%-й глицерин в стерильном ИХН), а затем направляют материал в лабораторию.

На 2-й день отмечают появление бесцветных (лактозоотрицательных) колоний на средах Плоскирева, МакКонки или Эндо, а также черных колоний на висмутсульфит-агаре (сальмонеллы паратифа А не образуют сероводород и поэтому их колонии имеют зеленый цвет). После изучения морфологии колонии пересевают на полиуглеводную среду. При отсутствии типичных колоний на те же среды засевают материал со среды обогащения.

На 3-й день исследователя чистую культуру выделенных бактерий сеют в среды «пестрого» ряда и проводят ориентировочную, а потом развернутую РА. Ставят реакции с поливалентной сывороткой, с сыворотками А, В, С, D, E, Vi и редких групп. При положительном ответе определяют группу, а также, с помощью монорецепторных О- и H-сывороток, полную антигенную формулу (серовар) сальмонеллы.

На 4-й день от начала исследования учитывают изменения сред «пестрого» ряда, результаты РА и выдают ответ. Таким образом, идентификация копрокультуры не отличается от идентификации гемокультуры.

Исследованию на микробоносительство подвергаются переболевшие брюшным тифом и паратифом, а также работники детских учреждений, системы питания и водоснабжения. Перед взятием испражнений им дают выпить натошак 100 мл 30%-го раствора магния или натрия сульфата (слабительные и желчегонные средства). Испражнения для исследования собирают не ранее чем через 2—4 ч после приема слабительного, засевают на селективную среду (например, агар Плоскирева) и одновременно в среду накопления, из которой после 6-часовой инкубации при 37 °С материал пересевают на среду Плоскирева (как фекалии от больных). Дальнейшее исследование проводится так же, как указано выше.

Мочу и ее осадок после центрифугирования высевают на плотную среду в чашке (Эндо, МакКонки или т.п.) и в среды накопления. При наличии характерного роста идентификация проводится по той же схеме, что для гемо- и копрокультуры. Таким же образом исследуют дуоденальное содержимое, соскоб розеол, секционный материал.

Фаговары сальмонелл, выделенных от больных и носителей, учитываются при установлении источника и путей заражения в ходе расследования вспышек тифо-паратифозных заболеваний.

Серологическое исследование. Для серологической диагностики брюшного тифа и паратифов используют развернутую РА (*реакцию Видала*). Антитела к возбудителям брюшного тифа, паратифов *A* и *B* обнаруживаются в сыворотке крови больных с 8—10-го дня заболевания. Для реакции Видала берут 2—3 мл крови из вены (или 1 мл из пальца, мочки уха). Полученную сыворотку последовательно разводят (табл. 2.11) в 6 параллельных рядах пробирок от 1:100 до 1:1600 и вносят *ОН*- и *О*-диагностикумы в пробирки (в 2 ряда соответственно): брюшнотифозный, паратифозный *A* и паратифозный *B*. Для контроля антигена каждый диагностикум в той же дозе вносят в 1 мл ИХН, а для контроля сыворотки используют сыворотку в разведении 1:100 без добавления диагностикумов. С целью получения *О*-диагностикумов суспензии соответствующих культур кипятят или обрабатывают спиртом; *ОН*-диагностикумы получают после обработки формалином.

Применение *О*-диагностикумов позволяет обнаружить *О*-антитела, которые появляются в крови на второй неделе заболевания и исчезают к его концу. *H*-агглютинины, напротив, нарастают к концу заболевания. Диагностический титр антител в реакции Видала у неиммунизированных составляет 1:100, а при отсут-

Таблица 2.11

Схема проведения реакции Видала

и последовательность операций	Количество ингредиентов в пробирках, мл						
	Опытные					Контроли	
	1	2	3	4	5	сыворотки	диагностикума
ИХН, мл	–	1,0	1,0	1,0	1,0	–	1,0
Сыворотка больного в разведении 1:100, мл	1,0	1,0	–	–	–	1,0	–
<i>Приготовление серийных разведений</i>							
Полученное разведение сыворотки	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:100	–
Диагностикум, капли	1	1	1	1	1	–	1
<i>Перемешивание и инкубирование</i> (2 ч при 37 °С + 18—20 ч при комнатной температуре)							
Пример учета реакции	+	+	–	–	–	–	–
Интерпретация результата: реакция Видала положительна в титре 1:200							

ствии типичной клинической картины — 1 : 200. Поскольку при снижении иммунной реактивности динамика нарастания титров специфических агглютининов может изменяться, отрицательная реакция Видалья не исключает тифо-паратифозное заболевание. В настоящее время в связи с ранним назначением антибиотиков для лечения возникают затруднения в оценке результатов РА, так как титр антител у больных невысок (ниже диагностического). Выявление *H*-антител не представляет диагностической ценности, так как они обнаруживаются у больных в конце заболевания, а также у переболевших и вакцинированных. В некоторых случаях *O*-антитела можно обнаружить у привитых, поэтому необходимо изучать реакцию Видалья в динамике. Для выявления нарастания титра антител исследуют сыворотки, взятые с интервалом 7—12 дней. Если сыворотка крови больного агглютинирует одновременно два или три вида диагностикумов, следует учитывать титр агглютинации. Обычно специфическая агглютинация происходит с большими, а групповая — с меньшими разведениями сыворотки.

Более чувствительны и чаще дают положительные результаты другие методы: РНГА с эритроцитарными групповыми (*A, B, C, D, E*) и монорецепторными диагностикумами, а также ИФА, которые ставят с парными сыворотками в динамике заболевания. Антитела к *O*-антигенам выявляют начиная со второй недели болезни, а к *Vi*-антигенам — в более позднем периоде. *Vi*-антитела чаще обнаруживаются у бактерионосителей сальмонелл брюшного тифа (ввиду того что *Vi*-антиген способствует длительной персистенции возбудителя в организме). Для предварительного отбора лиц, подозрительных на носительство тифозных палочек, используют РНГА с эритроцитарным *Vi*-диагностикумом (имеет значение не только обнаружение антител, но и их принадлежность к классу *IgG*).

Исследование воды. Возбудители брюшного тифа и паратифов содержатся в воде в небольших количествах, поэтому для их обнаружения применяются методы, позволяющие концентрировать клетки микроорганизмов, например, при помощи мембранных фильтров.

Воду в объеме 2 л и более пропускают через мембранные фильтры № 2 или № 3. Если вода содержит большое количество взвешенных частиц, затрудняющих фильтрацию, ее предварительно пропускают через нитроцеллюлозный фильтр № 6, который задерживает грубые частицы. Фильтры с осадком погружают в желчный бульон или накладывают их на висмут-сульфитный агар. Через 6—10 ч инкубации в термостате делают пересев из желчного бульона на среду Плоскирева. Дальнейшее исследование проводится по схеме исследования испражнений. После инкубации посевов в течение 2 сут с висмут-сульфитного агара отбирают подозрительные колонии черного цвета и идентифицируют до вида (серовара).

Исследование воды на присутствие брюшнотифозного (паратифозного) фага обычно применяется в тех случаях, когда обнаружить бактерии не удастся. Сточную воду пропускают через бактериальный фильтр. В стерильную чашку Петри вносят 1—2 мл исследуемого фильтрата, наливают 15—20 мл охлажденного до 45 °С МПА и тщательно перемешивают. После застывания агара сеют секторами культуры сальмонелл брюшного тифа, паратифов *A* и *B*. Наличие негативных колоний подтверждает присутствие соответствующего фага.

При исследовании питьевой воды ее засевают в концентрированный раствор пептона. К 100 мл испытуемой воды добавляют 10 мл пептона и 5 г хлорида натрия. Посевы инкубируют в течение суток, а затем исследуют фильтрат на наличие фага.

2.3.3. Сальмонеллез

Помимо возбудителей тифо-паратифозных заболеваний (антропозов), известно более 400 патогенных для человека сероваров сальмонелл, способных вызывать острые гастроэнтериты, тифоподобные и септикопиемические формы заболевания, получившего название сальмонеллез (зооантропоз). Основными возбудителями сальмонеллеза являются *Salmonella* сероваров Enteritidis, Typhimurium, Choleraesuis, Haifa, Heidelberg, Derby, Gallinarium и др. (бактерии 3-й группы патогенности). Лабораторному исследованию подлежат рвотные массы, промывные воды желудка, желчь, моча, спинномозговая жидкость, пунктат костного мозга, кровь (в первые часы заболевания — для выделения гемокультуры, а через две недели, обычно после выздоровления, — для обнаружения антител).

Для выявления носителей среди обслуживающего персонала пищевых предприятий, детских учреждений и др. исследуют фекалии после приема слабительного. От трупа берут для исследования содержимое желудка и кишечника, кровь из сердца, кусочки паренхиматозных органов, мезентериальные лимфатические узлы.

При пищевом пути заражения обязательно исследуют остатки пищи, продукты, из которых она готовилась, смывы со столов, разделочных досок, с рук обслуживающего персонала и других возможных факторов передачи инфекции.

Материал собирают в стерильные банки, пробирки в следующем количестве: кал и рвотные массы — 50—100 мл; промывные воды — 100—200 мл; мясо и мясные продукты — несколько кусков весом 500 г; полужидкие и жидкие продукты (сметана, молоко и др.) — 100—200 мл. Яйца отбирают по пять штук из шести разных мест исследуемой партии, причем в первую очередь те, которые хранились более 7 дней.

Указанные материалы отправляют в лабораторию упакованными и опечатанными. Рвотные массы, остатки пищи и другой мате-

риал плотной консистенции перед исследованием растирают в фарфоровых ступках и суспензируют в ИХН. Поверхность мяса, колбасы, сыра стерилизуют, прикладывая раскаленный металлический шпатель, и вырезают пробы из глубины, затем помещают их в фарфоровую ступку, растирают со стерильным стеклянным песком и суспензируют в ИХН.

Бактериологическое исследование. Исследуемый материал сеют в чашки с висмут-сульфитным агаром и в среды накопления (магниевую, селенитовую), из которых через 6—10 ч делают пересев на висмут-сульфитный агар. Посевы инкубируют при 37 °С, на второй день их изучают, отбирают колонии черного цвета и пересевают на полиуглеводную среду (Олькеницкого или подобную) для накопления и первичной идентификации чистой культуры (см. цв. вклейку, рис. 8, з). На 3-й день исследования выделенные чистые культуры для окончательной идентификации сеют в среды «пестрого» ряда и ставят РА с адсорбированными сальмонеллезными сыворотками (поливалентными и групповыми *A, B, C, D, E*). Если получен положительный результат с одной из групп сывороток, проводят РА с адсорбированными *O*-сыворотками, характерными для данной группы, а затем с монорецепторными *H*-сыворотками (неспецифической и специфической фазами) для определения серогруппы и серовара сальмонеллы (по схеме Кауфмана—Уайта).

На 4-й день исследования учитывают изменения сред «пестрого» ряда (см. табл. 2.10). Возбудители сальмонеллеза так же, как сальмонеллы паратифа *B*, не ферментируют лактозу и сахарозу, расщепляют глюкозу, маннит и мальтозу с образованием кислоты и газа, не образуют индола и (за небольшим исключением) выделяют сероводород (см. цв. вклейку, рис. 8, з).

Культуры сальмонелл чаще всего удается выделить из испражнений больных, несколько реже — из рвотных масс и промывных вод желудка, еще реже — из крови, мочи и желчи. Результаты бактериологического исследования различных биосубстратов имеют неодинаковое диагностическое значение. Выделение сальмонелл из крови, костного мозга, спинномозговой жидкости, рвотных масс и промывных вод желудка является бесспорным подтверждением диагноза. Обнаружение сальмонелл в кале, моче, желчи может быть связано с бактерионосительством. Этиологическая роль сальмонелл в возникновении заболевания подтверждается серологическим исследованием и клинико-эпидемиологическими данными.

Биологическое исследование. Возбудители сальмонеллеза в отличие от сальмонелл паратифа *B* патогенны для белых мышей. Этот признак используется для их дифференциации. В первый день исследования наряду с посевом патологического материала и пищевых продуктов производится пероральное заражение белых мышей. Через 1—2 сут мыши погибают от септицемии. При вскры-

тии обнаруживают резко увеличенную селезенку, иногда и печень, а посев крови из сердца и материала из внутренних органов позволяет выделить культуры сальмонелл.

Серологическое исследование. Для серологической диагностики ставят РНГА с сальмонеллезными поливалентными и групповыми (групп *A, B, C, D, E*) диагностикумами. Для выявления нарастания титра специфических антител реакции ставят с сыворотками, взятыми с интервалом 7—10 дней. Диагностическое значение имеет повышение титра антител в четыре и более раз.

2.3.4. Дизентерия

Дизентерия — антропонозное инфекционное заболевание с преимущественным поражением толстой кишки и общей интоксикацией, вызываемое бактериями рода *Shigella*, микроорганизмами 3-й группы патогенности.

Материалом для выделения возбудителей дизентерии служат испражнения больных, реконвалесцентов, носителей, реже — рвотные массы и промывные воды желудка и кишечника. Шигеллы могут быть обнаружены в смывах с рук, посуды, различных предметов (игрушки, дверные ручки и др.), в молоке и других пищевых продуктах. Результаты микробиологического исследования во многом зависят от правильности взятия материала. Пробы кала (в первую очередь слизистые примеси) из судна (горшка) или тампоном (петлей) непосредственно из прямой кишки стараются отбирать до начала этиотропной терапии в посуду без следов дезинфицирующих средств. Если невозможно сразу произвести посев на плотные дифференциальные среды, взятый материал немедленно засевают на среды обогащения, помещают в термостат или хранят в глицериновом консерванте на холоде до отправки в лабораторию. Ввиду морфологического сходства шигелл с другими энтеробактериями световая микроскопия не применяется, основным методом диагностики является бактериологический.

Бактериологическое исследование. Испражнения засевают на среды Плоскирева и Эндо в чашках, а также для накопления на селенитовую среду (в соотношении 1 : 5). Со среды накопления материал высевают через 16—18 ч на те же плотные среды. Посевы помещают в термостат при 37 °С на 18—24 ч.

На второй день изучают характер колоний. Бесцветные лактозоотрицательные колонии для накопления чистой культуры пересевают на полиуглеводную среду (типа Олькеницкого, Клиллера) или скошенный агар. На 3-й день учитывают характер роста на полиуглеводной среде (см. цв. вклейку, рис. 8, в), а также пересевают материал на дифференциальные среды (Гисса и др.) для окончательной биохимической идентификации выделенной культуры и скошенный агар для определения ее антигенной структу-

ры (вида и серовара). На 4-й день учитывают результаты биохимической активности (см. табл. 2.10). Следует отметить, что по культурально-биохимическим характеристикам шигеллы близки к эшерихиям, но неподвижны, не ферментируют лактозу, не образуют газ из глюкозы и не декарбоксилируют лизин. Для серотипирования сначала на стекле ставят РА со смесью сывороток, обладающих в данной местности видами и вариантами шигелл, а затем с монорецепторными видовыми сыворотками. Определяют также чувствительность выделенной культуры к поливалентному дизентерийному бактериофагу и антибиотикам. С эпидемиологической целью у выделенных шигелл определяют фаговар, колициновар.

Для быстрого обнаружения шигелл в исследуемом материале могут быть использованы: прямая и непрямая РИФ, реакция коаггутинации, ИФА, РНГА с антительными эритроцитарными диагностикумами, ПЦР. Обычно такие реакции ставят с экстрактом фекальных масс.

Для оценки инвазивных свойств выделенных культур шигелл ставят кератоконъюнктивальную пробу на морских свинках. Обычно эти микроорганизмы вызывают у животных выраженный кератит.

Поскольку шигеллы являются безусловно-патогенными микроорганизмами, их выделение из патологического материала позволяет подтвердить диагноз дизентерии.

Исследование воды, молока и смывов с различных предметов на присутствие шигелл производят с использованием методов, описанных выше. При исследовании объектов, содержащих незначительное количество шигелл, применяют РИФ и другие методы.

Серологическое исследование. Для серологической диагностики хронических форм дизентерии ставят РНГА с эритроцитарными шигеллезными диагностикумами. Диагностическими титрами считают: к диагностикуму Флекснера у взрослых — 1 : 400, детей до 3 лет — 1 : 100, детей старше 3 лет — 1 : 200. Для остальных диагностикумов — 1 : 200. РНГА проводят повторно с сывороткой, взятой не менее чем через 7 дней; диагностическое значение имеет нарастание титра антител в четыре и более раз. Для дифференциации стертых форм и носительства шигелл определяют иммуноглобулины класса *G* (*IgG*).

При дизентерии иногда ставят РА с шигеллезными корпускулярными диагностикумами. При этом диагностическими считают титры к диагностикуму Флекснера 1 : 400, другим — 1 : 100.

2.3.5. Инфекции, вызываемые энтеропатогенными иерсиниями

К энтеропатогенным иерсиниям относится возбудитель иерсиноза (*Yersinia enterocolitica*) и возбудитель псевдотуберкулеза (*Yersinia pseudotuberculosis*) — бактерии 3-й группы патогенности,

вызывающие схожие по клиническим проявлениям зооантропонозные инфекции с поражением лимфоидного аппарата кишечника, токсико-аллергическими осложнениями и тенденцией к генерализации процесса.

Основными клиническими формами иерсиниоза и псевдотуберкулеза являются энтероколит, острый мезентериальный лимфаденит, часто в сочетании с терминальным илеитом («псевдо-аппендицит»), септицемия. Водянистая диарея более характерна для иерсиниоза, нежели псевдотуберкулеза. Стул с примесью крови может быть у взрослых. У части больных развиваются внекишечные осложнения: артриты, узловатая эритема, увеиты, абсцессы внутренних органов и др. После нелеченного заболевания может иметь место реконвалесцентное носительство.

Ввиду полиморфности клинической картины и ее сходства при двух заболеваниях для подтверждения диагноза необходимы микробиологические исследования.

Микробиологический диагноз основан на обнаружении возбудителей иерсиниоза или псевдотуберкулеза в клиническом материале и выявления антител к ним в сыворотке крови.

Бактериологическое исследование. Материал для выделения возбудителя — фекалии, кишечные биоптаты, лимфоузлы или ткань удаленного аппендикса, кровь, слизь из ротоглотки — отбирают в соответствии с клинической формой и фазой патогенеза заболевания. Для первичного посева материал, контаминированный сопутствующей микрофлорой, подвергают щелочной обработке. С этой целью используют 0,5%-й раствор гидроксида калия в 0,5%-м хлориде натрия, куда помещают бактериологическую петлю с материалом на 1 мин и затем этой же петлей делают посев на плотную среду. В качестве селективных используют агары *CIN*, Серова или среду Эндо, которые после посева инкубируют при 32 °С в течение 24—48 ч или 24 ч при 37 °С и столько же при комнатной температуре. Одновременно материал помещают в среду накопления для «холодового обогащения». Иерсинии в отличие от многих сопутствующих микроорганизмов хорошо растут при низких температурах в «голодных» средах, поэтому материал помещают в забуференный ИХН (рН 7,6) и выдерживают при температуре бытового холодильника (4... 10 °С). Высевы со среды накопления (из верхней части пробирки) делают на 3, 5, 10, 15-е сут на те же плотные среды.

На 2-й (3-й) день изучают первичные посевы. Энтеропатогенные иерсинии образуют мелкие или средние колонии, на среде *CIN* с красным центром и бесцветной периферией («бычий глаз»), на среде Эндо бесцветные или с более интенсивно окрашенным центром, у *Y. enterocolitica* в *S*-форме, у *Y. pseudotuberculosis* часто бывает диссоциация колоний (*S*-, *SR*-, *R*-формы). Колонии иерсиний значительно мельче колоний других энтеробактерий, при-

сутствующих в материале, и поэтому на неселективных средах они легко могут быть «просмотрены». При отсутствии роста типичных колоний делают высевы со сред накопления. Подозрительные колонии (см. цв. вклейку, рис. 19, а) микроскопируют для изучения морфологии и пересевают для накопления чистой культуры на скошенный ПА или одну из полиуглеводных сред (Рассела, Клиглера, Трехсахарный железосодержащий агар и т. п.).

На 3-й (4-й) день проводят предварительную идентификацию чистой культуры и ставят тесты для окончательной идентификации возбудителя, а также определения чувствительности к антибиотикам (см. табл. 2.10). Идентификацию подозрительных культур ведут по биохимическим и антигенным свойствам, учитывая температуру физиологического оптимума иерсиний (28—30 °С). Возбудители иерсиниоза и псевдотуберкулеза, как и другие энтеробактерии, оксидазоотрицательны, ферментируют до кислоты глюкозу, обладают нитратредуктазой. Дифференциальные признаки патогенных видов иерсиний см. в табл. 2.10 и 2.14. В отличие от псевдотуберкулезного микроба микроорганизмы вида *Y. enterocolitica* представляют собой гетерогенную группу (по биохимическим, антигенным, патогенным и другим свойствам). Внутри вида *Y. enterocolitica* различают: 1) безусловно-патогенные варианты (собственно возбудители иерсиниоза); 2) иерсинии, способные вызвать оппортунистическую инфекцию или пищевое отравление; 3) непатогенные для человека иерсинии. Общеизвестным является положение о необходимости определения признаков вирулентности у выделенных культур *Y. enterocolitica*. Для этого чаще всего определяют биовар и/или серогруппу, а также используют тесты *in vitro*: определяют аутоагглютинацию, кальцийзависимость, плазмидассоциированные антигены (например, в РА на стекле с сывороткой СВИ — см. рис. 1.21), пиразинамидазный тест и др. (табл. 2.12).

У выделенной культуры *Y. enterocolitica* таким образом определяют не только вид, но и биовар, а также серогруппу и признаки вирулентности *in vitro* (см. ниже). Серогруппу определяют в РА на стекле с адсорбированными групповыми сыворотками (в первую очередь определяют принадлежность к «патогенным» группам — O3, O9, O5,27). Культуру для типирования необходимо выращивать при температуре ниже 30 °С, поскольку при 37 °С патогенные иерсинии образуют поверхностно расположенные АГ, мешающие O-групповой агглютинации. В ходе типирования обращают внимание на то, что у возбудителя иерсиниоза коррелируют биовар и серогруппа (биоварам 4, 3, 2 обычно соответствуют серогруппы O3, O5,27 и O9).

Для облегчения интерпретации результата культурального исследования выдают ответ с указанием принадлежности выделенных иерсиний к возбудителям иерсиниоза или псевдотуберкулеза.

Биовары *Yersinia enterocolitica*
(реакции после инкубирования при 25 °С в течение 48 ч)

Тест	Результаты тестов у биоваров					
	1А	1В*	2*	3*	4*	5
Липаза (твин)	+	+	-	-	-	-
Эскулин	+	-	-	-	-	-
Салицин	+	-	-	-	-	-
Индол	+	+	(+)	-	-	-
Ксилоза	+	+	+	+	-	<i>d</i>
Трегалоза	+	+	+	+	+	-
NO ₃ → NO ₂	+	+	+	+	+	-
ДНКаза	-	-	-	-	+	+
Пролинпептидаза	<i>d</i>	-	-	-	-	-
β-D-Глюкозидаза	+	-	-	-	-	-
Пиразинамидаза	+	-	-	-	-	-

Примечание. * патогенные для человека биовары; «+» — положительно реагируют более 90 % штаммов; *d* — положительно реагируют от 11 до 89 % штаммов; «-» — положительно реагируют менее 10 % штаммов; «(+)-» — слабо положительная реакция.

Без учета патогенного потенциала невозможно адекватно оценить клинко-эпидемическое значение того или иного штамма иерсиний. Следовательно, признаки (маркеры) патогенности необходимо определять у *Y. enterocolitica*, выделяемых не только из клинического материала, но и при проведении профилактических исследований материала от людей, животных, пищевых продуктов, объектов внешней среды. Более того, надо учитывать, что возбудитель иерсиниоза представлен несколькими вариантами, которые отличаются по патогенному потенциалу и другим характеристикам. В целом положение рассматриваемой группы иерсиний во многом напоминает положение представляемых видов *Escherichia coli* и требует соответствующего подхода в диагностике.

Поскольку иерсинии, не относимые к возбудителям иерсиниоза, чумы или псевдотуберкулеза, могут быть причиной пищевого отравления или более серьезных заболеваний (в том числе септицемии), их этиологическую роль необходимо подтверждать. На нее будут указывать: клинко-эпидемиологические данные, отсутствие других возбудителей, повторность обнаружения таких иерсиний в материале или выделение их из «стерильных» тканей

организма, массивность обсеменения ими материала и ее динамика, признаки иммунного ответа на антигены предполагаемого возбудителя (накопление антител).

Серологическое исследование. Серологический диагноз иерсиниоза ставят на основании обнаружения высоких или нарастающих титров антител в РА или РНГА с корпускулярными антигенами из референс-штаммов возбудителей актуальных серогрупп (чаще всего *O3* и *O9*). Это исследование имеет меньшую ценность ввиду накопления перекрестно-реагирующих антител, латентного периода иммуногенеза, индивидуальных особенностей иммунного ответа. Более информативным может быть выявление антител (*IgG*, *IgA*, *IgM*) к «антигенам вирулентности» иерсиний, например в ИФА или методом иммуноблотинга.

В некоторых лабораториях проводится обнаружение патогенных иерсиний в клиническом материале или пищевых продуктах методами генодиагностики (ДНК-ДНК-гибридизация, ПЦР-анализ).

Определение пиразинамидазной активности. Его проводят при выращивании иерсиний на специальной среде, где непатогенные варианты гидролизуют пиразинамид (амид пиразинкарбоновой кислоты), продукт разложения которого (2-пиразинкарбоновая кислота) после взаимодействия с солями железа окрашивает среду в коричневый цвет. На среду с пиразинамидом, разлитую в виде косячков, частыми штрихами засевают ночные культуры испытуемых и контрольных штаммов, выращенных при 25—30 °С на ПА, и инкубируют при той же температуре в течение 48 ч. Затем в пробирки с выросшими культурами вносят, смачивая скошенную поверхность, раствор сульфата аммонийного железа и оставляют при комнатной температуре на 15 мин. Среды с культурами патогенных иерсиний (независимо от принадлежности к определенному виду или серовару, а также содержания плазмиды вирулентности *pYV*) остаются без изменения цвета; верхние слои сред с культурами непатогенных иерсиний приобретают коричневый оттенок.

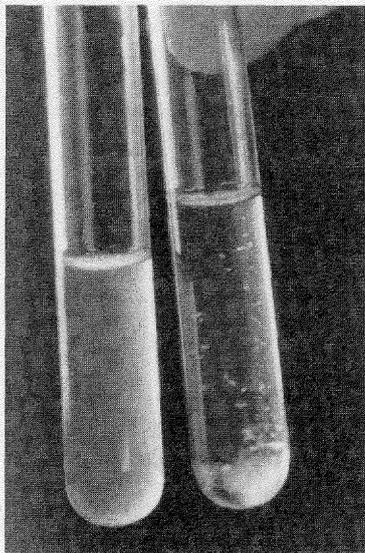


Рис. 2.2. Тест аутоагглютинации энтеропатогенных иерсиний на среде Кларка:

слева — культура *Yersinia enterocolitica* *O3*, выращенная при 26 °С; справа — та же культура, выращенная при 37 °С.

Тест аутоагглютинации. Тест ставят на среде Кларка (используется также для реакции Фогеса—Проскауэра). В две пробирки с 3—5 мл среды Кларка засевают 10^6 — 10^8 клеток агаровой культуры испытуемого штамма и инкуби-

руют в течение 24 ч: одну пробирку при 37 °С, другую — при 26—28 °С. Если культура вирулентна (обладает плазмидой вирулентности *pYV*), то на поверхности клеток, инкубированных при 37 °С (но не 26—28 °С), образуется гидрофобный белок и клетки склеиваются, образуя хлопья на дне и стенках пробирки (положительный результат). При 26—28 °С так же, как у непатогенных иерсиний при двух температурных режимах, среда имеет равномерную мутность и небольшой компактный осадок на дне пробирки (рис. 2.2).

Тест кальцийзависимости. Тест ставят на кальций-дефицитном агаре (в качестве основы для него лучше использовать среду АГВ для диффузионного метода определения чувствительности к антибиотикам). Для связывания ионов кальция на 100 мл расплавленной среды АГВ добавляют 8 мл 0,25М раствора оксалата натрия и после перемешивания вносят 4 мл 0,5М раствора хлорида магния для восполнения двухвалентного иона). Ночную бульонную культуру испытуемого штамма в дозе 100—300 клеток засевают шпателем на 2 чашки с кальций-дефицитным агаром и инкубируют 24—48 ч: одну чашку при 37 °С, другую — при 26—28 °С. Если культура вирулентна (обладает плазмидой вирулентности *pYV*), то в условиях дефицита кальция у клеток, инкубированных при 37 °С (но не 26—28 °С) наступает бактериостаз (прекращение роста и делений). При этом колонии на чашке либо имеют карликовые размеры (*Y. enterocolitica*), либо отсутствуют совсем (чаще у *Y. pseudotuberculosis*). При 26—28 °С так же, как у непатогенных иерсиний при двух температурных режимах, наблюдается рост 100—300 колоний обычных размеров.

2.3.6. Инфекции, вызываемые условно-патогенными энтеробактериями

Условно-патогенные представители семейства *Enterobacteriaceae* могут вызывать разнообразные клинические синдромы, воспалительные процессы различной локализации и сепсис (табл. 2.13).

Представители семейства *Enterobacteriaceae* наиболее часто встречаются при анализе разнообразного клинического материала. Из всех клинически значимых бактерий энтеробактерии составляют около 50 %, из грамотрицательных — примерно 80 %. На долю энтеробактерий приходится около 50 % всех возбудителей септицемий, до 70 % гастроэнтеритов и более 70 % возбудителей инфекций мочевого тракта. Если принимать во внимание иммунодефициты, предрасположенных лиц и распространение внутрибольничных инфекций, можно сказать, что энтеробактерии могут быть выделены из любого материала, доставленного в лабораторию.

Кроме представителей рода *Shigella*, многие энтеробактерии вызывают внекишечные инфекции (мочевые, особенно циститы, респираторные, раневые, кровяные, инфекции ЦНС). Их чаще вызывают представители семи видов: *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis*, *E. aerogenes*, *E. cloacae* и *S. marcescens*. Поскольку такие инфекции нередко угрожают жизни больного, существует необ-

**Клиническое значение условно-патогенных видов семейства
*Enterobacteriaceae***

Вид микроорганизма	Клиническое значение
<i>Citrobacter freundii</i> *	Обнаруживают в моче, мокроте, отделяемом из горла, в крови и раневом отделяемом, кале
<i>Citrobacter koseri</i> *	Обнаруживают в моче, мокроте, отделяемом из горла и носа, ран; могут вызвать (редко) менингит у новорожденных
<i>Edwardsiella tarda</i> *	Опportunистический возбудитель раневой инфекции и диареи
<i>Enterobacter aerogenes</i> *	Возбудитель разнообразных опportunистических инфекций
<i>Enterobacter cloacae</i> *	Частый возбудитель различных опportunистических инфекций
<i>Enterobacter sakazakii</i>	Вызывают менингит, абсцесс мозга, бактериемию у новорожденных
<i>Hafnia alvei</i> *	Обнаруживают в кале, иногда — в крови, мокроте, моче, раневом отделяемом
<i>Klebsiella oxytoca</i> *	Частый возбудитель различных опportunистических инфекций
<i>Klebsiella pneumoniae</i> подвид <i>pneumoniae</i> *	Частый возбудитель различных опportunистических инфекций
<i>K. pneumoniae</i> подвид <i>ozenae</i>	Возбудитель озены (атрофического ринита); выделяют при различных опportunистических инфекциях
<i>K. pneumoniae</i> подвид <i>rhinoscleromatis</i>	Возбудитель риносклеромы (гранулематозного ринита) и других инфекций верхних отделов респираторного тракта
<i>Kluyvera ascorbata</i>	Обнаруживают в мокроте, моче, кале, крови
<i>Morganella morganii</i> подвид <i>morganii</i> *	Вызывает инфекции мочевого тракта; его обнаруживают и в разнообразном клиническом материале из других биотопов
<i>Proteus mirabilis</i> *	Частый возбудитель различных опportunистических инфекций
<i>Proteus vulgaris</i> *	Частый возбудитель различных опportunистических инфекций
<i>Proteus penneri</i>	Могут вызывать инфекции мочевых путей и раневые инфекции
<i>Providencia alcalifaciens</i> *	Обычно выделяют от диарейных больных, особенно детей

Вид микроорганизма	Клиническое значение
<i>Providencia rettgeri</i> *	Чаще выделяют из мочи стационарных больных после катетеризации
<i>Providencia stuartii</i> *	Чаще выделяют из мочи, реже из ран, крови; известны вспышки ВБИ
<i>Serratia marcescens</i> *	Частый возбудитель различных оппортунистических инфекций

Примечание. * отмечены часто встречающиеся виды с доказанным клиническим значением.

ходимость в быстром выделении, идентификации соответствующих возбудителей и определении их чувствительности к антимикробным воздействиям.

В основе диагностики лежит бактериологический метод исследования.

Материалом для исследования могут быть испражнения, рвотные массы, гной, раневое отделяемое, мокрота, желчь, ликвор, кровь, секционный и другой материал (в зависимости от формы инфекции). При озене исследуют отделяемое слизистой оболочки носа, при риносклероме — ткань инфильтратов.

Микроскопия. Это исследование имеет ориентировочное значение ввиду сходства возбудителей с другими, в том числе непатогенными, микроорганизмами. При клебсиеллезах в мазках, окрашенных по Граму, обнаруживают грамотрицательные бактерии, часто расположенные попарно и окруженные общей капсулой. В гистологических препаратах из склероматозных инфильтратов выявляют в большом количестве плазмоциты и гигантские клетки Микулича, заполненные желатинообразным веществом, в котором находятся капсулированные бактерии склеромы.

Бактериологическое исследование. Энтеробактерии являются неприхотливыми микроорганизмами и хорошо растут на универсальных средах. Материал засевают (по возможности количественно) на плотные дифференциальные среды — Эндо, Плоскирева, Левина, МакКонки, К1 (для выделения клебсиелл), П2 (для выделения протеев), висмут-сульфитный агар (для выделения эдвардсиелл и цитробактеров) и др. Инкубируют чашки, как правило, при 37 °С в течение 24—48 ч, после чего изучают выросшие колонии. Известной характеристикой протеев (и, как показано недавно, некоторых сальмонелл) является способность к «роеванию» на многих плотных средах. Слизистые колонии (особенно на средах с углеводами) образуют представители родов *Klebsiella* и *Enterobacter*. Колонии с желтым пигментом характерны для *Enterobacter sakazakii* и *Enterobacter agglomerans*.

После микроскопии мазков, окрашенных по Граму, материал из подозрительных колоний для накопления чистой культуры отсеивают на скошенный МПА или комбинированную полиуглеводную среду (Рассела, Клигера, Трехсахарный железосодержащий агар, Олькеницкого). После получения роста и первичной дифференциации энтеробактерий на полиуглеводной среде (см. цв. вклейку, рис. 8) проводят окончательную идентификацию культуры и определение ее чувствительности к антимикробным препаратам. У микробных культур определяют такие свойства, как способность утилизировать различные углеводы, цитрат, образовывать ацетон или смесь кислот при ферментации глюкозы (тесты Фогеса — Проскауэра и с метиловым красным), уреазную активность, образование индола, сероводорода, декарбоксилирование и дезаминирование аминокислот, подвижность, а при наличии диагностических сывороток — антигенную структуру (см. табл. 2.10). При массовых исследованиях биохимические свойства культур часто изучают микрометодом (см. цв. вклейку, рис. 10).

На принадлежность микроорганизма к семейству *Enterobacteriaceae* указывают следующие морфолого-физиологические признаки:

грамотрицательные палочки с закругленными концами (0,5—2,0×2,0—4,0 мкм), без спор, как правило, беспорядочно расположены;

факультативные анаэробы, не требовательные к составу питательных сред, образуют на 1—2-е сут при 30—37 °С характерные колонии;

оксидазоотрицательны, обладают каталазной активностью и нитратредуктазой;

ферментируют и окисляют глюкозу.

В целом, за редким исключением, к семейству энтеробактерий принадлежат культуры грамотрицательных палочек, обладающие тремя признаками: ферментация глюкозы, наличие нитратредуктазы и отсутствие оксидазной активности.

Многие условно-патогенные энтеробактерии подвижны, являясь перитрихами; неподвижны (при 37 °С) *Klebsiella* spp., *Leminorella* spp., *Moellerella* spp., *Obesumbacterium* spp., *Tatumella* spp. и некоторые виды (биофармы) *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Morganella*, *Salmonella* и *Yersinia*.

Учитывая многочисленность видового состава семейства энтеробактерий, «пестроту» и непостоянство их биохимических характеристик точная фенотипическая идентификация на основе вероятностного подхода возможна только при использовании специальных кодовых указателей (например, указатель *API* фирмы *BioMérieux*, каталог фирмы «Диагностические системы») или автоматизированных систем — зарубежных (*BioBASE*) или отечественных («ЭнтероИД», *IDENT*) компьютерных программ.

Для идентификации клебсиелл по антигенной структуре используют реакции капсульной агглютинации на стекле и *O*-агглютинации. Для проведения реакции капсульной агглютинации на предметное стекло наносят иммунные противокapsульные сыворотки, а также каплю 0,5%-го раствора натрия хлорида. В непосредственной близости от капли сыворотки растирают петлю исследуемой культуры и смешивают их. При положительном результате образуется агглютинат в виде грубых нитей или тяжей. Для реакции *O*-агглютинации исследуемую культуру автоклавируют в течение 2,5 ч. При этом бактерии теряют капсулу и способность взаимодействовать с *K*-сыворотками, но приобретают агглютинабельность *O*-сыворотками. После стерилизации культуру 2 раза отмывают в ИХН с помощью центрифугирования и с осадком проводят РА на стекле. В качестве дополнительных методов идентификации культур клебсиелл используют определение их чувствительности к бактериофагам. Фаги капсульных бактерий обладают строгой видовой специфичностью. Фаготипирование склеромных культур может быть использовано для установления эпидемиологических связей в очагах склеромы.

В РА по *O*-Аг проводят типирование энтеробактеров, цитробактеров, эдвардсиелл, гафний, протеев. Кроме того, у гафний и протеев определяют структуру *H*-Аг. Для идентичности двух штаммов протеев по *H*-Аг можно использовать феномен Динеса: на МПА в чашке засевают бляшками испытуемые культуры, которые через сутки инкубирования при 37 °С дают характерное для протеев роение (культуры считаются идентичными по *H*-Аг, если на границе зон роения не видна «демаркационная» линия).

При интерпретации результатов микробиологического исследования учитывают следующее. Из условно-патогенных энтеробактерий наибольшее значение имеют представители родов *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia* и *Serratia*, нередко являющиеся причиной оппортунистических, внутрибольничных инфекций (см. табл. 2.10). Медицинское значение недавно образованных (или переименованных) таксонов (*Budvicia*, *Buttiauxella*, *Cedecea*, *Edwardsiella*, *Erwinia*, *Hafnia*, *Kluuvera*, *Leclercia*, *Leminorella*, *Moellerella*, *Pantoea*, *Pragia*, *Rahnella*, *Tatumella*, *Trabulsiella*, *Xenorhabdus*, *Yokenella*) остается неясным и будет уточняться по мере улучшения диагностики (в первую очередь за счет корректной идентификации) и накопления клинических данных.

Серологическое исследование. Серодиагностика иногда применяется в качестве дополнительного исследования. Так, для диагностики риносклеромы применяется РСК с сывороткой больных и капсульным антигеном. В качестве антигена используют взвесь суточной культуры *K. rhinoscleromatis*, содержащую 500 млн микроорганизмов в 1 мл, прогретую в течение 1 ч при 60 °С. Для каж-

дой реакции готовят свежий антиген или используют консервированный 0,25%-м фенолом. Более четкие результаты получают при проведении РСК на холоде. Для выявления агглютининов в сыворотке больных риносклеромой используют РА с бескапсульным штаммом. С этой целью можно применять формализированные диагностикумы. Диагностическое значение имеет положительная реакция в разведении 1 : 1600 и выше.

Для РСК можно использовать свежую и высушенную сыворотку больного. Высушенную сыворотку готовят следующим образом: на фильтровальную бумагу наносят 2 капли по 0,5 мл сыворотки и высушивают при комнатной температуре в течение суток. Бумагу с высушенными каплями посылают в конверте в лабораторию. Пятно сыворотки вырезают ножницами, измельчают вместе с бумагой и помещают в 1 мл изотонического раствора натрия хлорида, который затем отсасывают пипеткой для проведения реакции. Результаты РСК со свежей и высушенной сыворотками идентичны.

2.3.7. Холера

Холера — особо опасное инфекционное заболевание, вызываемое *Vibrio cholerae* биовара *cholerae* и *Vibrio cholerae* биовара *eltor* (бактериями 2-й группы патогенности) и протекающее по типу гастроэнтерита с интоксикацией и нарушением водно-электролитного обмена. В отличие от других представителей вида, вызывающих в основном отдельные или групповые кишечные инфекции без эпидемического распространения, возбудители холеры обладают геном холерного энтеротоксина (*vct+*) и, как правило, относятся к серогруппе O1 или O139 (серовары Огава, Инаба, Гикошима).

Бактериологическое исследование является основным методом лабораторной диагностики холеры. Его проводят не только для подтверждения диагноза заболевания, но и для выявления бактерионосителей, для контроля эффективности лечения, контроля за объектами внешней среды.

Взятие и доставка материала. Исследуемым материалом могут быть: испражнения, рвотные массы, желчь (у носителей), трупный материал (отрезки кишечника, желчного пузыря), пищевые продукты, смывы с объектов внешней среды, воды, гидробионты. Кал и рвотные массы от больных холерой берут стерильной ложкой или катетером в объеме 10—20 мл, переносят в стерильный широкогорлый сосуд и плотно закрывают пробкой. При этом надо учитывать высокую чувствительность холерных вибрионов к дезинфицирующим средствам (особенно кислотам). Часть материала (1—2 мл) непосредственно у постели больного для обогащения засевают в 1%-ю щелочную пептонную воду (50 мл). Для преодоления неблагоприятного влияния на вибрионов сопутствующую

шей микрофлоры в среду накопления можно добавлять теллури́т калия (1 : 100 000—1 : 200 000).

При отсутствии у больного выделений в момент взятия материала вырезают загрязненные участки нательного или постельного белья, а также берут содержимое прямой кишки стерильной проволочной петлей или тампоном, введенным на глубину 5—8 см. После извлечения петлю с калом опускают в колбу с питательной средой. Материал от трупа получают следующим образом: намечают три участка в области верхней, средней и нижней части тонкой кишки и участок прямой кишки длиной 10—15 см, затем с каждого конца намеченного участка отжимают содержимое кишки в стороны, накладывают по две лигатуры и между ними перерезают кишку. Желчный пузырь отделяют с частью пени.

Обязательно исследуют воду (два объема по 500 мл) и пищевые продукты (не менее 200 г). Гидробионтов (рыб, лягушек) доставляют в лабораторию в закрытых банках или других сосудах и исследуют содержимое кишечника. Смывы с объектов окружающей среды берут тампонами, смоченными в 1%-й пептонной воде, с площади примерно 0,25 м² и помещают в пробирки или флаконы с той же средой.

При обследовании реконвалесцентов, лиц, контактировавших с больными или носителями, рекомендуется предварительное назначение слабительного и желчегонного средства (25—30 г сульфата магния и др.), чтобы получить жидкий кал из тонкого кишечника и содержимое желчного пузыря.

Материал для исследования собирают, упаковывают и доставляют в лабораторию с соблюдением особых предосторожностей. Посуда не должна содержать следов дезинфицирующих растворов, особенно кислот; ее стерилизуют или кипятят в течение 15 мин.

Банки, пробирки должны быть закрыты водонепроницаемыми пробками. После взятия материала пробки заливают парафином, обвязывают двойной воощенной бумагой и обрабатывают (снаружи!) дезинфицирующим раствором.

На каждую емкость наклеивают этикетки, составляют направление с указанием фамилии и инициалов, возраста больного, его домашнего и служебного адреса, диагноза, дат начала болезни и госпитализации, а также даты и часа взятия материала, фамилии и инициалов лица, направившего анализ. Если немедленная доставка материала невозможна, то пробы засевают в 1%-ю пептонную воду с теллури́том калия и на чашки со щелочным агаром. Банки и пробирки с материалом для исследования помещают, перекладывая их ватой или другим гигроскопичным материалом, в металлическую коробку, которую, в свою очередь, упаковывают в деревянный ящик, пломбируют, надписывают «Верх, осто-

рожно» и на служебном транспорте с сопровождающим пересылают в лабораторию (нативный материал должен быть доставлен в течение 2 ч после взятия).

Бактериологическое исследование. Исследование материала нужно проводить в специальной лаборатории, а при ее отсутствии пробы направляют в любую бактериологическую лабораторию, имеющую изолированное помещение и отдельные вход и выход. Прием других анализов в таком случае прекращают и устанавливают более строгий режим. К работе допускают лиц, прошедших специальную подготовку. Запрещается работать в лаборатории натошак. Исследования проводятся круглосуточно, так как окончательный результат должен быть выдан через 36—48 ч.

Исследование материала от больных, трупов и подозреваемых на вибрионосительство проводится поэтапно (с выдачей предварительных ответов по ходу исследования), причем одновременно с классическим исследованием проводится экспресс-диагностика (индикация возбудителя в материале и на питательных средах). Следует отметить, что по результатам экспресс-анализа отрицательный ответ не выдают. Бактериоскопическое исследование окрашенных мазков и препаратов «висячей капли» из нативного материала не проводится ввиду низкой информативности этих методов.

Первый этап. Исследование нативного материала.

1. Исследуемый материал засевают на щелочные (элективные) плотные питательные среды (агары Монсура, *TCBS*, СЭДХ, щелочной ПА) и жидкие среды обогащения — щелочную 1%-ю пептонную воду или 1%-ю пептонную воду с теллуридом калия (кроме материала от больных).

Для выделения вибриона от носителей или больных стертой формой холеры используются среды, улучшающие рост вибриона и подавляющие сопутствующую флору (преимущественно *E. coli*). При индивидуальных анализах на вибрионосительство материал засевают в 50 мл пептонной воды, при групповых анализах — в 100 мл. Все посевы помещают в термостат при 37 °С.

Щелочная агаровая среда Монсура содержит: триптиказы — 10 г, натрия хлорида — 10 г, натрия таурохолата — 50 г, натрия карбоната — 30 г, желатина — 1 г, агар-агара — 15 г, дистиллированной воды — 1 л.

***TCBS* (тиосульфат-цитрат-бромтимол-сахарозный агар)** выпускается в готовом виде, на 1 л дистиллированной воды берут 69 г сухой среды.

2. На этом этапе исследования материала проводят экспресс-диагностику:

прямую и непрямую РИФ с использованием специфических меченых *O*-холерных сывороток серогрупп *O*1 и *O*139; срок выполнения анализа — 1,5—2 ч, положительный результат обычно отмечается при концентрации клеток холерных вибрионов не менее чем 10^6 в 1 мл;

реакцию иммобилизации вибрионов с теми же сыворотками; срок выполнения анализа — 15—20 мин, положительный результат обычно отмечается при концентрации клеток холерных вибрионов не менее чем 10^5 в 1 мл;

РНГА со специфическими иммуноглобулиновыми эритроцитарными диагностикумами; срок выполнения анализа — 1,5—2 ч, положительный результат обычно отмечается при концентрации клеток холерных вибрионов не менее чем 10^5 в 1 мл.

Для реакции иммобилизации 2 капли материала наносят на предметное стекло, в одну из них вносят каплю сыворотки О1 или О139 в разведении 1 : 100, в другую — каплю ИХН (контроль). После смешивания капли накрывают покровными стеклами и микроскопируют с фазовым контрастом или в затемненном поле зрения при увеличении 400—600×. При положительном результате реакции в контроле отмечается характерная подвижность вибрионов, а в капле с сывороткой в течение 1—2 мин происходит потеря подвижности вибрионов и их склеивание. В сомнительных случаях реакцию повторяют с сывороткой в меньшем разведении (1 : 5).

Второй этап. Через 6—8 ч от начала анализа.

1. Материал из верхней части 1-й среды накопления засевают штрихами на плотные элективные среды.

2. Делают пересев того же материала на 2-ю среду накопления (при отрицательном результате экспресс-диагностики нативного материала).

3. Если на 1-й пептонной воде появляется нежная голубоватого цвета пленка, которая при наклоне пробирки или флакона прилипает к стенке, то из пленки или просто с поверхности среды берут материал для повторной экспресс-диагностики.

Третий этап. Через 12—14 ч от начала анализа.

1. Материал из верхней части 2-й среды накопления засевают штрихами на плотные элективные среды.

2. Изучают и отбирают подозрительные колонии (см. ниже) на плотных средах, засеянных нативным материалом.

Четвертый этап. Через 18—24 ч от начала анализа.

1. Изучают и отбирают подозрительные колонии (см. ниже) на всех плотных средах. Чашки с посевами просматривают в косо-проходящем свете под стереомикроскопом. На щелочном агаре холерный вибрион растет с образованием круглых, гладких, плоских, голубоватых, просвечивающихся в проходящем свете, гомогенных, с ровными краями колоний диаметром 1—2 мм. Консистенция колоний маслянистая, они легко снимаются петлей и эмульгируются. При исследовании материала от выздоравливающих, бактерионосителей, а также лиц, леченных антибиотиками, могут встречаться атипичные колонии. Колонии сопутствующей микрофлоры обычно имеют другую морфологию и дают ро-

зовато-красное свечение. На агаре *TCBS* и СЭДХ холерный вибрион образует ярко-желтые колонии на зеленом фоне среды, на среде Монсура — полупрозрачные бесцветные с темным центром. При отборе колоний ставят оксидазный тест, РА на стекле с холерными сыворотками *O1*, *O139* и *RO*, а также специфическую иммунофлюоресценцию. Колонии холерных вибрионов оксидазоположительны. Положительный результат РА или метода ИФ в сочетании с культурально-морфологическими данными позволяет выдать предварительный ответ об обнаружении холерного вибриона.

2. Подозрительные колонии (независимо от результата РА или иммунофлюоресцентного исследования) пересевают на сектор щелочного ПА и на полиуглеводную среду (Рассела, Клигlera или др.) для выделения чистой культуры и ее идентификации.

Пятый этап. Через 24—36 ч от начала анализа.

1. Изучают и отбирают подозрительные культуры на полиуглеводных средах (дающие характерные изменения сред), микроскопируют окрашенные по Граму мазки из культур, ставят оксидазный тест и РА с холерными сыворотками (*O1*, *RO*, Огава, Инаба и, в случае отрицательного результата, с сывороткой *O139*). На среде Рассела холерный вибрион расщепляет сахарозу и не ферментирует лактозу (покраснение среды в столбике без образования газа). При положительном результате РА с одной из сывороток выдают ответ о выделении соответствующего холерного вибриона.

2. Независимо от результатов РА проводят окончательную идентификацию оксидазоположительных культур по сокращенной или полной схеме. Сокращенная схема включает развернутую реакцию с сыворотками Инаба и Огава, определение ферментативной группы по Хейбергу и пробу с диагностическими холерными фагами (ХДФЗ,4,5). Полная схема дополнительно включает тесты для определения биовара холерного вибриона: гемагглютинацию, гемолиз по Грейгу, реакцию Фогеса—Проскауэра (образование ацетона из глюкозы), чувствительность к полимиксину. Для ускоренной биохимической идентификации вибрионов используется система индикаторных бумажных дисков (СИБ), в состав которой входят тесты на оксидазу, индол, ферментацию лактозы, глюкозы, сахарозы, маннозы, арабинозы, маннита, инозита, аргинина, лизина и орнитина. По этим признакам холерные вибрионы можно дифференцировать с энтеробактериями, а также с другими вибрионами (*Plesiomonas* spp., *Aeromonas* spp. и др.).

3. Ставят пробу на чувствительность выделенных культур к антибиотикам.

Шестой этап. Через 36—48 ч от начала анализа.

1. Проводят окончательную идентификацию выделенных культур, определяют их чувствительность к антибиотикам и выдают окончательный ответ о выделении холерного вибриона соответствующего биовара и серогруппы (серовара) с указанием эпиде-

мического значения по косвенным признакам (гемолитической активности, группе Хейберга и др.).

Токсигенные штаммы холерных вибрионов серогрупп *O1* и *O139*, как правило, не лизируют бараньи эритроциты, относятся к 1-й группе Хейберга (ферментируют маннозу и сахарозу, но не арабинозу), лизируются определенными фагами в комплексном методе с применением ХДФ.

2. Для определения вирулентности в специализированные лаборатории пересылают культуры:

выделенные от людей (независимо от их гемолитической активности) и нетипичные по антигенной структуре и/или фагочувствительности;

выделенные из внешней среды негемолитические, но вирулентные по фаговому тесту или слабовирулентные по комплексному методу;

принадлежащие к серогруппе *O139*.

В специализированных лабораториях вирулентность культур определяют на экспериментальных животных и методами генодиагностики. Для выявления энтеротоксина (холерогена) кроликов-сосунков весом около 150 г после лапаротомии заражают внутрикишечно дозами 10^5 и 10^7 микробных клеток (по двое животных). Через 48 ч исследуют погибших (или забитых) животных, отмечая патологоанатомические признаки интоксикации: расширение кишки, инъекции сосудов, кровоизлияния и т. п. В ходе генодиагностики у культур выявляют нуклеотидные последовательности гена токсина (*vct*). Для этого применяют соответствующие ДНК-зонды (ДНК-ДНК гибридизация на нитроцеллюлозных фильтрах) или ПЦР со специфическими праймерами.

ПЦР дает возможность выявлять гены патогенности не только у метаболически активных клеток холерного вибриона, но и у некультивируемых форм, которые вибрион образует в неблагоприятных условиях существования.

Таким образом, по совокупности полученных данных выделенные культуры относят к возбудителям холеры. Типичные культуры *Vibrio cholerae* — это грамотрицательные аспорогенные изогнутые или прямые полиморфные активно подвижные палочки, обладающие оксидазной активностью, ферментирующие и окисляющие глюкозу (без газообразования), декарбоксилирующие лизин и орнитин, но не ферментирующие аргинин, принадлежащие к 1-й (реже 2-й) группе Хейберга, агглютинирующиеся холерными сыворотками, лизирующиеся диагностическими фагами. Поскольку холерные вибрионы отличаются выраженной фенотипической и генотипической изменчивостью, нередко выделяются (особенно из внешней среды) атипичные штаммы. При выделении атипичных по каким-либо свойствам вибрионов проводят их углубленное изучение. Если выделенная культура не агглютиниру-

ется сыворотками к O1 и O139, ее относят к группе НАГ-вибрионов, а при наличии соответствующих сывороток определяют ее принадлежность к другой серогруппе.

Чувствительность к диагностическим фагам выявляют путем нанесения на чашку с культурой холерных фагов С и Эль-Тор, цельных и в 10-кратных разведениях. Фаг С активен только в отношении классического холерного вибриона, а фаг Эль-Тор — в отношении биовара Эль-Тор. Наличие лизиса в виде одного «стерильного» пятна или группы мелких пятен на месте нанесения фага расценивают как положительный результат.

Чувствительность к полимиксину определяют путем посева выделенной культуры на чашки Петри с питательным агаром, содержащим 50 ЕД полимиксина М или В в 1 мл питательной среды. Вибрионы Эль-Тор не чувствительны к антибиотику и хорошо растут на чашках, в отличие от классических холерных вибрионов.

Реакцию гемагглютинации куриных эритроцитов проводят на предметном стекле. В капле ИХН растирают петлю 18-часовой культуры вибриона и добавляют каплю 2,5%-й взвеси куриных эритроцитов. Холерный вибрион Эль-Тор агглютинирует эритроциты в течение 1—3 мин, а классический биовар не вызывает их склеивания.

Гемолиз бараньих эритроцитов (проба Грейга) наступает через 2 ч после инкубации их при 37 °С с бульонной культурой холерных вибрионов Эль-Тор. Однако этот признак не является стабильным, и некоторые штаммы биовара Эль-Тор не обладают гемолизирующей способностью, как и классический холерный вибрион.

Реакция Фогеса-Проскауэра основана на способности вибрионов Эль-Тор образовывать из глюкозы ацетилметилкарбинол (ацетонин). Его определяют добавлением в культуру, выращенную на глюкозо-фосфатном бульоне Кларка, 5%-го а-нафтола и 40%-го гидроксида калия, после чего при встряхивании пробирок развивается розовое или рубиново-красное окрашивание.

Определение холерных вибрионов в воде. Имеет большое значение для установления факторов передачи инфекции и проведения противоэпидемических мероприятий. Доставленную в лабораторию воду подщелачивают насыщенным раствором бикарбоната натрия до рН 7,8—8,0, добавляют 100 мл основного пептона, рН 8,0 (пептона — 100 г, натрия хлорида — 50 г, калия нитрата — 1 г, натрия гидрокарбоната — 20 г, дистиллированной воды — до 1000 мл) и разливают в колбы или флаконы по 100—200 мл. Посевы помещают в термостат при 37 °С на 5—8 ч, а затем исследуют так же, как и другие посевы в пептонной воде (рвотные массы и кал). Более надежные результаты получают при применении метода фильтрации воды через мембранные фильтры. При этом исследуют большие количества воды (1,5—2,5 л), осадок с фильтров сеют в пептонную воду (рН 8,0) и на щелочной ПА.

Быстрый метод массового исследования на носительство. Во время вспышки холеры проводят массовое обследование на носительство холерного вибриона. Для проведения большого количества анализов в лаборатории одновременно исследуют кал от 10 человек. Фекалии берут проволочными петлями или тампонами и помещают в колбу, содержащую 200 мл пептонной воды с агглютинирующей холерной *O*-сывороткой в рабочем разведении и инкубируют при 37 °С. Через 3—4 ч размножившиеся холерные вибрионы начинают агглютинироваться и хлопьями оседают на дно. В этом случае берут материал у каждого из 10 человек и исследуют его отдельно.

Серологическое исследование. Серодиагностика холеры является дополнительным методом, она основана на определении агглютининов и вибриоцидных антител в сыворотке крови обследуемых (больных, переболевших, вибрионосителей, вакцинированных). У больных рекомендуется применять для этих реакций парные сыворотки, взятые с интервалом 6—8 дней. Нарастание титра агглютининов и вибриоцидных антител обычно идет параллельно. Наиболее чувствительной является реакция определения вибриоцидных антител в отношении стандартных штаммов сероваров Инаба и Огава. Положительный ответ выдают при наличии агглютинирующих антител в титре 1 : 40 и выше, вибриоцидных — 1 : 1000. Диагностическое значение имеет 4-кратное и более нарастание титра антител. Следует отметить, что холерные вибрионы серогруппы *O*139 устойчивы к действию комплемента, поэтому вибриоцидные антитела к ним в обычной реакции не обнаруживаются. Для обследования привитых холерогенанатоксином, а также больных и носителей (особенно инфицированных вибрионами *O*139) применяют РНГА с эритроцитарным холерным энтеротоксическим диагностикумом. Антитоксины появляются на 5—6-й день болезни. Диагностический титр в такой реакции — 1 : 160.

2.3.8. Чума

Возбудителем чумы — острой особо опасной зоонозной трансмиссивной инфекции — является *Yersinia pestis*, бактерии 1-й группы патогенности. Микробиологическое исследование проводят для подтверждения диагноза заболевания, оценки эффективности лечения, контроля инфицированности животных и переносчиков возбудителя в природных очагах чумы, а также для выявления инфицированности чумными микробами объектов внешней среды.

Материал от больного стараются взять до начала антибиотикотерапии. В зависимости от клинической формы чумы для исследования берут: пунктат из бубона (бубонная форма), отделяемое язвы (кожная форма), мокроту, мазок из зева (легочная форма), кровь (септическая форма). Исследуют секционный материал — кровь,

лимфатические узлы, кусочки селезенки, печени, легкого. Исследованию подлежат также трупы грызунов, блохи, вода, пищевые продукты, воздух, смывы с поверхностей и др. Взятие и доставка материала, как и работа с ним, производятся с соблюдением особых правил предосторожности (в противочумном костюме, с применением специальных средств и устройств, предотвращающих контакт с кожей, слизистыми оболочками, а также вдыхание образующихся аэрозолей).

Материал помещают в банки, которые герметично укупушивают, обрабатывают снаружи 5%-м раствором лизола, этикетировать с указанием характера материала, даты и места взятия материала, фамилии и инициалов больного и диагноза. Банки плотно укладывают в герметичную тару, на крышке которой указывают «Верх», и составляют опись направляемых на исследование материалов. Материалы на специальном транспорте с сопровождающим немедленно доставляют в лабораторию. Лица, контактировавшие с материалом, подозрительным на содержание возбудителя чумы, проходят полную санитарную обработку. Перед началом исследования доставленная тара с материалом и другие потенциально зараженные предметы подлежат обработке дезинфицирующим раствором.

С диагностической целью проводится бактериоскопическое, бактериологическое, биологическое и серологическое исследования.

Микроскопия. Из взятого материала готовят несколько мазков и фиксируют их в смеси Никифорова. Мазки окрашивают по Граму и параллельно — метиленовым синим по Леффлеру (см. цв. вклейку, рис. 1). С целью экспресс-диагностики мазки обрабатывают также меченой люминесцентной антисывороткой к *Y. pestis* (прямая РИФ).

В случае обнаружения при бактериоскопии грамотрицательных овоидной формы бактерий, окруженных нежной капсулой и окрашенных биполярно по Леффлеру, дающих специфическое свечение, выдают предварительный ответ по результатам экспресс-диагностики.

Для индикации антигенов возбудителя применяют РНГА с иммуноглобулиновым чумным диагностикумом, ИФА, а также ПЦР с праймерами, специфичными плазмидным генам вирулентности (например, детерминантам капсульного антигена F1 и фибринолизина).

По результатам ускоренной и экспресс-диагностики предварительный ответ можно дать через 4 ч от начала исследования, окончательный — через 18—20 ч.

Бактериологическое исследование. Исследуемый материал засевают в соответствующие питательные среды: кровь в объеме 5—10 мл — в 100 мл МПБ (во флаконах); содержимое бубона, отделяемое язвы, мокроту и другой материал — в чашки с МПА (рН 7,2—7,3). Для стимуляции роста чумных бактерий к МПА прибав-

ляют 0,1 % цельной или 1—2 % гемолизированной крови кролика или лошади. Для инактивации чумного фага на поверхность среды наносят и равномерно распределяют 0,1 мл антифаговой сыворотки. Чтобы подавить рост посторонней микрофлоры в исследуемом материале, к 100 мл МПА добавляют 1 мл 0,1%-го раствора генцианового фиолетового и 2,5 % сульфита натрия. С этой целью применяют также селективную среду с антибиотиками — агар *CIN*. Посевы инкубируют при 25—28 °С. Через 16—20 ч на чашках под малым увеличением обнаруживают колонии, напоминающие скопление осколков битого стекла, которые к 48 ч приобретают вид R-формы с компактным приподнятым центром и ажурной полупрозрачной периферией («кружевные платочки»). Колонии иерсиний на плотных средах обычно имеют значительно меньший размер, чем у других энтеробактерий (особенно после инкубирования при 37 °С). В бульоне через 24 ч образуется рыхлая пленка, от которой спускаются нити в виде «сталактитов».

Чистую культуру чумных бактерий выделяют обычным способом и затем идентифицируют по морфологическим, культуральным, ферментативным, антигенным свойствам и фаголизательности, а также определяют ее чувствительность к антибиотикам.

Возбудители чумы, как и другие энтеробактерии, восстанавливают нитраты в нитриты, ферментируют с образованием кислоты (без газа) глюкозу, ксилозу, маннит, но в отличие от многих других представителей семейства имеют более низкий температурный оптимум роста и физиологической активности — 28 °С. В ходе идентификации возбудитель чумы необходимо дифференцировать с другими иерсиниями, особенно возбудителем псевдотуберкулеза (табл. 2.14). Идентификацию проводят также в РА с использованием диагностических сывороток против капсульного

Таблица 2.14

Биохимическая дифференциация возбудителей чумы, иерсиниоза и псевдотуберкулеза

Вид микроорганизмов	Реакции через 48 ч инкубирования при 25 °С							
	Подвижность	Мочевина	Ацетонин	Индол	Цитрат	Сахароза	Рамноза	Орнитин
<i>Yersinia pestis</i>	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	+	+	–	–	–	–	+	–
<i>Yersinia enterocolitica</i>	+	+	+	V	–	+	+	+

Примечание. «–» — отрицательная реакция; «+» — положительная реакция; «V» — варибельная реакция.

и/или соматического антигенов. Сыворотки против капсульных антигенов отличаются большей специфичностью, так как сыворотки, содержащие антитела к О-АГ (соматическому), дают групповую реакцию с возбудителем псевдотуберкулеза.

Исследование выделенной культуры бактерий чумы на фаголизабельность производят на МПА обычным методом (см. подразд. 1.2.4). Чумной и псевдотуберкулезный фаг разводят до рабочего титра и испытывают различные разведения.

Биологическое исследование. Биологическую пробу ставят одновременно с проведением бактериоскопического и бактериологического исследования. Морских свинок или мышей заражают различными способами — подкожно, внутрибрюшинно или накожно (материал, обильно загрязненный посторонней микрофлорой). Заражение материалом от трупов осуществляется следующим образом: у животного выбривают участок кожи и скарифицируют его, наносят на кожу 2—3 капли исследуемой жидкости и втирают ее досуха плоской частью скальпеля. Кровь большого и взвесь выделенной чистой культуры вводят внутрибрюшинно; мокрому, пунктат бубона — подкожно во внутреннюю поверхность бедра.

На подопытных животных не должно быть эктопаразитов. Зараженных морских свинок содержат в высоких стеклянных банках, завязанных двумя слоями марли, смоченной раствором лизола. Мышей также помещают в банки, которые ставят в металлические сетки с железными крышками.

Животные, зараженные накожно, погибают на 5—7-е сутки, другими способами — через 2—3 дня (от прогрессирующего септического процесса). Для сокращения сроков исследования животным для подавления их антиинфекционной защиты вводят глюкокортикоиды. Одно из зараженных животных убивают на 2—3-и сутки. Из крови и внутренних органов трупа выделяют культуру, которую идентифицируют описанным выше способом.

О чумной инфекции свидетельствуют следующие патологоанатомические изменения: множественные кровоизлияния на слизистой и серозной оболочках, воспаление лимфатических узлов, наличие некротических очагов в селезенке, реже — в печени. В брюшной полости наблюдается вязкий экссудат и изменение паренхиматозных органов. В мазках из внутренних органов, крови, экссудата обнаруживают большое количество грамотрицательных, bipolarно окрашенных бактерий.

При исследовании разложившихся трупов грызунов применяют реакцию преципитации, так как выделить чистую культуру бактерий в этом случае трудно.

Перед вскрытием трупы грызунов из очага инфекции опускают на несколько минут в керосин для дезинсекции, затем их вскрывают, изучают патологоанатомические изменения, готовят мазки-отпечатки из внутренних органов и делают посевы для выде-

ления чистой культуры. Обязательно ставят биологическую пробу. При вскрытии большого количества грызунов применяют групповую пробу: морской свинке вводят взвесь из лимфатических узлов или селезенки 15—20 исследуемых трупов. После исследования все трупы животных погружают в 5%-й лизол, а затем сжигают.

Серологическое исследование. Серодиагностика проводится с целью ретроспективной диагностики, а также при эпизоотических обследованиях в природных очагах чумы.

Проводят РНГА с эритроцитами, на которых адсорбирован капсульный антиген возбудителя чумы. Ставят также реакцию нейтрализации антигена (РНАг), ИФА и непрямую модификацию РИФ. При исследовании сывороток больных или павших грызунов в РНГА результат считается положительным при титре 1 : 40 и выше.

2.3.9. Инфекция, вызываемая *Haemophilus influenzae*

Haemophilus influenzae, встречаясь довольно часто на слизистых оболочках верхних дыхательных путей человека, может вызывать менингит, острое воспаление верхних дыхательных путей, бронхит, пневмонию, эмпиему, конъюнктивит, отит и другие оппортунистические заболевания. Среди здоровых людей уровень носительства гемофильных палочек достигает 90 %. Для детей от полугода до 3 лет после контакта с первичным больным очень высока вероятность развития системных форм заболевания, вызванных *H. influenzae* серовара *b*. Этот же серовар является наиболее частой причиной острого эпиглоттита (воспаления надгортанника) — тяжелого, потенциально смертельного заболевания, особенно у детей. *H. influenzae* биовара *aegyptius* (*H. influenzae aegyptius*) является возбудителем конъюнктивита и бразильской пурпурной лихорадки у детей. В основе диагностики указанных заболеваний — выделение и типирование возбудителя.

Бактериологическое исследование. Исследуемый материал — мокроту, кровь, спинномозговую жидкость, серозную жидкость — засевают на питательные среды не позднее чем через 2—3 ч после взятия. В качестве среды используют питательный агар с 6—10 % нативной крови или шоколадный агар с прогретой или кипяченой кровью; на простых питательных средах гемофильные бактерии не растут. Если нет возможности немедленно посеять материал на плотные среды, используют транспортную полужидкую среду с активированным углем и ниацином.

Серозную и спинномозговую жидкости центрифугируют, и осадок засевают бактериальной петлей на плотные среды с кровью. Для обогащения применяют жидкую питательную среду Файлдса (из расчета 1 мл исследуемой жидкости на 5—10 мл среды). Параллельно с другими посевами делают посев на простой питательный агар (на отсутствие роста).

Шоколадный агар. Питательный агар нагревают до 60 °С, асептически добавляют 5 % цельной или дефибринированной крови человека, лошади, кролика, перемешивают и на 2—3 мин ставят в водяную баню при 80 °С. После этого вторично добавляют 5 % крови и повторно инкубируют. Хранят среду не более двух недель.

Среда Файлдса. 150 мл 0,85%-го раствора хлорида натрия, 6 мл химически чистой соляной кислоты (относительная плотность 1,13), 50 мл дефибринированной крови лошади или барана и 1 г пепсина смешивают до растворения и оставляют при 55 °С на 24 ч, время от времени взбалтывая (5—6 раз). Жидкость загустевает, напоминая по консистенции полужидкий агар. По окончании переваривания прибавляют 12 мл 20 % раствора гидроксида натрия, и перевар снова становится жидким. Доводят рН среды до 7,6, а затем по каплям добавляют концентрированную соляную кислоту до тех пор, пока рН не станет 7,2—7,0. После этого в среду добавляют 0,5 % хлороформа, оставляют на 2—3 дня, периодически взбалтывая, затем разливают в ампулы и запаивают. Для приготовления питательной среды к стерильному бульону или расплавленному питательному агару асептически прибавляют 5 % пептического перевара Файлдса.

При септицемии 5—10 мл крови больного высевают в 50—100 мл питательной среды и через сутки культивирования пересевают на плотные среды с кровью.

При выполнении прямого (ускоренного) метода материал, предположительно содержащий *H. influenzae*, наносят на поверхность питательной среды для получения сливного роста. Полоски бумаги, пропитанные X и V факторами, накладывают на поверхность агара. Рост бактерий между полосок, а не в других участках среды подтверждает предположение об их принадлежности к виду *H. influenzae*.

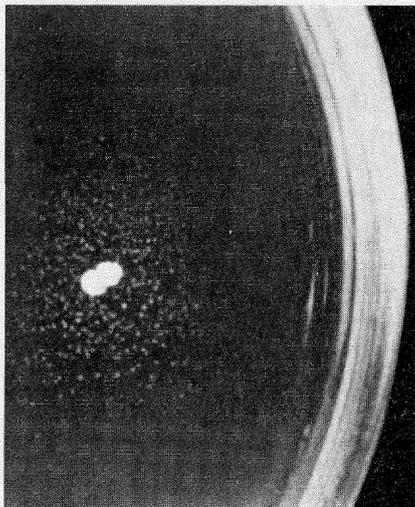


Рис. 2.3. Тест сателлитного роста на агаре с автоклавированной кровью: вокруг крупных колоний стафилококка виден рост многочисленных мелких колоний *Haemophilus influenzae*, утилизирующих НАД (фактор V), выделяемый стафилококками

Для идентификации гемофильной палочки часто применяют тест сателлитных колоний. На кровяной агар наносят исследуемые пробы, а в некоторые участки среды засевают стандартный штамм *Staphylococcus aureus*. Растущий стафилококк гемолизует кровь и высвобождает X и V факторы. Рост *H. influenzae* можно наблюдать в виде мелких сателлитных колоний, окружающих колонии *S. aureus* (рис. 2.3).

Через 24 ч на плотных средах с кровью появляются мелкие прозрачные колонии, на шоколадном агаре колонии более крупные, полупрозрачные. Культуры *H. influenzae*, образующие индол при росте на питательных средах, имеют своеобразный «мышинный» запах. Из колоний готовят мазки и окрашивают их по Граму; при обнаружении мелких грамотрицательных палочек выдают первый предварительный результат. *H. influenzae* может быть в капсульной и некапсулированной формах, поэтому для выявления капсул дополнительно можно использовать метод окраски по Бурри — Гинсу. Остаток подозрительно колонии пересевают на сектор шоколадного агара в чашке или скошенную среду.

При идентификации гемофильных бактерий изучают их биохимические свойства — каталазную, оксидазную активность, ферментацию углеводов, гемолитическую активность и питательные потребности (табл. 2.15).

Таблица 2.15

Дифференциальные свойства представителей рода *Haemophilus*

Вид микроорганизмов	Признаки									
	Гемолиз	Каталаза	Оксидаза	Порфириновый тест	Потребность в факторах	Образование кислоты из				
						глюкозы	фруктозы	сахарозы	лактозы	маннозы
<i>H. influenzae</i>	-	+	+	-	X, V	+	-	-	-	-
<i>H. parainfluenzae</i>	-	+	+	+	V	+	+	+	-	+
<i>H. haemolyticus</i>	+	+	+	-	X, V	+	+	-	-	-
<i>H. parahaemolyticus</i>	+	+	+	+	V	+	+	+	-	-
<i>H. aphrophilus</i>	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+
<i>H. segnis</i>	-	+	-	+	V	+	+	+	-	-
<i>H. ducreyi</i>	-	-	+	-	X	-	-	-	-	-
<i>H. paraprophilus</i>	-	-	+	+	V	+	+	+	+	+

Примечание. «-» — отрицательная реакция; «+» — положительная реакция; X, V — факторы.

Окончательную идентификацию выделенных культур проводят в РА на стекле с типоспецифическими поли- и моносыворотками к капсульному антигену, по которому все штаммы разделены на 6 групп (*a, b, c, d, e, f*).

Определение каталазы. На предметное стекло наносят каплю 10%-й (из-за низкой каталазной активности гемофилов) перекиси водорода, вносят культуру и растирают круговыми движениями. При положительной реакции возникает пенообразование.

Определение оксидазы. На крышку чашки Петри кладут фильтровальную бумагу (5—7 см в диаметре), наносят 2—3 капли 1%-го раствора тетраметилпарафенилендиамина, а затем петлей вносят культуру. При положительной реакции на месте нанесения культуры через 10—15 с появляется фиолетовое окрашивание.

Определение уреазы. Раствор *A*: 2 мл 95%-го этилового спирта, 4 мл дистиллированной воды, 2 г мочевины. Раствор *B*: 0,1 г дигидрофосфата калия, 0,1 г гидрофосфата калия, 0,5 г хлорида натрия, 1 мл 0,2%-го раствора фенолового красного, 100 мл дистиллированной воды. Растворы стерилизуют 30 мин при 1,5 атм. Затем к 1 части раствора *A* добавляют 19 частей раствора *B*, асептически разливают в пробирки по 0,1 мл и вносят в каждую пробирку испытуемую культуру в количестве нескольких петель. Посевы помещают в термостат на 30 мин. При наличии фермента уреазы среда приобретает ярко-малиновое окрашивание. При отрицательной реакции цвет не меняется; за посевами наблюдают в течение 24 ч.

Порфириновый тест. Тест ставят для выявления способности *H. influenzae* к синтезу Δ-аминолевуленовой кислоты (АЛК), т.е. потребности в факторе *X*. При внесении АЛК в среду *X*-независимые гемофилы синтезируют и секретируют порфобилиноген и порфирины, являющиеся промежуточными соединениями биосинтеза гема. Виды, нуждающиеся в факторе *X*, не способны к их образованию. При изучении потребности в факторе *X* исследуемые бактерии засевают на плотную среду и наносят на поверхность коммерческие диски, пропитанные АЛК (аналогично методу дисков с антибиотиками). После 24-часовой инкубации при 37 °С посев облучают УФ-лучами. Если выросшие микроорганизмы *X*-независимы, то наблюдают кирпично-красную флюоресценцию.

2.4. Не образующие спор грамположительные палочки правильной формы

2.4.1. Листерия

Листерия — инфекционная болезнь зоонозной природы, характеризующаяся полиморфизмом клинических проявлений. Возбудитель — *Listeria monocytogenes* — относят к условно-патогенным микроорганизмам, вызывающим оппортунистическую инфекцию у восприимчивых лиц.

Материалом для исследования от больных людей служат: отделяемое из пораженных участков зева, конъюнктивы, кровь, меконий, спинномозговая жидкость, плацента, околоплодные воды, синовиальная жидкость. От трупов на исследование берут головной мозг, кусочки печени, селезенки и других органов (в зависимости от локализации патологического процесса). Кроме того, исследованию должны быть подвергнуты пищевые продукты (сыры и другие молочные продукты, мясные продукты и др.), трупы павших диких или домашних животных. Отобранный клинический материал сразу засевают на питательные среды или хранят при 4 °С не более 48 ч.

Микроскопия. Из-за отсутствия характерных морфологических особенностей у возбудителей листериоза бактериоскопическая диагностика имеет второстепенное значение. Например, при листериозном менингите окраска мазков из ликвора позволяет обнаружить возбудитель не более чем в 40 % случаев. Микроскопию применяют для изучения органов павших животных, а также новорожденных, погибших от листериоза. Готовят мазки-отпечатки, фиксируют их в смеси Никифорова и окрашивают по Романовскому—Гимзе или по Граму. Листерии имеют вид грамположительных коротких, умеренно толстых палочек, иногда нитей, располагающихся отдельно или группами, нередко напоминая кокки или дифтероиды.

Бактериологическое исследование. Выделение чистой культуры и ее идентификация необходимы для подтверждения диагноза листериоза. Листерии растут на простых питательных средах, но более интенсивный рост отмечается на кровяном агаре или средах, обогащенных глюкозой, глицерином, дрожжевым экстрактом, сывороткой, печеночной тканью. Материал засевают на плотные среды. Для подавления роста сопутствующих микроорганизмов используют специально разработанные селективные среды с антибиотиками и/или красителями, хлоридом лития, фенилэтанолом (агары Оксфордский, *PALCAM* или др.). Те же добавки используют в составе бульонных сред для обогащения исследуемого материала (накопление листерий ведут при 30 °С в течение 24—48 ч). Иногда используется также метод «холодового» обогащения (материал выдерживают при 4 °С в течение 10—50 сут). Посевы на плотных средах инкубируют при 37 °С до 7 сут.

Колонии листерий просматривают под микроскопом при комом освещении: суточные колонии имеют сине-зеленую окраску и отличаются от колоний других бактерий. При визуальном просмотре на плотных средах растут в S- и R-формах, на Оксфордском агаре колонии черные, окруженные черным ореолом; на среде *PALCAM* — колонии диаметром около 2 мм серо-зеленые с черным вогнутым центром и черным ореолом на красном фоне среды. Почернение на указанных средах связано с тем, что листе-

рии гидролизуют в них эскулин до эскулетина, который вступает в реакцию с солью железа, что ведет к образованию буро-черного осадка. На кровяном агаре с бараньей кровью возбудитель листериоза образует узкую зону полного (β -) гемолиза. Подозрительные колонии отсеивают на скошенный ПА для накопления и дальнейшей идентификации.

Выделенную чистую культуру листерий идентифицируют по морфологическим, тинкториальным признакам, подвижности, биохимическим свойствам, антигенной структуре и чувствительности к диагностическим листериозным фагам.

Для выявления подвижности чистые культуры листерий засевают уколом в полужидкий МПА (0,3 % агар-агара). Культуры, выращенные при комнатной температуре, слабо подвижны, при 37 °С — неподвижны.

Для идентификации возбудителя листериоза у культур проверяют способность ферментировать углеводы, каталазную активность, ставят *SAMP*-тест со стандартными культурами стафилококка и родококка (табл. 2.16). Наибольшее значение для видовой идентификации возбудителя имеет гемолитическая реакция (см. цв. вклейку, рис. 20).

Для проведения РА к исследуемой культуре добавляют анти-сыворотки 1-го и 4-го сероваров (наиболее часто встречающиеся

Таблица 2.16

Дифференциальные признаки *Listeria monocytogenes* и некоторых других листерий

Вид микроорганизмов	Признаки											
	Ферментация			Гемолиз	<i>SAMP</i> -тест		Каталаза	Гидролиз		Подвижность	Ацетон	Мет. красный
	маннита	ксилозы	рамнозы		<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>		эскулина	гиппурата			
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	+	+	+	V	+	+	+	+	+	+
<i>Listeria ivanovii</i>	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Listeria seeligeri</i>	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>Listeria innocua</i>	-	-	V	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Listeria welshimeri</i>	-	+	V	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Listeria grayi</i>	+	-	V	-	-	-	+	+	+	+	+	+

Примечание. «-» — отрицательная реакция; «+» — положительная реакция; «V» — переменная реакция.

в клинике). Серотипирование, как и лизис листериозными фагами, не всегда позволяет надежно идентифицировать возбудитель, однако помогает в эпидемиологических исследованиях. В референтных лабораториях проводят также молекулярное типирование листерий (пульс-электрофорез, ПЦР).

Биологическое исследование. Вирулентность культур определяют путем подкожного заражения иммуносупрессированных (после введения кортизона) мышей. Животные погибают обычно на 2—6-е сут. При вскрытии делают мазки-отпечатки и посевы из органов животных и обнаруживают в них возбудитель.

Серологическая диагностика. Антитела у больных листериозом обнаруживают со второй недели заболевания. С сывороткой крови и стандартным антигеном ставят РСК (диагностический титр 1 : 5 и выше). Применяют также РНГА (для выявления хронического листериоза).

ПЦР. В последние годы разработаны тест-системы для определения вирулентных *L. monocytogenes* в клинических образцах (биологических жидкостях, включая ликвор), молоке и других пищевых продуктах. В качестве праймеров при этом часто используются уникальные для *L. monocytogenes* последовательности гена листериолизина *O*, других генов патогенности. Чувствительность метода достигает 5—50 клеток в пробе. Для количественного определения *L. monocytogenes* в продуктах питания разработаны также варианты ПЦР с колориметрическим определением ампликонов (ПЦР-ИФА).

2.4.2. Эризипелоид

Эризипелоид — зоонозная инфекционная болезнь, передаваемая от диких и сельскохозяйственных животных контактным путем (чаще всего при травмах лицам определенных профессий) и характеризующаяся эксцентрически растущей кожной эритемой. Возбудитель — *Erysipelothrix rhusiopathiae* — относят к условно-патогенным микроорганизмам, вызывающим оппортунистическую инфекцию. У восприимчивых лиц, помимо местных проявлений, часто наблюдается лимфаденит и поражение суставов, а в некоторых случаях — генерализованная инфекция с септическими метастазами в различных органах, пневмонии и менингиты.

Диагностика во многом базируется на клинико-эпидемиологических данных. Лабораторное исследование проводят чаще с целью дифференциации эризипелоида с рожистым воспалением. Материалом для исследования от больных людей служат кусочки из пораженных участков кожи, взятые при биопсии, по показаниям — пунктаты лимфоузлов, кровь, спинномозговая жидкость, мокрота, гной абсцессов, синовиальная жидкость. От трупов на исследование берут лимфоузлы, кусочки печени, селезенки и

других органов (в зависимости от локализации патологического процесса). При получении биоптата кожу нельзя обрабатывать антисептиками или дезинфектантами. Для исследования получают биоптат глубоких слоев кожи, что соответствует основной локализации возбудителя. Смыв с пораженной кожи не исследуют.

Микроскопия материала имеет невысокую диагностическую ценность, однако обнаружение в окрашенных препаратах длинных правильной формы грамположительных палочек при соответствующих клинико-эпидемиологических данных позволяет заподозрить эризипелоид.

Бактериологическое исследование. Биопсийный и другой материал засевают на кровяной агар или основные среды, которые инкубируют при 37 °С в аэробных условиях или в атмосфере с 10 % углекислого газа. В течение 1—3 дней на плотных средах появляются мелкие колонии (диаметром 0,1—0,5 мм). На кровяном агаре они более крупные и диссоциируют на S- и R-форму; типичный гемолиз отсутствует.

В ходе идентификации выделенных чистых культур отмечают характерные для эризипелотриксоза признаки: на трехсахарном железосодержащем агаре они образуют сероводород (почернение среды), неподвижны (как при 37 °С, так и при других температурных режимах), не обладают каталазой, разжижают желатин послойно, что придает росту вид ершика для мытья посуды (расслоение желатина идет перпендикулярно ходу укола).

Биологическое исследование. Биопсийным или другим материалом заражают белых мышей, которым предварительно для подавления иммунитета вводят кортизон. После гибели животных (на 4—5-е сут) возбудитель может быть обнаружен при посевах и микроскопии материала от павших животных.

Для быстрого обнаружения возбудителя в материале предложена ПЦР со специфическими праймерами.

Серологическое исследование на антитела к возбудителю эризипелоида не проводится ввиду того, что иммуногенез при этом заболевании отличается низкой интенсивностью и непостоянством.

2.5. Грамотрицательные анаэробные прямые, изогнутые и спиральные бактерии

2.5.1. Неклостридиальная анаэробная инфекция, вызванная бактериями группы *Bacteroides fragilis*

Возбудителями неклостридиальной анаэробной инфекции — оппортунистических гнойно-воспалительных заболеваний различной локализации и тяжести, как правило посттравматических, — являются представители нормальной микрофлоры тела человека:

бактероиды (бактерии группы *Bacteroides fragilis*), превотеллы (*Prevotella melaninogenicus*), порфиромонады (*Porphyromonas asaccharolytica*), фузобактерии (*Fusobacterium nucleatum*), пептококки (*Peptococcus asaccharolyticus*, *Peptococcus niger*) и пептострептококки (*Peptostreptococcus anaerobius*), реже другие виды. Классификация анаэробных бактерий в настоящее время претерпевает существенные изменения в связи имеющимися данными об их генетическом родстве. Идентификация вида затруднена ввиду многочисленности представителей и вариабельности их фенотипических признаков, а также трудоемкости и высокой стоимости исследований. Кроме того, определение вида имеет меньшее клиническое значение по сравнению с данными о чувствительности выделенной культуры к лекарственным препаратам.

В целом анаэробные бактерии обнаруживают более чем в половине образцов клинического материала, получаемых при гнойно-воспалительных заболеваниях. Бактерии группы *B. fragilis* (точнее, желчеустойчивые бактерии группы *B. fragilis*) наиболее часто обнаруживаются в патологическом материале и обладают наибольшей антибиотикоустойчивостью по сравнению с другими анаэробами. В соответствии с их основным местом обитания бактериоды чаще всего вызывают (в составе микробной ассоциации или самостоятельно) гнойно-воспалительные заболевания брюшной полости, гинекологические инфекции и поражения органов дыхания.

Материалом для исследования служит отделяемое из глубины раны, гной абсцессов, кусочки пораженных тканей, кровь. Важными условиями при взятии материала являются: исключение контаминации образца нормальной микрофлорой слизистых оболочек (где могут находиться анаэробы), а также контакта исследуемого материала с атмосферным кислородом (способствует гибели анаэробов). Исследование мокроты, смывов с поверхности пораженных тканей, мочи, материала на открытых тампонах и т. п. не проводят. Материал лучше отбирать из глубины тканей шприцем и немедленно доставлять в лабораторию для исследования в шприце, специальном контейнере с бескислородной газовой смесью или погруженным в специальную полужидкую транспортную среду (например, тиогликолевую).

Микроскопия. Из патологического материала готовят мазки и окрашивают их по Граму. Бактероиды представляют собой грам-отрицательные бледные полиморфные палочки, нередко имеющие биполярную окраску.

Бактериологическое исследование. Материал засевают на специальные плотные среды непосредственно или из транспортной, накопительной среды. Для выделения чистых культур используют анаэробный кровяной агар, обогащенные среды с настоем мозга и факторами роста и/или селективные среды (анаэробный кровяной агар с желчью и канамицином). Посевы инкубируют при 37 °C

в бескислородной атмосфере, например в смеси азота, водорода и углекислого газа при соотношении 8:1:1. Через 48—72 ч на анаэробном кровяном агаре бактериоды образуют небольшие серовато-белые выпуклые округлые колонии с ровным краем.

Выделенные культуры предварительно идентифицируют по морфологическим признакам (мазок, окрашенный по Граму), результатам теста на аэротолерантность (не дают роста на средах в присутствии атмосферного кислорода), культуральным свойствам, устойчивости/чувствительности к желчи и определенным антибиотикам, наличию/отсутствию пигмента и свечения при УФО (флюоресценции), некоторым биохимическим свойствам (табл. 2.17).

Таблица 2.17

Дифференциальные признаки *Bacteroides fragilis* и некоторых других грамотрицательных анаэробов

Вид микроорганизмов	Признак														
	Устойчивость к антибиотикам			Рост в присутствии 20 % желчи	Черный пигмент	Индол	Каталаза	Гидролиз эскулина	Липаза	Образование кислоты при ферментации					
	канамицину (1 мг)	ванкомицину (5 мкг)	колистину (10 мкг)							арабинозы	целлобиозы	рамнозы	салицина	сахарозы	трегалозы
<i>Bacteroides fragilis</i>	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-
Другие бактериоды	+	+	V	-	-	V	V	+	-	V	+	+	V	+ ¹	V
<i>Prevotella</i> spp.	+	+	V	-	+/-	V	-	+	V	V	- ²	-	V	V	- ³
<i>Porphyromonas</i> spp.	+	-	+	-	+	+	V	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fusobacterium nucleatum/necrophorum</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-/+	-	-	V	-	-	-
Другие фузобактерии	-	+	-	V	-	V	-	- ⁴	-	-	-	-	-	-	-

Примечание. ¹ — кроме *B. eggerthii*; ² — кроме *P. loescheii*; ³ — нет данных; ⁴ — кроме *F. mortiferum*.

При отрицательном результате посева на средах для выделения анаэробов чашки продолжают инкубировать еще до четырех и более суток для получения колоний медленно растущих микроорганизмов.

Бактероиды группы *B. fragilis*, как правило, растут в присутствии 20 % желчи, устойчивы к канамицину, колистину и ванкомицину, не обладают липазной активностью (на среде с яичным желтком), не образуют пигмента и не дают флюоресцентного свечения. Для более точной идентификации применяют дополнительные тесты. В частности, методом газожидкостной хроматографии определяют характерные продукты метаболизма анаэробов — летучие жирные кислоты (см. подразд. 1.2.4). Детальная идентификация выделенных культур оправдана в случае тяжелого течения инфекции, признаках генерализованного процесса и при неэффективности антимикробной терапии.

Интерпретация результатов исследования проводится с учетом клинических данных и результатов других исследований.

2.5.2. Неклостридиальная анаэробная инфекция другой этиологии

По патогенезу и клиническим проявлениям неклостридиальная анаэробная инфекция, вызванная другими грамотрицательными и грамположительными анаэробами, часто имеет сходство с бактериоидной инфекцией. Их дифференциация имеет существенное значение в первую очередь для выбора антимикробной терапии.

Материал для исследования, методы его взятия и доставки — те же, что и при бактериоидной инфекции.

Микроскопия. В мазках из патологического материала, окрашенных по Граму, могут быть обнаружены грамотрицательные бактерии: сходные с бактериоидами палочки (превотеллы), короткие палочки (порфиромонады), кокки (вейллонеллы) или полиморфные, напоминающие веретено или стрелку компаса, палочки, часто со вздутиями (фузобактерии). Пептококки и пептострептококки не отличаются по морфологии и тинкториальным свойствам от факультативно-анаэробных грамположительных бактерий — стафилококков и стрептококков. Ввиду выраженного разнообразия возбудителей неклостридиальной инфекции микроскопическое исследование имеет ориентировочное значение.

Бактериологическое исследование. Для выделения чистых культур материал засевают на плотные среды для анаэробов (непосредственно или из транспортной, накопительной среды). На кровяном анаэробном агаре (с кроличьей кровью) превотеллы образуют сухие или блестящие колонии, которые дают красное свечение при УФО, а с 5—7-го дня у них появляется пигментированность (от светло-коричневого до черного цвета). Коричнево-чер-

ный пигмент в этих условиях имеют также колонии порфириномнад. Они имеют слизистый характер и обычно на 2—3-й день могут давать красное или желто-зеленое свечение при УФО. Колонии фузобактерий на кровяном агаре мелкие круглые сероватые, окружены зоной α -гемолиза; ввиду продукции большого количества масляной кислоты характерным признаком является гнилостный запах культур.

Идентификацию и дифференциацию выделенных чистых культур проводят по комплексу фенотипических характеристик (см. табл. 2.17).

Ввиду того что классическое бактериологическое исследование занимает не менее 5—6 сут для решения клинических вопросов, при остром течении инфекции применяется *экспресс-диагностика*. С этой целью проводят микроскопию патологического материала, определение специфических метаболитов (летучих жирных кислот) методом газо-жидкостной хроматографии, а в некоторых случаях — выявление НК возбудителей.

Интерпретация результатов микробиологического исследования ведется в увязке с клиническими и другими данными. Так, на анаэробную инфекцию указывают: скопление газа в пораженных тканях, размытые границы очага инфекции, гнилостный запах экссудата, его необычный цвет и вид (зеленый, коричневый, с блестящими включениями, пузырьками газа) и др.

2.6. Споробразующие грамположительные палочки и кокки

2.6.1. Сибирская язва

Возбудителем сибирской язвы — острой особо опасной зоонозной инфекции — является *Bacillus anthracis* (микроорганизмы 2-й группы патогенности). Ввиду высокой контагиозности и чрезвычайной стойкости спор возбудителя во внешней среде при манипуляциях с исследуемым материалом и выделенными культурами необходимо соблюдение особого режима для предотвращения рассеивания сибиреязвенных спор и инфицирования людей и животных.

Материалом для исследования в зависимости от клинической формы болезни (кожная, легочная, кишечная, септическая) является содержимое везикул, карбункулов, отделяемое язв, струппя, мокрота, кал или кровь (при любой форме). Трупы животных и людей не вскрывают по соображениям безопасности. От трупа человека кровь для исследования берут из поверхностных сосудов. От павших животных берут ухо. Исследуют пищевые продукты, воду, воздух, почву, а также пробы кож, щетины, шерсти и др. Пробы помещают в герметично закрывающиеся стерильные бан-

ки и пробирки, каждую из которых этикетировывают. В сопроводительном документе указывают вид материала, место и время взятия пробы, ее происхождение и другие сведения. Материалы упаковывают в закрывающийся металлический или деревянный ящик, который обвязывают, пломбируют, ставят надпись «Верх, осторожно» и на специальном транспорте с сопровождающим пересылают в специальную лабораторию.

Микроскопия. Материал от больного или от трупа микроскопируют. Для этого из проб готовят мазки, окрашенные по Граму, Романовскому—Гимзе, Ребиту (капсула), а также люминесцирующей сибирезвенной сывороткой (для экспресс-диагностики методом ИФ). Наличие в мазках крупных грамположительных бацилл, образующих цепочки, окруженные капсулой, дает возможность поставить предварительный диагноз сибирской язвы. Капсульная форма возбудителя обнаруживается, как правило, в крови при септической форме заболевания. В люминесцентном микроскопе возбудитель выглядит в виде палочек со светящимся желто-зеленым ободком (РИФ).

Бактериологический и биологический методы исследования. Для окончательного подтверждения диагноза производят посев на питательные среды и заражение животных. Материал сеют в чашки с МПА, в пробирки с МПБ (рН 7,2—7,6), кровяной агар и помещают в термостат при 37 °С. Контаминированные образцы (материал из внешней среды, от животных, из старых трупов) подвергают обработке для уничтожения вегетативных форм микроорганизмов одним из способов: а) прогревают при 63 °С в течение 15 мин; б) заливают 95%-м этанолом 1:1 и обрабатывают при комнатной температуре 30—60 мин (плотные материалы предварительно эмульгируют в деионизированной воде 1:2). В качестве селективной среды для исследования контаминированных проб можно использовать питательный агар с полимиксином В, лизоцимом, ЭДТА и ацетатом таллия (*PLET*-агар). Одновременно с посевами материалом заражают путем подкожного введения двух белых мышей.

Через 20—24 ч изучают посевы и вскрывают погибших мышей (гибель наступает через 24—48 ч после заражения). В чашках с МПА обнаруживают характерные шероховатые колонии («голова медузы»), края которых при микроскопии с малым увеличением имеют вид вьющихся локонов («львиная грива»). Структура и край колонии возбудителя представлены на рис. 2.4. В бульоне появляется придонный рост, напоминающий комочек ваты, среда остается прозрачной. Из осадка делают мазок и препарат висячей капли. В мазке обнаруживают бескапсульные грамположительные бациллы, располагающиеся длинными цепочками (стрептобациллярный рост).

Колонии *B. anthracis* могут быть похожими на колонии других бацилл (см. цв. вклейку, рис. 21). Возбудитель сибирской язвы в

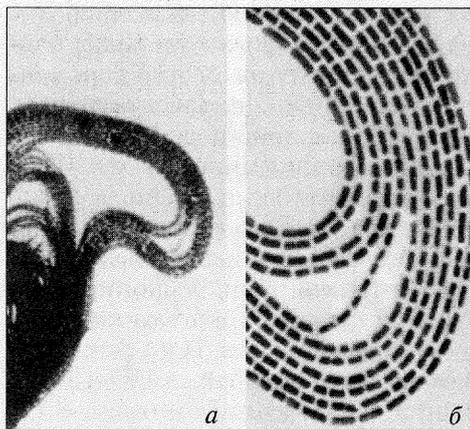


Рис. 2.4. Край колонии *Bacillus anthracis* при микроскопии под малым (а) и большим (б) увеличением

отличие от подвижных почвенных бацилл неподвижен. Для выделения чистой культуры типичные колонии пересевают на скошенный МПА.

Большое диагностическое значение имеет обнаружение капсулообразования на питательных средах. Для этой цели используют посев в бульон Хоттингера или среду, содержащую раствор Хенкса и 40 % стерильной сыворотки крупного рогатого скота, МПА с 0,7 % бикарбоната натрия, среду Буза (3%-й голодный агар с рН 7,4, к которому добавляют 15 % дефибрированной крови барана). Посевы инкубируют 18—24 ч при 37 °С в атмосфере 5—7 % CO₂, например, в эксикаторе с горящей свечой или в микроанаэроостате. Простым способом выявления капсул является посев материала из подозрительных колоний в 2,5 мл дефибрированной лошадиной крови с последующим инкубированием при 37 °С в течение 6—18 ч. В сомнительных случаях капсулообразование можно выявить также *in vivo*. Зараженных животных через 1—2 ч забивают, из перитонеальной жидкости, крови, взятой из сердца, готовят окрашенные мазки, а из селезенки, почек, легких — мазки-отпечатки.

Через 24—48 ч вскрывают трупы мышей и отмечают наличие признаков, характерных для сибирской язвы, а именно: отек в месте введения материала, потемневшую несвернувшуюся кровь, кровоизлияния в клетчатке, рыхлую селезенку и плотную красную печень. В мазках из внутренних органов и крови обнаруживают типичные бациллы, окруженные капсулой.

На 3-й день исследования проводят идентификацию выделенной культуры путем посева ее уколом в желатин, другие дифференциальные среды, лизиса сибиреязвенным фагом и заражения животных, а также определения чувствительности культуры к антибиотикам.

Бациллы сибирской язвы дают характерный рост в столбике желатина в виде стержня, от которого отходят отростки, имею-

щие вид елочки, перевернутой вершиной вниз, в дальнейшем желатин разжижается. Изучение ферментативных и других биологических свойств выделенной культуры позволяет дифференцировать бациллы сибирской язвы и почвенные бациллы (табл. 2.18).

Дополнительным методом идентификации возбудителя сибирской язвы и его дифференциации с другими микроорганизмами является *тест «жемчужного ожерелья»*. Для его выполнения в чашки с МПА, содержащим 0,5 и 0,05 ЕД/мл пенициллина, сеют 3-часовую бульонную культуру выделенного микроорганизма. Через 3 ч инкубирования при 37 °С готовят мазки, микроскопируют и наблюдают появление «жемчужного ожерелья» — округление стрептобацилл сибирской язвы с образованием шаров. Почвенные бациллы сохраняют форму палочек, расположенных цепочками.

Бациллы сибирской язвы в отличие от сходных с ними непатогенных палочек лизируются специфическим сибиреязвенным фагом.

Таблица 2.18

Дифференциально-диагностические признаки возбудителя сибирской язвы и других бацилл

Признак	Вид микроорганизмов					
	<i>B. anthracis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. mycooides</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. megaterium</i>
Капсула	+	-	-	-	-	-
Подвижность	-	+	-	+	+	+
Гемолиз	-	+	-	+	-	+
Рост в анаэробных условиях	+	+	+	+	-	-
Лецитиназа	+	+	+	+	-	-
Аргининдегидролаза	-	V	V	+	-	-
Нитратредуктаза	+	+	+	+	+	-
Патогенность для мышей	+	-	-	-	-	-
Ферментация до кислоты						
глицерина	-	V	+	+	+	+
маннита	-	-	-	-	+	+
салицина	-	V	+	+	+	+

Примечание. «-» — отрицательная реакция; «+» — положительная реакция; «V» — переменная реакция.

Наличие *сибирязвенного антигена* в разложившемся трупe животного, коже (свежей, сухой, выделанной) и изделиях из нее, шкурках, мехе, шерсти определяют с помощью *реакции термопреципитации по Асколи*. Исследуемый материал измельчают, заливают 10—20-кратным объемом ИХН и кипятят в течение 10—45 мин или выдерживают 16—20 ч при 6—14 °С. Затем жидкость фильтруют и полученный экстракт в узкой пробирке осторожно наслаивают на преципитирующую сибирязвенную сыворотку (получают из крови животных, гипериммунизированных вакциной СТИ или убитой культурой возбудителя). Параллельно ставят контроли: вытяжки и преципитирующей сыворотки, с заведомо положительной и отрицательной пробой, с нормальной лошадиной сывороткой и др. (см. подразд. 1.4.2). На границе соприкосновения двух жидкостей в течение 1—5 мин появляется кольцо белого цвета (преципитат), что расценивается как положительная реакция (см. рис. 1.24). При появлении преципитата позже 10 мин реакцию считают неспецифической.

На основании морфологических, тинкториальных, культуральных и биологических данных, а также результатов индикации антигенов возбудителя делают заключение об обнаружении *B. anthracis*.

Серологическое исследование. Серодиагностика проводится в тех случаях, когда не удастся обнаружить возбудителя в материале. Для определения антител в сыворотке крови больного используют высокочувствительные реакции *латекс-агглютинации* и *пассивной агглютинации* с протективным сибирязвенным антигеном.

Аллергологическое исследование. Аллергическая проба применяется для определения иммунологических сдвигов после перенесенного заболевания и вакцинации. Аллерген — антраксин вводят внутрикожно в ладонную поверхность предплечья в объеме 0,1 мл. Результаты учитывают через 24 ч. Пробу считают положительной при наличии гиперемии и инфильтрата диаметром более 15 мм (см. подразд. 1.5.1).

2.6.2. Газовая гангрена (травматический клостридиоз)

Газовая гангрена — заболевание, возникающее после обширных глубоко проникающих ранений мышц и других тканей, после криминальных абортов, при условии загрязнения тканей гистотоксическими клостридиями (чаще из внешней среды, особенно почвы). По гистотоксичности и частоте выделения возбудители этого заболевания убывают в ряду: *Clostridium perfringens* (80%), *Clostridium novyi*, *Clostridium septicum*, *Clostridium histolyticum*, *Clostridium bifermentans*. Эти микроорганизмы входят в состав нормальной микрофлоры тела человека и животных.

Исследуемый материал — кусочки пораженных и некротизированных тканей, взятые на границе со здоровыми, экссудат, гной,

отделяемое ран, кровь. От трупов берут отделяемое ран, кусочки измененных мышц, кровь из сердца, кусочки селезенки и печени.

Кусочки тканей и взятый тампоном материал из глубины раны сразу погружают в транспортную питательную среду (например, тиогликолевую). Гной можно пересылать в пробирке или шприце. Для приготовления и микроскопии мазков используют отдельные тампоны, которые помещают в стерильные сухие пробирки (если нет возможности сразу приготовить мазки). Кровь (5—10 мл) берут из локтевой вены при строгом соблюдении правил асептики и сразу вносят в 50—100 мл среды накопления. Отобранный материал доставляют в лабораторию в течение 1 ч.

Микроскопия. Из нативного материала готовят мазки, окрашивают их по Граму, Цилю—Нильсену и Бурри—Гинсу, микроскопируют, обращая внимание на наличие крупных прямых грамположительных палочек, капсулы, центрально, субтерминально или отдельно расположенных спор (образование капсулы *in vivo* характерно для *S. perfringens*).

Бактериологическое и биологическое исследование. После микроскопии материал засевают на специальные жидкие и плотные среды (анаэробный кровяной агар, среда Вильсона—Блера, среда Китта—Тароцци, желточная среда). Для приготовления неселективной среды для клостридий используют в качестве основы агар для бруцелл с 5% бараньей крови, колумбийский или сердечно-мозговой агары, в которые добавляют дрожжевой экстракт, витамин К и гемин. В качестве селективных сред (для контаминированных образцов) можно использовать анаэробный кровяной агар с добавлением неомицина или фенолэтилового спирта. Перед посевом плотные материал гомогенизируют (растирают в стерильной ступке со средой накопления) и делят на две части, одну из которых прогревают в водяной бане при 80 °С в течение 10 мин (для уничтожения вегетативных клеток сопутствующих микроорганизмов). Обе части материала исследуют одновременно. В качестве альтернативного метода (особенно при подозрении на присутствие термочувствительных штаммов *S. perfringens*) используют обработку материала *этиловым спиртом*: к 1,0 мл исследуемого гомогената или экссудата добавляют такое же количество 95%-го этанола и перемешивают их при комнатной температуре в течение 1 ч, после чего этим материалом засевают указанные выше питательные среды.

Посевы инкубируют в анаэроостате, а столбики со средой — в термостате при 37 °С.

Из посевов готовят мазки, окрашивают их по Граму, учитывая характер роста на жидких питательных средах и пересевают материал на плотные среды. Многие возбудители газовой гангрены вызывают разрывы и образование пузырьков газа в глубине питательных сред.

Характер роста на плотных питательных средах учитывают на 3-й день. На кровяных средах клостридии, как правило, образуют зону полного гемолиза. Для *C. perfringens* характерно образование двойной зоны гемолиза (с зоной неполного гемолиза на периферии, особенно четко заметной после 2-часового выдерживания чашки в холодильнике). Колонии клостридий имеют характерный вид и тенденцию к сливному росту, у *C. perfringens* — гладкие сероватые с ровным краем с приподнятым центром или чечевице-подобные (в глубине среды). На средах с желтком проверяют наличие у культур лецитиназы и липазы. В присутствии лецитиназы вокруг колоний образуется непрозрачная зона из нерастворимых продуктов разрушения лецитина, а при наличии липазы на поверхности роста появляется перламутровый блеск. При наличии протеолитической активности вокруг колонии клостридий появляется зона просветления (повышенной прозрачности) агара. Подозрительные колонии отбирают иглой, проверяют их однородность и засевают в столбик полужидкой среды с кусочками фарша или печени для накопления чистой культуры. После инкубирования при 37 °С в течение 20—24 ч проверяют чистоту культуры, ставят тесты для ее идентификации и определения факторов патогенности. Определяют морфологию выделенных бактерий, их подвижность, устойчивость к действию молекулярного кислорода (аэротолерантность), проверяют на отсутствие каталазной и оксидазной активности, способность сбрасывать углеводы, изменять цвет лакмусового молока, разжижать желатин (табл. 2.19).

Окончательную идентификацию выделенных клостридий газовой гангрены проводят путем выявления и типирования их экзотоксинов. Для этого ставят реакцию нейтрализации с поливалентными и моновалентными сыворотками (к токсинам *C. perfringens*, *C. septicum*, *C. novyi A* и *B*). Центрифугаты 3-дневных бульонных чистых культур, содержащие экзотоксины, смешивают с соответствующими сыворотками и после 30-минутной экспозиции при 37 °С по 0,5 мл смеси внутривенно вводят лабораторными животным (мышам). Результат учитывают через 5 ч и окончательно — на 3—4-е сут. В случае нейтрализации (положительный результат) животные выживают, в контроле и при отрицательном результате (несоответствие сыворотки типу токсина) — погибают (обычно через 1—4 ч).

В ходе диагностики важно учитывать, что газовая гангрена является полимикробным заболеванием, причем в состав микробной ассоциации, помимо одного или нескольких видов клостридий, могут входить и другие микроорганизмы (протеи, стафилококки и др.). Ввиду того что *C. perfringens* входит в состав нормальной микрофлоры кишечника, их роль в возникновении патологического должна быть обоснованной.

Дифференциально-диагностические признаки клинически значимых клостридий

Признак	Клостридии и вызываемые ими заболевания							
	Газовая гангрена					Столбняк	Ботулизм	ПМК*
	<i>C. perfringens</i>	<i>C. novyi (A/B)</i>	<i>C. septicum</i>	<i>C. histolyticum</i>	<i>C. bifermentans</i>	<i>C. tetani</i>	<i>C. botulinum I</i>	<i>C. difficile</i>
Круглая, терминально расположенная спора	-	-	-	-	-	+	-	-
Подвижность	-	+	+	+	+	+	+	+
Лецитиназа	+	+	-	-	+	-	-	-
Липаза	-	+/-	-	-	-	-	+	-
Желатина (гидролиз)	+	+	+	+	+	+	+	+
Молоко (пептонизация)	+	-/+	+	+	+	V	+	-
Индол	-	-/V	-	-	+	-	-	-
Глюкоза	+	+	+	-	+	-	+	+
Мальтоза	+	V	+	-	-	-	-	-
Лактоза	+	-	+	-	-	-	-	-
Сахароза	+	-	-	-	-	-	-	-
Салицин	-	V/-	V	-	-	-	-	-
Маннит	-	-	-	-	-	-	-	+/-

Примечание. * ПМК — псевдомембранозный колит или антибиотиковый энтероколит; «-» — отрицательная реакция; «+» — положительная реакция; «V» — варибельная реакция.

Для ускоренной диагностики исследуемый материал центрифугируют и с центрифугатом проводят реакцию нейтрализации (как описано выше). Кроме того, материал засевают на среду Вильсона—Блера и лакмусовое молоко в пробирках и инкубируют при 42 °С. Через 3—6 ч при наличии в материале *C. perfringens* лакмусовое молоко краснеет, образуется губчатый сгусток с пузырьками газа и прозрачная сыворотка (пептонизация), а в среде Вильсона—Блера отмечаются множественные разрывы и почернение.

К быстрым методам диагностики относятся также выявление лецитиназы в фильтрах и нейтрализация ее типоспецифическими сыворотками. Для этого материал центрифугируют, разводят в ИХН 1:2, 1:4 и т.д., добавляют активатор (0,005 М CaCl₂) и 1 мл каждого из разведений смешивают с 0,1 мл типоспецифической сыворотки. Смесь инкубируют в течение 40 мин при 20 °С, а затем добавляют 0,2 мл раствора лецитина и помещают в термостат при 37 °С на 2 ч. Контролем служит та же смесь, но без сыворотки. В контроле фильтрат лецитиназоположительного микроорганизма (например, *C. perfringens*) образует помутнение и опалесценцию, в пробирках с сывороткой этих изменений нет.

Экспресс-диагностика. Ввиду частого присутствия в материале от ургентных больных *C. perfringens* проводят *экспресс-диагностику* с индикацией указанных микроорганизмов методами РИФ и/или газовой хроматографии. Для обнаружения клеток возбудителя из материала готовят мазки и обрабатывают их люминесцирующей антиперфрингенс-сывороткой (прямой метод ИФ). При наличии *C. perfringens* в материале обнаруживают крупные прямые палочки со специфическим свечением по периферии. Индикация возбудителя хроматографическим методом основана на выявлении (в экстракте исследуемого материала или культур на этапах выделения) летучих жирных кислот (уксусной, масляной, пропионовой, изокапроновой, валериановой и др.). При этом учитывают вид и количество продуктов анаэробного метаболизма, характерных для *C. perfringens* или других анаэробов. Результат экспресс-анализа позволяет ориентировочно подтвердить присутствие возбудителей газовой гангрены примерно через 2 ч.

2.6.3. Псевдомембранозный колит

Антибиотиковый энтероколит и псевдомембранозный колит — госпитальная инфекция, возникающая на фоне нерациональной антибиотикотерапии и передаваемая преимущественно контактно-бытовым путем. Возбудитель — *Clostridium difficile* — относят к условно-патогенным микроорганизмам. В кишечнике здоровых лиц они встречаются в 3 — 50 % случаев (чаще у детей). Ввиду высокой антибиотикоустойчивости и способности к выработке токсинов и других факторов патогенности *C. difficile* на фоне селективного давления антибиотиков или при дисфункциях кишечника колонизируют его, способствуя развитию патологического процесса.

В основе диагностики лежит выделение возбудителя и обнаружение его токсинов.

Материалом для исследования являются свежесобранные фекалии (5—20 мл), интраоперационный и секционный материал (содержимое кишечника, отрезки кишки), которые помещают в плотно закрывающиеся контейнеры. Оформленный стул исследо-

ванию не подлежит. Исследование материала желательно начать не позднее чем через 2 ч после взятия. При необходимости его можно сохранять при 5 °С (до 48 ч).

Микроскопия. Обнаружение в исследуемом материале относительно крупных грамположительных палочек, со спорами или без них, позволяет заподозрить заболевание.

Бактериологическое исследование. Исследуемый материал засевают на фруктозный агар с лошадиной кровью и антибиотиками (цикloserином и цефокситином). Цикloserин (500 мкг/мл) подавляет рост эшерихий и других грамотрицательных бактерий, цефокситин является антибиотиком широкого спектра действия. Засеянные чашки инкубируют при 37 °С в анаэробных условиях в течение 24 ч. Выросшие колонии кластридий и среда вокруг них окрашиваются индикатором нейтральным красным в желтый цвет. Посев издает запах крезол или конского навоза. Колонии могут иметь правильную или неправильную форму, плоские с фестончатым краем и матовой поверхностью. При облучении их длинноволновым ультрафиолетом колонии дают золотисто-желтую флюоресценцию.

В другом варианте для посева используют обычный анаэробный кровяной агар, но предварительно материал подвергают спиртовой или тепловой обработке для уничтожения вегетативных форм микроорганизмов (при сохранении спор кластридий). Для этого 1 мл материала смешивают с таким же количеством 95%-го этанола и в течение 1 ч перемешивают при комнатной температуре, после чего смесь высевает на анаэробный кровяной агар или другие неселективные среды. Прогревание ведут в течение 10 мин при 80 °С с последующим высевом на те же среды. На кровяных средах возбудитель образует негемолитические кремово-желтые или бело-серые колонии размером 2—4 мм с мозаичной внутренней структурой, неровными краями и матовой поверхностью.

Идентификацию выделенных культур ведут по комплексу морфолого-физиологических признаков (см. табл. 2.19). Предварительная идентификация возможна по морфологии клеток в мазке, окрашенном по Граму, характерному виду и запаху колоний. В некоторых случаях для более точной идентификации культур определяют состав их жирных кислот.

У выделенных культур (реже непосредственно в исследуемом материале) определяют характерные для возбудителя токсины (цитотоксин, энтеротоксин). Для этого используют тесты нейтрализации на культуре ткани и ИФА (последний также используют для скрининга токсигенных культур). Для быстрого обнаружения возбудителя в исследуемом материале применяют реакцию агглютинации латексных частиц, нагруженных антителами к *S. difficile*. Ввиду широкого распространения данных микроорганизмов у здо-

ровых лиц при интерпретации полученного результата необходимо учитывать клинико-эпидемиологические данные и токсигенность выделенных культур.

2.6.4. Ботулизм

Ботулизм — острая пищевая интоксикация, протекающая с преимущественным поражением центральной и вегетативной нервной системы. Реже встречается ботулизм, связанный с вегетацией возбудителя — *Clostridium botulinum* — в ране или кишечнике детей и взрослых. Ботулинический токсин относят к самым сильным биологическим ядам (особо опасный патогенный биологический агент).

Для проведения исследований берут 15—20 мл сыворотки крови (менее предпочтительно — 10—12 мл крови с добавлением цитрата натрия, 3 : 1); по 50—100 мл рвотных масс, промывных вод желудка, кала, мочи; 25—50 г остатков пищевых продуктов, с которыми связывают возникновение заболевания. Все материалы отбирают до введения лечебно-профилактической противоботулинической сыворотки. У трупа исследуют кровь, кусочки печени, кишечника, содержимое желудка и кишечника, головной и спинной мозг. Консервы перед исследованием выдерживают 10—12 сут в термостате, после чего асептически отбирают 50—100 г, эмульгируют и центрифугируют пробу (в надосадочной жидкости определяют токсин, в осадке — *C. botulinum*). Пробы рыбы или мяса отбирают из глубины после обработки их поверхностей спиртом.

Исследование материала ведут одновременно в двух направлениях — обнаружение ботулинического токсина ($\frac{2}{3}$ пробы) и выделение возбудителя ($\frac{1}{3}$ пробы). Кровь исследуют только на наличие токсина, кал — только на наличие возбудителя.

Обнаружение ботулинического токсина. Обнаружение токсина и определение его типа с помощью *реакции нейтрализации* имеет особое значение для выбора антитоксической сыворотки — единственного средства специфической терапии и экстренной профилактики ботулизма.

Подготовка материала. Промывные воды желудка (25—30 мл) при наличии в них комочков пищи растирают в стерильной ступке; $\frac{2}{3}$ этой пробы выдерживают при комнатной температуре в течение 1 ч для экстрагирования, а затем фильтруют через ватно-марлевый фильтр или центрифугируют при 3000 об/мин в течение 15—20 мин. Цитратную кровь или сыворотку перед исследованием разводить не следует (ее вводят мышам только внутривбрюшинно). Испражнения больных (20—25 г) растирают в стерильной ступке с двойным объемом ИХН и выдерживают при комнатной температуре в течение 1—1,5 ч, а затем фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Аналогичным образом подготавливают экстракты из трупного материала.

Методика реакции. Для проведения РН используют сухие диагностические антитоксические сыворотки типов *A*, *B*, *E*, *F*, которые разводят ИХН до 100—200 МЕ/мл, что обычно обеспечивает нейтрализацию гомологичного токсина в исследуемой пробе. Реакцию нейтрализации проводят либо со смесью сывороток (предварительная реакция), либо с моновалентными сыворотками — для обнаружения токсина определенного типа. Подготовленный исследуемый материал (кровь, фильтрат, центрифугат) разливают по 1 мл в 5 пробирок; в первые четыре пробирки добавляют по 1 мл противоботулинической сыворотки типов *A*, *B*, *E*, *F* соответственно, в последнюю — 1 мл нормальной сыворотки. Пробирки инкубируют при 37 °С в течение 30 мин, затем по 0,5—1,0 мл смеси из каждой пробирки вводят пяти парам белых мышей массой 16—18 г (кровь — внутривенно, другие биоматериалы — подкожно). Наблюдают за животными в течение 4 сут.

Если в исследуемом материале имеется ботулинический токсин, выживает только одна пара мышей вследствие нейтрализации токсина антитоксической сывороткой соответствующего типа (положительная реакция). Если же погибнут все мыши, то РН следует повторить, предварительно разбавив биоматериал в 5, 10, 20 или 100 раз. При наличии в исследуемом материале ботулинического токсина у мышей развивается парез конечностей. На вскрытии трупов мышей обнаруживают гиперемии внутренних органов, очаги воспаления в легких, переполнение желудка, мочевого и желчного пузырей. В заключении лаборатории об обнаружении в исследуемом материале ботулинического токсина обязательно указывают его тип.

Идентификацию ботулинического токсина проводят также в РНГА с антителами эритроцитарными диагностикумами.

Бактериологическое исследование. Перед посевом исследуемый материал предварительно растирают в фарфоровой ступке. Засевают 10—12 мл материала в среду накопления (Китта—Тароцци или др.). Одну пробу засевают в 4 флакона, два из которых прогревают: один при 60 °С в течение 15 мин (для селекции *C. botulinum* типа *E*), другой — при 80 °С в течение 20 мин. Накопление культур клостридий ботулизма типов *E* и *F* происходит при 28 °С, а для выращивания клостридий типа *A* и *B* посевы культивируют при 35 °С в течение 48 ч. Для активации токсина *E* (из протоксина) к питательной среде добавляют трипсин (до конечной концентрации 0,1 %). Остатки образцов исследуемого материала сохраняют в холодильнике до окончания анализа.

Через 24—48 ч инкубирования посевов отмечают помутнение и газообразование в среде накопления. Из среды, где отмечается рост, готовят мазки и окрашивают их по Граму. При обнаружении типичных клеток клостридий («теннисные ракетки» со спорами) делают пересев на плотные питательные среды для получения изолированных колоний. Выделение чистой культуры осложнено тем, что клостридии ботулизма часто находятся в ассоциациях с аэробными и другими анаэробными бактериями (иногда только

многократные пересевы дают возможность получить чистую культуру). На кровяном сахарном агаре *C. botulinum* образует колонии неправильной формы с гладкой или шероховатой поверхностью, окруженные зоной гемолиза. В глубине столбика сахарного агара эти колонии имеют вид пушинок или чечевичек.

Для идентификации полученную чистую культуру сеют в среде «пестрого» ряда, изучают другие дифференциальные признаки (см. табл. 2.19). Антигенные свойства культуры изучают в РА с типовыми сыворотками.

Одновременно с изучением ферментативных свойств выявляют ботулинический токсин в фильтрате бульонной культуры и определяют его тип (см. выше).

Важную роль в диагностике ботулизма играют эпидемиологические данные и характерные клинические проявления (паралитический синдром). Отрицательные результаты лабораторных исследований не исключают диагноз ботулизма.

2.6.5. Столбняк

Столбняк — острая инфекционная болезнь, вызываемая *Clostridium tetani* (бактериями 3-й группы патогенности) и сопровождающаяся интоксикацией, тоническими и клоническими сокращениями мышц. Клиническая картина столбняка настолько типична, что, как правило, бактериологическое исследование с целью диагностики заболевания является излишним. Для обнаружения возбудителя столбняка обычно исследуют перевязочный и шовный хирургический материал, а также различные препараты, предназначенные для парентерального введения, чтобы проверить правильность стерилизации; иногда исследуют воздух, пыль и другие объекты внешней среды.

В случаях неясного течения болезни исследуют гной, кровь, кусочки ткани, вырезанные из раны, после родов или аборта — выделения из матки, при аутопсии — кусочки печени, селезенки, кровь. Из тканей, густого гноя готовят взвеси в ИХН. Вату, марлю, шовный материал разрезают ножницами и помещают в питательные среды.

Микроскопия. Обнаружение в мазках из материала, взятого от больного или трупа, тонких длинных грамположительных палочек с круглыми терминально расположенными спорами, вызывает подозрение на наличие *C. tetani*. Однако на основании бактериоскопии нельзя делать заключение о присутствии столбнячных клостридий, так как в материале споры могут отсутствовать и могут находиться морфологически сходные с *C. tetani* микроорганизмы.

Бактериологическое и биологическое исследование. Исследуемый материал засевают на среду накопления (Китта—Тароцци или др.), выдерживают в анаэробных условиях в термостате в те-

чение 3—4 дней, после чего делают пересев на плотные среды для получения изолированных колоний. Колонии *S. tetani* на кровяном сахарном агаре имеют вид сетки из мелких паучков или росинок, а в столбике сахарного агара напоминают комочки шерсти или ваты.

Выделенную чистую культуру идентифицируют (см. табл. 2.19) и проверяют ее токсигенность. Токсин *S. tetani* накапливается к 4—5-му дню культивирования. Культуру, выращенную на жидкой среде (Китта—Тароцци или др.), центрифугируют, надосадочную жидкость смешивают с антитоксической противостолбнячной сывороткой (и с ИХН — для положительного контроля). После инкубации в течение 40 мин при 37 °С по 0,3 мл каждой смеси вводят двум белым мышам внутримышечно (у корня хвоста). За мышами наблюдают 4—5 сут. У животных контрольной группы на 2—4-е сут появляются признаки столбняка — ригидность хвоста и мышц в месте введения токсина, быстро наступает смерть. У мышей в опыте эти явления отсутствуют (нейтрализация токсина).

При введении мышам экстракта исследуемого материала (пробу ставят одновременно с посевами) развивается та же клиническая картина столбняка, как при введении токсина чистых культур.

Выделение чистой культуры *S. tetani* методом Файлдса. Для этой цели 3—4-х-суточную культуру в среде накопления прогревают в течение 1,5 ч при 60 °С, после чего сеют несколько капель культуры в конденсационную воду свернутой сыворотки. Сыворотку затем помещают в строго анаэробные условия при 37 °С и через 1—2 сут отмечают появление «ползучего» роста *S. tetani*, подобно росту *P. vulgaris* при посеве по Шукевичу. Из верхней части посева петлей пересевают культуру снова в конденсационную воду свернутой сыворотки. Такие пересевы повторяют до получения чистой культуры.

2.7. Не образующие спор грамположительные палочки неправильной формы

2.7.1. Дифтерия

Дифтерия — острое антропонозное инфекционное заболевание с преимущественно аэрозольным механизмом передачи, характеризующееся местным фибринозным воспалением слизистых оболочек (чаще рото- и носоглотки) и явлениями интоксикации с преимущественным поражением сердечно-сосудистой, нервной систем и надпочечников.

Возбудителем дифтерии являются токсигенные варианты *Corynebacterium diphtheriae* — бактерии 3-й группы патогенности.

Основным методом лабораторной диагностики дифтерии является бактериологический. Диагноз дифтерии ставят при обнаружении возбудителя. Бактериологическое исследование проводят в обязательном порядке у лиц с острыми воспалительными процессами в области зева, носа и носоглотки, а также по эпидемиологическим показаниям у лиц, находившихся в контакте с больными, у лиц, вновь поступающих в детские дома, ясли, школы-интернаты и некоторые другие специальные учреждения, с целью выявления среди них бактерионосителей.

Исследуемым материалом служат дифтеритические пленки или отделяемое пораженной слизистой оболочки зева, носа (при других формах — отделяемое ран, наружных половых органов или конъюнктивы глаза и, как от микробоносителей, — отделяемое слизистой оболочки зева и носа). По требованию эпидемиолога исследуют пищевые продукты (молоко, мороженое), смывы с различных предметов (игрушек и др.).

Отделяемое слизистой оболочки зева следует брать натошак или через 2 ч после еды. Обследуемый не должен перед взятием материала применять антибиотики (в течение 3 сут) или другие antimicrobial средства. Материал из зева берут сухим стерильным ватным тампоном с миндалин, небных дужек и не границе пораженной и здоровой ткани, не касаясь слизистой оболочки щек, языка и зубов. Дифтеритические пленки осторожно снимают пинцетом. Материал из зева и носа берут двумя тампонами, которые раздельно помещают в пробирки и немедленно отправляют в лабораторию. Взятие материала должно проводиться в течение 3—4 ч (не позднее 12 ч) с момента обращения больного. По возможности сразу же делают посев на специальные питательные среды. В противном случае их хранят в холодильнике. Если доставка занимает более 3 ч, тампоны смачивают 5%-м раствором глицерина в ИХН. Пробирки с материалом этикетируют и составляют направление, в котором указывают вид материала, Ф. И. О. обследуемого, цель исследования, кем и когда взят материал.

Бактериологическое исследование. Посев материала производят на одну из элективных сред в чашках Петри: кровяно-теллуритовый агар, кровяной агар, среду Клауберга II, сывороточно-теллуритовую среду с цистином (по Тинсдалю), хинозольную среду Бучина. При выделении коринебактерий дифтерии рекомендуется постоянно использовать одну из указанных дифференциальных сред, так как это позволяет получать более четкие и сравнимые результаты. Среда Бучина используется, как правило, при эпидемиологических обследованиях.

Кровяно-теллуритовый агар. К 100 мл расплавленного и охлажденного до 50 °С питательного агара добавляют 5—10 % дефибрированной крови и 1 мл 2%-го раствора теллурита калия. Среду тщательно перемешивают и разливают в стерильные чашки Петри.

Хинозольная среда Бучина. Среда готовится из порошка согласно прописи на этикетке, ее кипятят 2—3 мин, охлаждают до 50 °С и добавляют 50 мл дефибрированной крови (кролика или человека). Готовая среда имеет темно-синий цвет.

При посеве материал втирают тампоном в поверхность среды. Через 24—48 ч инкубирования при 37 °С изучают колонии в чашках. На средах с теллуритом калия дифтерийные коринебактерии типа *gravis* образуют относительно крупные, серовато-черные, плоские, шероховатые колонии с радиальной исчерченностью и зубчатыми краями, напоминающие цветы маргаритки; колонии типа *mitis* — мелкие, выпуклые, блестящие, черные, с гладкой поверхностью и ровными краями. Другие коринебактерии чаще растут в виде выпуклых, влажных колоний серого или коричневого цвета или образуют сухие, мелкие колонии серого цвета. На среде Бучина колонии дифтерийной палочки имеют синий цвет, коринеформные бактерии на этой же среде образуют бесцветные или голубоватые колонии.

Для получения чистой культуры и определения токсигенности подозрительные колонии микроскопируют (мазки окрашивают по Граму, Нейссеру и другими методами), пересевают на сывороочную среду и в чашку с фосфатно-пептонным агаром (средой Илека). Чистые культуры сеют в среды «пестрого» ряда (глюкоза, сахароза, крахмал), среду с цистином для обнаружения цистиназы (проба Пизу), среду с мочевиной, среду с пиразинамидом и др. (табл. 2.20).

Среда для определения цистиназы. К 90 мл расплавленного МПА (рН 7,6) добавляют 2 мл 1%-го щелочного раствора цистина, тщательно перемешивают и добавляют 2 мл 0,1 N раствора серной кислоты. Среду стерилизуют при 112 °С 30 мин. К расплавленной и охлажденной до 50 °С среде добавляют 1 мл 10%-го раствора уксуснокислого свинца (двукратно стерилизованного текучим паром), перемешивают и добавляют 9 мл нормальной лошадиной сыворотки. Среду асептически разливают по 2 мл в маленькие пробирки. При посеве уколом дифтерийные коринебактерии вызывают почернение среды по ходу укола и вокруг него в виде облака (образование сероводорода ведет к формированию черного преципитата сульфида свинца).

При выделении токсигенных штаммов дифтерийных коринебактерий окончательный ответ может быть выдан через 48 ч, при обнаружении нетоксигенных штаммов — через 72 ч. В ответе указывают биологический (*gravis* или *mitis*) и серологический вариант возбудителя, фаговар выделенного микроорганизма, а также его токсигенность.

Определение токсигенности культур in vitro. Для этой цели в чашку Петри наливают 12 мл расплавленного и охлажденного до 50 °С фосфатно-пептонного или другого подходящего агара.

Дифференциально-диагностические признаки возбудителей дифтерии и непатогенных коринебактерий

Вид микроорганизмов	Признак								
	Токсигенность	СAMP-тест	Ферментация					Восстановление нитратов в нитриты	
			цистина	пиразинамида	глюкозы	сахарозы	крахмала		мочевины
<i>C. diphtheriae</i> var. <i>gravis</i>	V	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>C. diphtheriae</i> var. <i>mitis</i>	V	-	+	-	+	-	-	-	+
<i>C. diphtheriae</i> var. <i>intermedius</i>	-/+*	-	+	-	+	-	-	-	+
<i>C. diphtheriae</i> var. <i>belfanti</i>	-/+*	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>C. ulcerans</i>	-**	***	+	-	+	-	+	+	-
<i>C. pseudotuberculosis</i>	-**	***	+	-	+	±	-	+	±
<i>C. pseudodiphthericum</i>	-	-	-	+	-	-	-	+	+
<i>C. xerosis</i>	-	-	-	+	+	+	-	-	+
<i>C. jeikeium</i>	-	-	-	+	+	-	-	-	-

Примечание. * редко бывают токсигенными, ** могут содержать *tox*-ген, V — токсигенная часть штаммов, *** — инверсированная СAMP-реакция (угнетение гемолиза).

После застывания питательной среды на середину чашки помещают полоску стерильной фильтровальной бумаги (2,5 × 8 см), смоченной антитоксической сывороткой, содержащей в 1 мл 500 АЕ, или специфическим гамма-глобулином. Чашку подсушивают 15—20 мин в термостате, затем сеют исследуемую культуру штрихами, перпендикулярными к фильтровальной бумаге, или бляшками диаметром 1 см на расстоянии 1 см от края полоски. В одной чашке можно сеять от 3—4 до 10 культур (одна из них контрольная — заведомо токсигенная). Посевы инкубируют при 37 °С. Результаты учитывают через 24, 48, 72 ч. Если культура токсигенна, на некотором расстоянии от полоски бумаги возникают линии преципитации, совпадающие с линиями преципитата контрольной культуры. Они имеют вид «стрел-усиков», которые хо-

рошо видны в проходящем свете. В случае антигенной идентичности токсинов, выделяемых смежными культурами, линии преципитации сливаются, образуя дугу (см. рис. 1.25).

Модифицированный метод Илека. К 2,5 мл расплавленной и остуженной до 45 °С основы среды Илека добавляют 0,5 мл стерильной телячьей сыворотки, тщательно перемешивают и выливают в стерильные пластиковые чашки Петри диаметром 45 мм. После застывания агара на его поверхность бляшками засевают испытуемые и контрольные (заведомо токсигенные) культуры коринебактерий. В центр чашки (на расстоянии 9 мм от краев бляшек) на поверхность агара помещают бумажный диск, пропитанный противодифтерийной антитоксической сывороткой (10 МЕ); в другом варианте ту же сыворотку (4,5 МЕ) вносят в лунку, вырезанную в центре агаровой пластинки. После инкубирования при 37 °С в течение 24—48 ч в агаре между бляшками токсигенных коринебактерий и диском (лункой) отмечают появление тонких линий преципитата (см. рис. 1.26).

В последние годы для определения токсигенности применяют высокочувствительные методы — ИФА с моноклональными антителами, РНГА с антительным эритроцитарным дифтерийным диагностикумом, причем ИФА и РНГА позволяют также обнаружить токсин в сыворотке крови.

Хотя в настоящее время имеется несколько тест-систем для выявления гена экзотоксина *C. diphtheriae* с помощью ПЦР, ВОЗ рекомендует применять праймеры для амплификации фрагмента, кодирующего синтез субъединицы А токсина. Выявление гена дифтерийного токсина у нетоксигенных штаммов представляется особенно важным при оценке эпидемиологической ситуации, поскольку репрессированный полноценный ген при определенных условиях способен восстановить экспрессию и выработку токсина, что свидетельствует о потенциальной опасности таких штаммов.

Микроскопия. Материал от больного микроскопируют только по требованию врача. В этих случаях отделяемое слизистой оболочки или пленки снимают двумя тампонами: один из них используют для посева, другой — для приготовления мазков. *C. diphtheriae* обладают полиморфизмом и плохо воспринимают красители. Мазки можно окрашивать уксуснокислым метиловым фиолетовым, синью Леффлера, толуидиновым синим, по Нейссеру, по Граму (см. [ив. вклейку, рис. 4](#)). В мазках, приготовленных из пленки, коринебактерии дифтерии имеют вид единичных палочек с булавоподобными утолщениями, расположенных под углом, подобно цифре V или растопыренным пальцам, реже они образуют скопления, напоминающие войлок или рассыпанные булавки. При окраске уксуснокислым метиловым фиолетовым или синью Леффлера отчетливо выявляются интенсивно окрашен-

ные гранулы волютина. По Граму *C. diphtheriae* окрашиваются положительно. Ложнодифтерийные бактерии и дифтероиды располагаются параллельно («частоколом») и обычно лишены гранул волютина.

Гранулы волютина можно выявить с помощью люминесцентной микроскопии. Для этого препарат окрашивают корифосфином. На темном фоне видны желто-зеленые тела бактерий с оранжево-красными гранулами волютина. При обнаружении типичных коринебактерий немедленно выдают предварительный результат: «Обнаружены морфологически сходные с коринебактериями дифтерийные микроорганизмы, исследование продолжается».

Серологическое исследование. В диагностике дифтерии это исследование имеет вспомогательное значение. Антитела при токсических и гипертоксических формах могут не образовываться. Поэтому определению антитоксических антител осуществляется только у вакцинированных для выявления напряженности иммунитета. Для этой цели вместо ранее применявшейся пробы Шика с дифтерийным токсином ставится РНГА с эритроцитарным антигеном (на поверхности эритроцитов находится дифтерийный анатоксин).

2.7.2. Актиномикоз

Актиномикоз — хроническое инфекционное заболевание с полиморфными проявлениями, вызываемое актиномицетами — *Actinomyces israelii* и реже другими условно-патогенными бактериями рода *Actinomyces*. Предрасполагающими факторами являются травмы и инвазивные медицинские процедуры, а также снижение антиинфекционной резистентности. Наиболее часто поражаются ткани с низким содержанием кислорода. Вокруг размножающегося возбудителя в тканях формируются специфические гранулемы, внутри которых находятся колонии актиномицетов — *друзы*.

В результате распада и постепенного контактного распространения образуются свищевые ходы, через которые друзы и гной могут выделяться наружу. Различают актиномикоз лица, абдоминальный, торакальный актиномикоз. Поражаются также кости, ЦНС, мочеполовая система.

При актиномикозе исследуют гной из свищевых ходов, пунктат из нескрытых очагов размягчения, соскобы с грануляций, материал, полученный при биопсии, мокроту.

Микроскопия. Для обнаружения в гное и мокроте друз — мелких (0,3—2,0 мм) желтоватых или серовато-белых зернышек с зеленоватым оттенком — пробирку наклоняют и медленно вращают, при этом гной стекает, а зернышки и комочки остаются на стенке. Их захватывают петлей и помещают на несколько минут в

каплю 5—10%-го гидроксида натрия, затем промывают водой и наносят на предметное стекло в каплю такого же раствора щелочи, накрывают покровным стеклом и микроскопируют. При малом увеличении типичные друзы имеют вид образования округлой формы с бесструктурным центром и периферией радиального строения. При исследовании с иммерсионной системой в центре друз видны сплетения тонких гифов с пигментированными зернами. По периферии от этого клубка мицелия отходят радиально в виде лучей гифы, имеющие колбовидные утолщения на концах.

Микроскопическому исследованию подвергают также окрашенные препараты друз. Для этого зернышки и гнойные комочки промывают несколько раз стерильной водопроводной водой, затем помещают на предметное стекло, осторожно раздавливают другим предметным стеклом и получают равномерно распределенные тонким слоем на двух стеклах мазки. Их окрашивают по Граму и Цилю—Нильсену. Если друзы не обнаружены, делают обычные мазки и окрашивают их по Граму. При микроскопии видны пучки из обрывков нитей мицелия или отдельные грамположительные нити.

Применяют также микроскопическое исследование пунктатов, окрашенных по Романовскому—Гимзе или по Паппенгейму.

Метод иммунофлюоресцентной микроскопии позволяет выявлять ядерные элементы актиномицетов.

Бактериологическое исследование. *Выделение культур актиномицетов.* Для освобождения от сопутствующей флоры исследуемый материал асептически вносят в пробирку с 50%-м глицерином и выдерживают при 37 °С в течение 2—3 сут. Для получения аэробных культур (*A. israelii*) материал распределяют на поверхности слабощелочного питательного агара или агара, содержащего 2 % глицерина.

Кроме того, можно использовать среду Сабуро (см. подразд. 5.2), а также среду следующего состава: кукурузного экстракта — 5,0 г, картофельного крахмала — 15,0 г, аминоксульфита — 4,0 г; калия дигидрофосфата — 2,0 г; кальция карбоната — 3,0 г; агар-агара — 20,0 г, дистиллированной воды — 1000 мл (рН 6,8—7,0). Чашки с засеянными средами инкубируют при 37 °С. Рост появляется через 2—4 дня в виде круглых, выпуклых, очень плотных, врастающих в среду колоний.

Анаэробные актиномицеты культивируют путем посева исследуемого материала в пробирку с высоким столбиком расплавленного и охлажденного до 45 °С сахарного агара, который затем тщательно размешивают и охлаждают или засевают другие среды для анаэробов (тиогликолевую, Китта—Тароцци); посеvy помещают в термостат при 30—37 °С. Через 3—5 дней появляются колонии актиномицетов белого или желтого цвета. *A. israelii* и другие акти-

**Дифференциально-диагностические признаки возбудителей
актиномикоза**

Признак	Вид микроорганизмов			
	<i>A. israelii</i>	<i>A. naeslundii</i>	<i>A. odontolyticus</i>	<i>A. viscosus</i>
Анаэробный рост	-	+	+	+
Розовый пигмент на кровяном агаре	-	-	+	-
Гладкие колонии	-	-	+	-
Каталаза	-	-	-	+
Уреаза	-	+	-	-
Раффиноза (кислота)	+	+	-	+
Маннит (кислота)	+	-	-	-
Ксилоза (кислота)	+	-	-	+

номицеты растут медленно, поэтому при отсутствии роста среды продолжают инкубировать до 14 сут.

Из колоний аэробных и анаэробных актиномицетов готовят мазки (материал раздавливают между двумя предметными стеклами), микроскопируют их и пересевают для накопления и идентификации чистой культуры. Актиномицеты дифференцируют по культуральным, биохимическим и антигенным свойствам (табл. 2.21).

Серологическое исследование. Серодиагностика заключается в проведении РСК с актинолизатом. Реакция недостаточно специфична, поскольку положительные результаты могут отмечаться также при раке легкого и тяжелых нагноительных процессах. Применение в качестве антигена вместо актинолизата внеклеточных белков актиномицета повышает чувствительность РСК. Этот антиген можно использовать и при проведении РНГА.

Аллергологическое исследование. Аллергическую пробу проводят с актинолизатом. Диагностическое значение имеют лишь положительные и резкоположительные пробы. При висцеральном, клинически трудно дифференцируемом актиномикозе аллергическая проба часто отрицательна.

2.8. Микобактерии

2.8.1. Туберкулез

Возбудителями туберкулеза у людей и животных являются *Mycobacterium tuberculosis* и *Mycobacterium bovis* — бактерии 3-й группы патогенности. В тропической Африке заболевание могут вызывать *Mycobacterium africanum*, по свойствам близкие к указанным двум видам. Многие микобактерии ранее считались непатогенными для человека, однако в последнее время в связи с распространением ВИЧ-инфекции и других иммунодефицитных состояний возросла роль так называемых *атипичных микобактерий*, вызывающих оппортунистические, в том числе тяжелые, заболевания (см. подразд. 2.8.2). Учитывая общность строения и физиологии возбудителей, диагностика туберкулезных поражений проводится по единой схеме.

Лабораторная диагностика туберкулеза включает обязательные методы (рекомендованные ВОЗ) — бактериоскопический и бактериологический и дополнительные — биологический, серологический и аллергический.

Материалом для исследования, исходя из патогенеза и клинических проявлений, служат: мокрота, слизь с задней стенки глотки, гной, спинномозговая жидкость, кал, промывные воды желудка и бронхов, плевральный экссудат и др. Его собирают в стерильную посуду (мокроту — в специальные баночки, спинномозговую жидкость и другие материалы — в пробирки), которую этикетуют и направляют в специализированные лаборатории вместе с бланком, где указывают Ф. И. О. больного, группу диспансерного учета, диагноз, цель исследования.

Техника безопасности. Ввиду того что возбудители туберкулеза обладают высокой контагиозностью (инфицирующая доза составляет менее 10 клеток) и устойчивостью к действию факторов внешней среды, при работе с материалом, содержащим микобактерии, и чистыми культурами существует опасность лабораторного заражения и распространения возбудителя. Поэтому необходимо выполнять исследование с особой предосторожностью. Пробирки и другую посуду тщательно укупоривают. Все манипуляции, при которых может образоваться аэрозоль, содержащий туберкулезные бактерии (открывание емкостей с материалом и культурами, прожигание бактериологических петель, пипетирование, центрифугирование жидкостей и др.), надо проводить по возможности в ламинарном боксе (при отрицательном давлении), использовать спецодежду и средства защиты органов дыхания (например, респиратор). Поверхности в лаборатории обрабатывают дезинфицирующим раствором и ультрафиолетом. Предпочтительно использовать одноразовые инструменты, петли прокалывать в специаль-

ных аппаратах (инсинерейторах), центрифугировать инфицированный материал на специальном оборудовании с ловушками аэрозоля. Использованные материалы надо обеззараживать на месте, а для обеззараживания воздуха применять бактерицидные фильтры. Персонал лаборатории периодически (не реже 1 раза в год) надо обследовать с помощью пробы Манту для выявления конверсии, указывающей на возможное инфицирование туберкулезными бактериями. К работе в лаборатории не допускаются лица, имеющие признаки иммунодефицита.

Микроскопия. Это исследование входит в обязательный поликлинический и клинический минимум обследования пациента, выделяющего мокроту. Положительный результат может быть получен при концентрации микобактерий туберкулеза в материале не менее 10^3 клеток/мл.

Мокроту выливают в чашку Петри, ставят на черную поверхность стола, выбирают комочки гноя, наносят их на предметное стекло и растирают между двумя стеклами. Спинномозговую жидкость оставляют на холоде. Через 18—24 ч в ней образуется нежная сетка фибрина, которая содержит микобактерии туберкулеза и клеточные элементы. Эту пленку осторожно распределяют на предметном стекле. Мочу центрифугируют и делают мазки из осадка.

Мазки высушивают в пламени и окрашивают по Цилю—Нильсену. Обесцвечивание препарата лучше проводить не 5%-й серной кислотой, а солянокислым спиртом.

Для приготовления 100 мл солянокислого спирта следует взять 3 мл концентрированной соляной кислоты и 97 мл 95%-го этанола.

Микобактерии туберкулеза, окрашенные в ярко-красный (рубиновый) цвет, имеют вид тонких, длинных, слегка изогнутых или коротких прямых палочек; иногда в них обнаруживается зернистость. Микобактерии располагаются поодиночке или неправильными группами (см. цв. вклейку, рис. 3, в). Если микобактерий в материале мало и их не удастся обнаружить в мазках обычным путем, применяют методы обогащения — гомогенизации и флотации.

Метод гомогенизации. Суточное количество мокроты выливают во флакон или банку, добавляют равный объем 1%-го водного раствора гидроксида натрия, плотно закрывают резиновой пробкой и энергично встряхивают до полной гомогенизации (10—15 мин). Мокроту, утратившую вязкость, центрифугируют, надосадочную жидкость сливают в дезинфицирующий раствор, осадок нейтрализуют добавлением 2—3 капель 10%-й соляной или 30%-й уксусной кислоты. Из осадка готовят мазки и окрашивают по Цилю—Нильсену.

Метод флотации. Суточное (иногда 2-суточное) количество мокроты гомогенизируют описанным выше способом. Для того чтобы

в материале не осталось слизистых комочков, флакон с гомогенизированной мокротой помещают на 30 мин в водяную баню при 55 °С. Затем добавляют 1—2 мл ксилола (можно вместо ксилола добавить бензол, бензин, петролейный эфир и т. п.) и встряхивают в течение 10 мин, доводят дистиллированной водой уровень жидкости до горлышка флакона и дают ей 20—30 мин отстояться при комнатной температуре. Капельки ксилола с адсорбированными микобактериями всплывают, образуя сливкообразный слой — *флотационное кольцо*. Материал из флотационного кольца берут петлей в форме улитки или пипеткой и наносят на предметное стекло, помещенное на подогретое до 55 °С над водяной баней стекло. Высохший мазок покрывают новой порцией материала до тех пор, пока на предметное стекло не будет перенесена большая часть флотационного слоя. Препарат промывают эфиром, высушивают, фиксируют и окрашивают по Цилю—Нильсену.

Для микроскопической диагностики туберкулеза широко применяют люминесцентную микроскопию. Фиксированный препарат окрашивают 15 мин аурамин-родамином (при подогревании), затем обесцвечивают 3%-м солянокислым спиртом (погружением на 30 с), при необходимости для погашения фона докрашивают перманганатом калия (KMnO_4) или метиленовым синим, тщательно промывают и микроскопируют в ультрафиолете при увеличении от 250× до 650×. Наблюдают ярко-желтое свечение микобактерий на темном фоне.

При микроскопическом исследовании следует уделить особое внимание осмотру всей площади мазка. Чтобы с уверенностью судить о наличии или отсутствии микобактерий в препарате, следует просмотреть не менее 100 полей зрения.

Бактериоскопический метод позволяет лишь обнаружить кислотоустойчивые микобактерии, поэтому является ориентировочным методом диагностики. Для точной дифференциации микобактерий необходимо применить другие методы, в частности бактериологический.

Бактериологическое исследование. Выделение возбудителя является более эффективным, чем бактериоскопия, и позволяет выявить 20—100 и более микобактерий в 1 мл исследуемого материала, а также определить их устойчивость к лекарственным препаратам, вирулентность, типовую принадлежность и другие важные характеристики. Недостатком метода является длительность исследования — 2—12 нед.

При культивировании микобактерий большое значение имеет гомогенизация, флотация и деконтаминация материала, проводимые с целью повышения концентрации микобактерий и освобождения материала от посторонней микрофлоры и других частиц. Для обработки материала перед его посевом используют раз-

личные вещества, которые обеспечивают его гомогенизацию и концентрацию. При этом они должны обеспечивать сохранение жизнеспособности возбудителей туберкулеза и угнетать рост сопутствующей микрофлоры. Предварительную обработку материала, помещенного в стерильную склянку с бусами, производят кислотами, щелочами, ферментами или детергентами. Наиболее широко используют обработку 10%-м фосфатом натрия, реже применяют 1%-й *N*-ацетил-*L*-цистеин-гидроксид (они лучше обеспечивают жизнеспособность возбудителей туберкулеза). К исследуемому материалу добавляют равный объем фосфата и инкубируют смесь при 37 °С в течение 24 ч, затем нейтрализуют смесь соляной кислотой и центрифугируют. Осадок засевают на элективные питательные среды. Одновременно делают посев необработанного материала на питательные среды для выявления *L*-форм возбудителей туберкулеза и других возможных возбудителей инфекции. При отсутствии контаминации (асептически взятый ливор) можно делать посев необработанного материала на специальные среды для выделения микобактерий. В качестве плотных сред для выделения используют яичную среду Левенштейна — Йенсена, среду Финна II и другие.

Модифицированная среда Левенштейна — Йенсена. Она рекомендована ВОЗ в качестве стандартной среды для первичного выращивания микобактерий туберкулеза и определения их устойчивости к химиопрепаратам. Готовят отдельно 3 составляющих среды:

Минеральный солевой раствор:

калия дигидрофосфат	2,4 г
магния сульфат (7H ₂ O)	0,24 г
магния цитрат	0,6 г
аспарагин	3,6 г
глицерин	12 мл
дистиллированная вода	600 мл

Раствор стерилизуют автоклавированием при 121 °С 30 мин.

2%-й раствор малахитового зеленого (2,0 г малахитового зеленого + 100 мл стерильной дистиллированной воды).

Гомогенизат целых яиц (используют свежие куриные яйца — 20 — 25 шт.).

Все 3 ингредиента асептически смешивают в следующей пропорции:

минеральный солевой раствор	600 мл
раствор малахитового зеленого	20 мл
яичный гомогенизат	1000 мл

Готовую среду разливают в стерильные пробирки или флакончики и проводят коагуляцию при 80 — 85 °С в течение 45 мин.

Для культивирования *M. bovis* в среду вместо глицерина добавляют 0,5 г пирувата натрия.

Среда Финна-II. Готовят отдельно три составляющих среды:

Питательная основа:

магния сульфат (7Н ₂ О)	0,5 г
натрия цитрат	1,0 г
железа аммонийного сульфат (железоаммиачные квасцы)	0,05 г
калия дигидрофосфат	20,0 г
аммония дигидроцитрат	5,0 г
натрия глютамат	10,0 г
глицерин	20 мл
дистиллированная вода	1000 мл

Раствор стерилизуют автоклавированием при 121 °С 20 мин.

2%-й раствор малахитового зеленого (см. выше).

Гомогенизат целых яиц (используют свежие куриные яйца — 40 шт.).

Все 3 ингредиента асептически смешивают в следующей пропорции:

минеральный солевой раствор	1000 мл
раствор малахитового зеленого	33 мл
яичный гомогенизат	1000 мл

Готовую среду разливают в стерильные пробирки или флакончики по 4—5 мл и проводят коагуляцию при 85 °С в течение 30 мин, после чего готовые скошенные среды выдерживают до остывания или до следующих суток при комнатной температуре в свертывателе. Готовые среды хранят в полиэтиленовых пакетах в холодильнике не более 1 мес.

За рубежом для культивирования микобактерий в качестве неселективных широко используют жидкие и плотные среды Мидлбука. В их состав входит глицерин, неорганические вещества, витамины, глюкоза, олеиновая кислота (используется в метаболизме микобактерий), альбумин (защищает микобактерии от действия токсических веществ и является источником протеина), каталаза (защищает от действия токсичных перекисей).

Ни одна из указанных питательных сред не является универсальной для роста возбудителя туберкулеза, поэтому для увеличения результативности бактериологического метода рекомендуются применять посев патологического материала на 2—3 различные питательные среды.

Спинномозговую жидкость, экссудат, гной, кровь наносят пипеткой на питательную среду, не подвергая предварительной обработке, и тщательно втирают петлей, распределяя по всей поверхности среды. Пробирки тщательно укупоривают, а пробки заливают парафином (во избежание высыхания). Посевы помещают в термостат и инкубируют при 37 °С в течение 6—8 нед с еженедельным учетом результата. На среде Левенштейна—Йенсена интенсивный рост микобактерий туберкулеза обычно отмечается на 21—28-й день, иногда позже. Колонии микобактерий туберку-

леза непигментированные морщинистые, суховатые, с неровными краями, возвышаются над поверхностью среды и напоминают бородавки. При отсутствии роста в течение 12 нед результат считается отрицательным.

Выросшие культуры микобактерий микроскопируют (после окраски мазков по Цилю—Нильсену) и проводят их идентификацию по дифференцирующим признакам (табл. 2.22).

При проведении идентификации выделенной чистой культуры учитывают: скорость и температурный оптимум роста на яичных

Таблица 2.22

Дифференциально-диагностические признаки некоторых клинически значимых видов микобактерий

Признак	Медленно растущие микобактерии							Быстро растущие микобактерии
	Возбудители туберкулеза		Нехромогенные			Хромогенные		
	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. ulcerans</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. malmoense</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. fortuitum</i>
Температурный оптимум (°C)	37	37	30	37	37	37	37	28
Форма колоний	R	R	R	S/R	S	S/R	S	R/S
Пигментообразование на свету	-	-	-	-	-	+	-	-
Синтез и накопление ниацина	+	-	-	-	-	-	-	-
Восстановление нитрата	+	-	-	-	-	+	-	+
Термостабильная каталаза (68 °C)	-	-	+	V	V	+	+	+
Гидролиз твина	V	-	-	-	+	+	V	V
Устойчивость к 5 % NaCl	-	-	-	-	-	-	-	+
Пиразинамидаза	+	-	-	+	+	-	V	+
Арилсульфатаза	-	-	-	-	-	-	-	+

средах; образование пигмента (в темноте и на свету); возможность роста на простых питательных средах; активность каталазы и ее термостабильность; способность к накоплению никотиновой кислоты и др.

Из биохимических тестов часто применяют ниациновую пробу Конно, основанную на способности *M. tuberculosis* в отличие от других микобактерий продуцировать ниацин (никотиновую кислоту). Для этого к культуре микобактерий на жидкой питательной среде добавляют 1 мл раствора КСN и 1 мл 5%-го раствора хлорамина Б. При наличии ниацина через несколько минут появляется ярко-желтое окрашивание. Для нейтрализации КСN после учета результатов в пробирки добавляют 3—5 мл 10%-го раствора гидрокарбоната натрия. Для определения ниацина в экстрактах из агаровых культур используют также бумажные индикаторные полоски.

Ускоренный метод бактериологической диагностики туберкулеза (метод микрокультур Прайса). Мокроту, гной, осадок мочи или другой материал наносят толстым слоем на несколько стерильных узких (1 см) предметных стекол. Высушенный препарат берут стерильным пинцетом и погружают на 15 мин в 2%-ю серную кислоту, а затем — в стерильный раствор ИХН для промывания с целью удаления кислоты. После этого препараты помещают во флаконы с цитратной кровью, стараясь полностью погрузить мазок с материалом в среду.

Для приготовления кровяной среды к 10 мл крови кролика или барана добавляют 2 мл 5%-го цитрата натрия, разводят 1:4 дистиллированной водой и разливают в пробирки.

Посевы инкубируют при 37 °С. Через 48—72 ч, 10 и 15 сут извлекают препараты, фиксируют и окрашивают их по Цилю—Нильсену или аураминол. Микроколонии в препарате имеют вид жгутов («кос»), которые образуются под влиянием липидов клеточной стенки микобактерий (корд-фактора); максимальный рост отмечается на 7—10-й день.

Технически данные методы выделения чистых культур трудоемки и небезопасны. В настоящее время полностью автоматизированные системы ВАСТЕС, в которых используются селективные среды и реагенты для флюоресцентного окрашивания микобактерий, что позволяет провести идентификацию микробов, а также определить чувствительность к антибиотикам в течение 3—15 дней (в среднем 4—6 дней). Методика полностью безопасна и позволяет одновременно производить культивирование от 240 до 960 образцов.

Устойчивость микобактерий туберкулеза к лекарственным препаратам определяют методом серийных разведений. Для посева можно использовать как исходный материал, при условии содержания не менее 5 микобактерий в поле зрения (прямой метод),

так и выделенную из него культуру (непрямой метод). ВОЗ рекомендует определять устойчивость микобактерий на среде Левенштейна—Йенсена, добавляя в нее перед свертыванием противотуберкулезные препараты в различной концентрации.

Определять устойчивость микобактерий можно также с использованием жидких сред (после добавления в них лечебных препаратов в соответствующих концентрациях). Выращивание микобактерий туберкулеза и учет проводят подобно методам Прайса и Школьниковой.

Биологическое исследование. В настоящее время это исследование не находит широкого применения в лабораторной диагностике, так как экспериментальные животные не чувствительны к штаммам микобактерий, обладающим устойчивостью к тубазиду, фтивазиду, изониазиду и другим противотуберкулезным препаратам.

Биопробы используют для определения вирулентности выделенных микобактерий туберкулеза, которыми заражают животных с отрицательной пробой Манту: морских свинок (1—2 мл под кожу паха) и кроликов (внутривенно). Перед введением материал обрабатывают (гомогенизируют, концентрируют, обрабатывают серной кислотой, отмывают). Через 2—3 нед зараженную морскую свинку взвешивают, определяют размеры регионарных лимфатических узлов и ставят пробу Манту, которую повторяют через 6 нед. При отрицательных результатах через 4 мес после заражения животное забивают и исследуют гистологические препараты из внутренних органов (печени, селезенки, легких, лимфатических узлов), а также делают посев на питательные среды. О вирулентности штамма судят по количеству специфических изменений в органах (бугорки), продолжительности жизни животного, уменьшению массы его тела и т. д. В отличие от *M. tuberculosis*, патогенной для морских свинок, *M. bovis* патогенна для кроликов, у которых после внутривенного заражения развивается генерализованная инфекция с гибелью животных через 1—2 мес.

Обнаружение возбудителей туберкулеза с помощью бактериоскопического или бактериологического методов, а также биологической пробы свидетельствуют о высокой активности патологического процесса.

Аллергологическое исследование. Аллергическую кожную пробу (внутрикожную пробу Манту с туберкулином) применяют главным образом для определения инфицированности людей микобактериями туберкулеза (см. подразд. 1.5.1). Специальным туберкулиновым шприцем и иглой строго внутрикожно в области средней трети внутренней поверхности плеча вводят 0,1 мл (2 ТЕ) туберкулина (ППД-Л). Результаты учитывают через 24—48—72 ч. Если диаметр инфильтрата на месте введения туберкулина не превышает 1 мм, пробу считают отрицательной. При диаметре инфильтрата 2—5 мм проба сомнительная, более 5 мм — положи-

тельная. Реакция с туберкулином может сопровождаться развитием лимфангита, регионарного лимфаденита, появлением везикул или некроза. Положительная аллергическая реакция на введение туберкулина указывает на инфицированность организма микобактериями туберкулеза, но не является признаком активного процесса (за исключением гиперергических реакций — с диаметром инфильтрата более 17 мм). Отрицательная реакция у взрослых свидетельствует об отсутствии иммунитета к туберкулезу. Как диагностический тест этот метод имеет значение для распознавания туберкулеза в детском возрасте, отбора контингентов, подлежащих ревакцинации против туберкулеза, определения инфицированности населения туберкулезом как эпидемиологического показателя, для оценки эффективности вакцинации и динамики инфекционного процесса в ходе лечения. Широко применявшаяся ранее кожная проба Пирке в настоящее время не используется.

Серологическое исследование. Серодиагностика не входит в комплекс обязательных методов диагностики и имеет вспомогательное значение, косвенно характеризуя активность процесса.

Для диагностики туберкулеза чаще используют РНГА и ИФА. В качестве антигена для РНГА используют эритроциты, сенсibilизированные экстрактом туберкулезных микобактерий или очищенным туберкулином. Диагностическое значение имеет положительная реакция в разведении 1 : 8 и выше. Положительные результаты регистрируются у 70—90 % больных туберкулезом.

В настоящее время разработаны методы экспресс-диагностики туберкулеза, основанные на использовании РИФ с моноклональными видоспецифическими флюоресцирующими сыворотками, а также ПЦР.

ПЦР. Использование ПЦР позволяет быстро выявить *M. tuberculosis* как при туберкулезе органов дыхания, так и при внелегочных формах (туберкулезный менингит, туберкулез кожи, кишечника и др.), в том числе у больных СПИДом. При высокой чувствительности метода (10—1000 клеток в пробе) имеется возможность быстро выявлять штаммы *M. tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью. Методом ПЦР контролируют также эффективность лечения больных туберкулезом. При использовании нескольких образцов исследуемого материала от каждого пациента чувствительность ПЦР достигает 100 %, специфичность — 99,8—100 %, что значительно выше, чем у других методов диагностики.

2.8.2. Язва Бурули и другие микобактериозы

Возбудителями микобактериозов являются условно-патогенные представители рода *Mycobacterium*, относимые к медленно или быстро растущим, нехромогенным, фото- или скотохромогенным:

M. avium, *M. kansasii*, *M. ulcerans*, *M. marinum*, *M. malmoense*, *M. scrofulaceum*, *M. fortuitum* и др. Они могут вызывать местные и генерализованные туберкулезоподобные процессы, протекающие по типу оппортунистической инфекции. Частота выделения и этиологическое значение указанных микобактерий зависит от их распространенности и состояния антиинфекционной защиты макроорганизма. Среди клинических форм могут быть: легочные поражения (*M. avium*, *M. kansasii* и др.), поражения кожи и подкожной клетчатки (язва Бурули, вызываемая *M. ulcerans*), инфицирование ран (*M. marinum* и др.), поражение лимфатических узлов, костей и суставов, почек, а также системные инфекции (особенно тяжело протекающие на фоне СПИДа и других иммунодефицитных состояний).

Для исследования берут мокроту, промывные воды бронхов, пунктаты (биоптаты) лимфоузлов и других тканей, гной или грануляционную ткань дна язвы, кровь, мочу или другой материал, в зависимости от клинических проявлений заболевания. Материал из язвы лучше брать кюреткой, чем тампоном. Ввиду того что клинически микобактериозы напоминают туберкулезный процесс, а их возбудители имеют сходство с микобактериями туберкулеза, исследование проводится по той же схеме (см. выше).

Микроскопия. Это исследование позволяет ориентировочно судить о присутствии в материале возбудителя: готовят мазки, окрашивают по Цилю—Нильсену и по Граму. Возбудители микобактериозов грамположительны. В окрашенных по Цилю—Нильсену мазках видны рубиново-красные палочки, расположенные поодиночке, группами (параллельно друг другу), в виде четок (*M. ulcerans*) или беспорядочно расположенные (*M. scrofulaceum*, *M. marinum*), тонкие слабо ветвящиеся (*M. avium*).

Бактериологическое исследование. Для получения чистой культуры исследуемый материал засевают на среду Левенштейна—Йенсена и другие среды для выделения микобактерий, культивируют аэробно при оптимальной температуре (например, выращивают при 30—32 °С). В зависимости от видовой принадлежности рост на плотных средах может появляться: у быстрорастущих — через 1 нед, у медленнорастущих — через 2 недели и более (при язве Бурули, например, через 8—12 нед). Скотохромогенные микобактерии в темноте или на свету (фотохромогенные — только на свету) образуют каратиноидные пигменты (желтые, оранжевые), нехромогенные образуют неокрашенные или бежевые колонии. Они могут быть разных размеров, в S- или R-форме. Материал из колоний микроскопируют и пересевают для накопления чистой культуры.

Выделенную чистую культуру идентифицируют по морфологическим, тинкториальным, культуральным свойствам, ферментативной активности и антигенной структуре (см. табл. 2.22).

Серологическая диагностика микобактериозов не разработана.

Наряду с клиническими проявлениями в диагностике заболеваний надо учитывать состояние антиинфекционной резистентности больного, данные о пребывании его в эндемичных зонах (например, при язве Бурули — в Уганде, Нигерии, Заире и других странах с жарким климатом). Кроме того, у возбудителей микобактериозов возможны перекрестные реакции с микобактериями туберкулеза. Так, у *M. kansasii* и *M. tuberculosis* имеются общие антигены, а у инфицированных *M. kansasii* лиц отмечают положительную реакцию Манту.

2.8.3. Лепра

Возбудитель лепры — хронической генерализованной инфекционной болезни с преимущественным поражением кожи, слизистых оболочек и периферической нервной системы — *Mycobacterium leprae* (микроорганизмы 3-й группы патогенности). Эта низко контагиозная инфекция распространена в виде небольших очагов, в основном в странах третьего мира, что связано с социально-экономическими факторами. Характер инфекции зависит от генетической и иммунологической предрасположенности.

Микроскопия. Это исследование является основным методом диагностики лепры. При поражении кожи исследуют соскоб с ее уплотненных участков (предварительно срезают бритвой эпидермис), при поражении легких — мокроту, при любых других формах — соскоб со слизистой оболочки перегородки носа, исследуют также пунктаты лимфоузлов. С этой целью в нос глубоко вводят металлическую ложечку и соскабливают слизистую оболочку до появления капли крови. Мазки окрашивают по Цилю — Нильсену, однако, учитывая менее выраженную кислотоустойчивость возбудителя лепры, обесцвечивают его 0,5%-м раствором серной кислоты. Применяют также окраску по методу Семеновича — Марциновского.

Микобактерии лепры располагаются внутри клеток, заполняя их. Цитоплазма и ядро этих клеток оттеснены к периферии. В пораженных тканях находится также большое количество микобактерий, расположенных внеклеточно. Группируются они в виде пачек сигар, что позволяет дифференцировать их с туберкулезными микобактериями, морфологически и тинкториально сходными с ними. При посеве лепрозного материала на питательные среды, используемые для культивирования туберкулезных микобактерий, роста не наблюдается.

Морские свинки и кролики нечувствительны к возбудителям лепры. Воспроизведена экспериментальная лепрозная инфекция на армадиллах (броненосцах) с образованием типичных множественных узелков (лепром) в тканях и органах.

Окончательную роль в диагностике заболевания имеет гистологическое исследование биоптатов кожи и слизистых оболочек, которые позволяют выявить не только *M. leprae*, но и определить структуру гранулем. Для этого биопсийный материал направляют для исследования в специализированные лаборатории по изучению лепры.

Как и при других заболеваниях, вызванных некультивируемыми на искусственных питательных средах микробами, для выявления специфических нуклеотидных последовательностей с целью диагностики лепры применяется ПЦР.

Серологическое исследование. Серодиагностика имеет вспомогательное значение и основана на обнаружении в ИФА антител к видоспецифическому фенольному гликолипидному антигену (ФГЛА) *M. leprae*. Это особенно важно при активном выявлении больных, в том числе с субклиническими формами заболевания.

Аллергологическое исследование. Аллергическая проба с *лепромином* — реакция Мицуды — используется для определения реактивности организма больного. Взвесь (0,1 мл) убитых кипячением микобактерий лепры, взятых из лепромы, вводят внутрикожно в область предплечья. Через 3 нед у здоровых и у больных туберкулоидной лепрой на этом месте образуется воспалительный инфильтрат, который может изъязвляться.

В настоящее время для постановки лепроминовой пробы используют лепромин А, полученный из тканей зараженных броненосцев. Пробы свидетельствуют лишь о способности макроорганизма отвечать на лепромин.

Вспомогательное значение имеет также постановка РБТЛ с ФГЛА.

2.9. Аэробные и микроаэрофильные подвижные спиральные и изогнутые грамотрицательные бактерии

2.9.1. Кампилобактериоз

В группу заболеваний, обозначаемых как кампилобактериоз, входят кишечные инфекции с тенденцией к генерализации и выраженными токсико-аллергическими осложнениями (основные возбудители — *Campylobacter jejuni* и *Campylobacter coli* — бактерии 3-й группы патогенности), а также оппортунистические, часто генерализованные, инфекции различной локализации и тяжести, вызываемые преимущественно *Campylobacter fetus*.

Материалом для исследования в зависимости от характера заболевания являются испражнения, гной, ликвор, кровь, рвотные массы и др. Ввиду нестойкости возбудителя во внешней среде материал сразу после взятия помещают в транспортную среду Кэри —

Блэра, тиогликолевую или другую специальную среду. Доставка материала в лабораторию должна проводиться в герметичной упаковке и в короткие сроки.

Среда Кэри — Блэра. Состав (г/л): натрия гидрофосфата — 1,1; натрия тиогликолята — 1,5; кальция хлорида — 0,09; натрия хлорида и агар-агара — по 5,0. Хлорид кальция асептически добавляют в прокипяченную и остуженную среду (конечное значение рН $8,4 \pm 0,2$). После приготовления среду помещают в герметично закрывающиеся пробирки или флакончики. В этой среде минимум питательных веществ, чтобы сохранить максимальное количество живых бактерий без размножения. Тиогликолят натрия введен в состав среды для создания низкого окислительно-восстановительного потенциала. Среда имеет слабощелочное значение рН, что минимизирует гибель бактериальных клеток вследствие закисления среды. Вместе с тем жизнеспособность на этой среде прихотливых микроорганизмов сохраняется лишь непродолжительное время. Для получения наилучших результатов рекомендуется наряду с посевом на транспортную среду делать прямой посев на среду обогащения.

Микроскопия. В мазках из патологического материала, окрашенных по Граму (вместо сафранина используют фуксин), кампилобактеры представляют собой грамтрицательные изогнутые, S-образные или извитые палочки размером $0,2—0,9 \times 0,5—5,0$ мкм. Ввиду их характерной морфологии микроскопическое исследование считается весьма информативным (его чувствительность при остром кампилобактериозном энтерите составляет 66—94 %).

Бактериологическое исследование. Для выделения чистых культур материал засевают на селективные плотные среды (с кровью, факторами роста и антибиотиками) или используют для выделения метод фильтрации (см. ниже). Параллельно с прямым посевом на плотные среды материал засевают на среду обогащения (например, Бруцелла-бульон, содержащий пептоны, дрожжевой экстракт, глюкозу и в качестве редуцента гидросульфит натрия).

В качестве селективных сред могут быть использованы кровяные среды на основе агара для бруцелл (среды Скирроу, Престона, среда на основе эритрит-агара). Добавляемая в них баранья кровь служит источником гема и других факторов роста, а селективность им придают введенные антибиотики: триметоприм, ванкомицин, амфотерицин В, полимиксин В и цефалотин. На таких средах не вырастают многие грамтрицательные и грамположительные представители нормальной микрофлоры: энтеробактерии, псевдомонады, стафилококки, энтерококки, грибы. В состав некоторых сред для подавления грибов вместо амфотерицина В вводят циклогексимид. Следует учитывать, что цефалоспорины могут подавлять рост некоторых кампилобактеров, в частности *Campylobacter fetus* подвида *fetus*. Для выделения чистых культур из крови и других неконтаминированных сопутствующей микрофлорой материалов используют неселективные среды.

Важным условием получения чистых культур кампилобактеров является создание микроаэрофильных условий. Для этого обычно используют специальные газогенераторные пакеты, которые помещают вместе с посевами в герметично закрывающиеся емкости (см. подразд. 1.2.4).

Оптимальными условиями считают создание атмосферы из азота, углекислого газа и кислорода при соотношении 85 : 10 : 5, которое можно получить при использовании стационарных анаэро-статов. Применение метода «зажженной свечи» не рекомендуется, так как в эксикаторе остается значительное количество кислорода. Посевы инкубируют при 42 °С, что способствует росту основных возбудителей кампилобактериоза (кроме *Campylobacter fetus*, который выделяют при 37 °С).

Метод фильтрации основан на способности подвижных кампилобактеров активно проходить через мембранные фильтры с порами диаметром 0,45—0,65 мкм. Преимуществом метода является возможность использования неселективных сред (например, применяют кровяной агар). Фильтр укладывают на поверхность плотной среды в чашке, наносят на него 10—15 капель суспензии фекалий и инкубируют чашку при 37 °С в течение 1 ч, после чего фильтр осторожно снимают, а чашку продолжают инкубировать в микроаэрофильных условиях. Проникшие через фильтр клетки кампилобактеров образуют на поверхности среды колонии. Чувствительность метода невысока (около 10⁵ КОЕ/мл), поэтому его рекомендуют сочетать с посевом на селективные среды или другими методами исследования.

Колонии кампилобактеров вырастают через 48—96 ч. Их вид зависит, в частности, от среды, использованной для выделения. Обычно это серые плоские колонии с неровным краем, сливающиеся по ходу штрихов (на свежеприготовленных средах). На более сухих средах колонии выпуклые, блестящие, округлые, без выраженной тенденции к распространению; гемолиз отсутствует.

Выделенные культуры идентифицируют по морфологии (в мазках, окрашенных по Граму), характерной «винтообразной» подвижности (при темнопольной или фазово-контрастной микроскопии), биохимическим свойствам и чувствительности к антибиотикам (табл. 2.23).

Важным отличительным признаком *S. jejuni* является гидролиз гиппурата натрия. Для проведения теста в 0,4 мл 1%-го водного раствора гиппурата суспензируют полную петлю испытуемой культуры и инкубируют взвесь в течение 2 ч при 37 °С, затем к ней добавляют 0,2 мл 3,5%-го раствора нингидрина в ацетон-бутаноловой смеси. При положительном результате через 10 мин инкубирования в тех же условиях появляется пурпурное окрашивание взвеси. В обычных исследованиях, если культура, выросшая при 42 °С на селективной среде, имеет типичную морфологию, окси-

**Дифференциальные признаки некоторых кампилобактеров
и хеликобактеров**

Вид микро- организмов	Признак								
	Устойчи- вость к антибио- тикам		Каталаза	Гидролиз гиппурата натрия	Нитратредуктаза	Уреаза	Рост на питательных средах		
	налиндиксоковой кислоте	цефалотину					при 42 °С	при 25 °С	в присутствии 1%-го глицина
<i>Campylobacter jejuni</i>	V	+	+	+	+	-	+	-	+
<i>Campylobacter coli</i>	-	+	+	-	+	-	+	-	+
<i>Campylobacter fetus</i>	V	-	+	-	+	-	-	+	+
<i>Campylobacter lari</i>	+	+	+	-	+	V	+	-	+
<i>Helicobacter pylori</i>	+	+	+	-	-	+	-	-	-
<i>Helicobacter bizzozeronii</i>	+	+	+	-	+	+	+	-	-

дазоположительна и гидролизует гиппурат, ее можно отнести к виду *C. jejuni* (дополнительные тесты не требуются).

Для проведения нитратного теста культуру засевают в нитратный бульон Барретта или полужидкую среду Мюллера — Хинтона с 0,2 % нитрата калия и инкубируют в оптимальных условиях. При положительном результате после добавления в пробирку тест-реактива (сульфоновая кислота + нафтиламин) развивается красное окрашивание.

Для прямого обнаружения НК возбудителей кампилобактериоза предложено использовать ПЦР, однако на практике ее проведение осложняется отсутствием простой и эффективной методики подготовки образцов фекалий, позволяющей избежать отрицательное влияние содержащихся в пробе ингибиторов.

Серологические исследования при кампилобактериозе проводить не рекомендуют ввиду перекрестных реакций с легионеллами и другими микроорганизмами.

2.9.2. Хеликобактериоз

Возбудителем хеликобактериоза — хронической инфекции желудка и 12-перстной кишки — является *Helicobacter pylori*. Несмотря на выявленный у них обширный арсенал факторов патогенности и постоянное обнаружение этих бактерий у больных хроническими гастритами, язвой желудка и 12-перстной кишки, не все исследователи склонны относить *Helicobacter pylori* к безусловно-патогенным микроорганизмам.

Для подтверждения этиологической роли хеликобактеров при гастродуоденальной патологии используют широкий спектр методов: микроскопию, бактериологический метод, патогистологическое исследование, серологический метод, биохимические и молекулярно-генетические исследования. Основным считают выделение и идентификацию возбудителя.

Материалом для исследования являются биоптаты слизистой оболочки из очагов поражения, желудочный сок, секционный и резекционный материал (слизистая оболочка тела, антрального и пилорического отделов желудка, луковицы 12-перстной кишки), реже материал из полости рта (зубной налет, материал у воспаленных десен), а также выдыхаемый воздух. Следует отметить, что материал для посева отбирают в строго асептических условиях. Жизнеспособность этих бактерий может подавляться, например, глютаровым альдегидом, который используют для антисептической обработки эндоскопических приборов и инструментов. Ввиду неравномерности распределения бактерий в слизистой оболочке рекомендуется исследовать 2—4 биоптата из разных участков.

Если исследование не проводится сразу, материал помещают в транспортные среды (те же, что и для кампилобактеров); при непродолжительном хранении (до 4 ч) его можно поместить в ИХН при 4 °С.

Микроскопия. Биопсийный материал используют для приготовления гистологических формализированных препаратов,

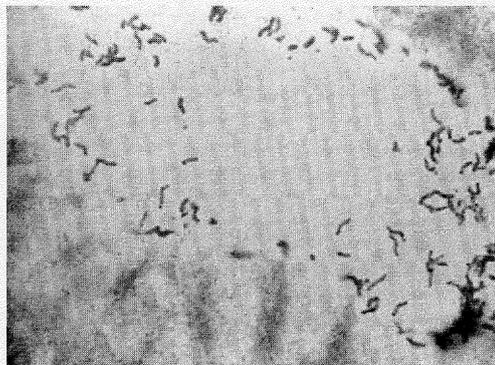


Рис. 2.5. Хеликобактеры в биоптате слизистой оболочки желудка

которые окрашивают, как обычно, гематоксилин-эозином или специальными методами (по Гимзе, Уртину—Старри и др.). В препаратах слизистой оболочки хеликобактеры имеют вид характерных спиралевидных бактерий (рис. 2.5). Они располагаются в просвете желез, вблизи собственной пластинки, на поверхности эпителиоцитов; нередко отмечается лимфоцитарная инфильтрация, а при обострении процесса — значительное количество нейтрофилов. При хроническом атрофическом гастрите признаки воспаления могут отсутствовать.

Бактериологическое исследование. Для выделения чистых культур материал засевают на селективные плотные среды с кровью и антибиотиками (как и при диагностике кампилобактериоза). Для инактивации образующихся в процессе роста ингибиторов в среды иногда добавляют активированный уголь, крахмал, сыворотки. Обычно посев ведут одновременно на селективную и неселективную среду, чтобы не «пропустить» антибиотикочувствительные штаммы. Наиболее подходящими неселективными средами являются агары для бруцелл с 5—7 % лошадиной крови. Для придания селективности в состав сред обычно вводят три антибиотика: ванкомицин, амфотерицин В (по 10 мкг/мл) и цефсулодин или триметоприм (5 мкг/мл). Посевы инкубируют до 7 сут при 37 °С в атмосфере, содержащей 5 % кислорода и 10 % углекислого газа. Для этого используют анаэробные контейнеры с газогенераторными пакетами (метод «зажженной свечи» не рекомендуется, так как концентрация кислорода при этом остается выше 15 %).

Для выделения хеликобактеров также используют метод фильтрации (см. подразд. 2.9.1).

Колонии хеликобактеров на кровяных средах варьируют от мелких серых прозрачных до крупных распространяющихся по среде. В мазках из колоний обнаруживают слегка изогнутые или прямые, реже, типичные грамотрицательные спирально изогнутые бактерии (рис. 2.6).

При темнопольной или фазово-контрастной микроскопии выявляют характерную подвижность клеток возбудителя. Кроме морфологических признаков, для идентификации возбудителя проводят биохимические и другие тесты (см. табл. 2.23).

Для возбудителя хеликобактериоза характерным является наличие уреазы. Ее определяют у чистых культур или непосредственно в исследуемом материале (биоптате). Для этого их по-

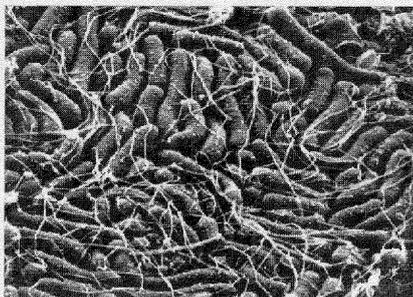


Рис. 2.6. Хеликобактеры в чистой культуре (колония)

мешают в мочевиный бульон по Кристенсену (или подобную среду) и инкубируют от 15 мин до 24 ч. В случае уреазной активности происходит щелочение среды образующимся аммиаком и соответствующее изменение цвета индикатора в среде.

В отличие от возбудителя кампилобактериоза (*C. jejuni*) хеликобактеры не гидролизуют гиппурат натрия.

Серологическое исследование. Наиболее приемлемым исследованием для подтверждения хеликобактерной инфекции является ИФА на специфические *IgG*, которые чаще определяются, более длительно персистируют у больных и являются показателем активности патологического процесса. Из других методов исследования иногда применяют РП, РНГА, РСК.

Экспресс-диагностика. В качестве экспресс-методов диагностики применяют *прямой метод РИФ* (наблюдают специфическое свечение хеликобактеров в препаратах слизистой оболочки) и *аэротест*. Последний представляет собой химическое исследование выдыхаемого воздуха на содержание аммиака — продукта расщепления мочевины хеликобактерами. Для этого в течение 15 мин прокачивают 2 л воздуха из ротовой полости через индикаторную трубку специального прибора и определяют величину окрашенного столбика в трубке, что соответствует концентрации аммиака в пробе. Диагностически значимой считается концентрация аммиака более 1 мг/м³.

Для быстрого обнаружения возбудителя в материале применяют также ПЦР, но это исследование редко проводится ввиду высокой стоимости и отсутствия явных преимуществ по сравнению с другими методами диагностики.

2.10. Спирохеты

2.10.1. Сифилис и другие трепонематозы

Трепонемы, несмотря на выраженное сходство в морфологии, физиологии, антигенной структуре и генотипе (гомология ДНК не менее 95 %), вызывают у человека ряд заболеваний, отличающихся по распространению и клиническим проявлениям (табл. 2.24). Эти особенности необходимо учитывать при дифференциальной диагностике заболеваний (их возбудителей относят к 3-й группе патогенности).

Сифилис — хроническое заболевание с поражением кожи, внутренних органов и центральной нервной системы. *Фрамбезия* (син. тропический, невенерический сифилис, *yaws, pian, boubas, parangi, patek, dube, gatto kegesi, tombar*) — хронический рецидивирующий генерализованный трепонематоз с поражением кожи, слизистых оболочек, лимфоузлов, костей и суставов; внутренние орга-

Возбудители трепонематозов человека

Вид (подвид) микро- организмов	Характер заболевания				
	Заболе- вание	Географи- ческое распростра- нение	Возраст больных	Путь заражения	Врожден- ные формы
<i>Treponema pallidum (pallidum)</i>	Сифилис	Повсеместно	Взрослые, подростки	Половой	Да
<i>Treponema pallidum (pertenuis)</i>	Фрамбезия	Тропики: Африка, Ю. Америка, Карибский бассейн, Индонезия	Дети	Контакт с кожей	Нет
<i>Treponema pallidum (endemicum)</i>	Беджель	Пустыни: Сев. Африка, Ближний Восток	Дети, подростки, взрослые	Контакт со слизистыми оболочками	Редко
<i>Treponema carateum</i>	Пинта	Полупустыни с теплым климатом: Сев. Америка	Дети, подростки	Контакт с кожей	Нет

ны не поражаются. Беджель (син. *эндемичный, арабский сифилис, невенерический детский сифилис, dichuchwa*) — хронический генерализованный трепонематоз, характеризующийся поражением кожи и слизистой оболочки ротоглотки, а также лимфулов, костей и суставов; внутренние органы не поражаются. *Пинта* (син. карате, *mal del pinto, carate, azul, boussarole*) — хронический трепонематоз, характеризующийся поражением кожи в виде нарушения пигментации и гиперкератоза; редко присоединяется полиаденит, поражения внутренних органов, костей, нервной системы. Ввиду сходства возбудителей и патогенеза заболеваний методы лабораторной диагностики трепонематозов жарких стран те же, что при сифилисе.

Методы микробиологической диагностики сифилиса обусловлены патогенезом заболевания. Ввиду отсутствия доступных методов культивирования выделение возбудителя в лабораториях практического здравоохранения не проводят. В первичной стадии болезни (реже при вторичном и третичном сифилисе) и при врожден-

ном сифилисе проводится бактериоскопическое исследование, во вторичном и третичном периодах применяют главным образом серологические исследования (основной метод диагностики).

Микроскопия. Наиболее часто проводят темнопольную микроскопию. Перед взятием материала обследуемый не должен получать antimicrobial препараты или использовать антисептики. У больного непосредственно перед исследованием берут тканевую жидкость, полученную со дна язвы (твердого шанкра), или пунктат регионарных лимфатических узлов. Желательно брать материал, не содержащий эритроцитов, посторонних клеток и детрита. Перед взятием материала поверхность шанкра протирают стерильным ватным тампоном, смоченным ИХН. Затем дно язвы слегка раздражают лопаточкой или скальпелем, выжимают тканевую жидкость пальцами в резиновой перчатке, собирают ее в капилляр пастеровской пипетки и немедленно готовят препарат раздавленной капли для исследования в темном поле. При врожденном сифилисе исследуют материал пуповины, плаценты, отделяемое из носа или кожных поражений ребенка.

В случае положительного результата в материале обнаруживают трепонемы с равномерными 8—12 крутыми завитками (см. [цв. вклейку, рис. 22](#)). Для них характерны плавные вращательно-поступательные (штопорообразные), а также маятникообразные и гибательные движения. Непатогенные трепонемы (*Treponema refringens* и др.), которые могут находиться в материале, взятом со слизистой оболочки наружных половых органов, морфологически отличаются от патогенных трепонем (по толщине, неравномерности завитков и их амплитуде) и, кроме того, они не делают гибательных движений. Если шанкр расположен на слизистой оболочке полости рта, дифференциация бледных трепонем с другими трепонемами, обитающими полости рта (например, *Treponema microdentium*), представляет значительные трудности, поэтому проводят темнопольную микроскопию материала из полости рта не рекомендуют. В этом случае исследуют пунктат регионарных лимфатических узлов. Обнаружение в нем типичных трепонем подтверждает диагноз сифилиса.

Изучают также препараты, окрашенные по Романовскому—Гимзе. После фиксации (3—4 мин в 4%-м формалине после 2—3-часового высушивания) мазки окрашивают в течение 2—4 ч или трижды подогревают краситель до появления паров, заменяя его через каждую минуту новой порцией, последнюю порцию красителя выдерживают в течение 5 мин. Окрашенные препараты промывают водой и высушивают на воздухе. *T. pallidum* окрашивается в бледно-розовый цвет, *T. refringens* и другие трепонемы — в красновато-фиолетовый. В отличие от бледной трепонемы *T. refringens* окрашиваются фуксином в красный цвет. При окраске методом серебрения по Морозову *T. pallidum* окрашиваются в черный или

темно-коричневый цвет. В негативных препаратах по Бурри хорошо видны форма трепонем и их завитки (на черном или другом темном фоне).

При вторичном и третичном сифилисе такими же способами исследуют материал, взятый из очагов поражения на коже.

Для экспресс-диагностики применяют прямую РИФ. Для этого мазок из материала фиксируют 10 мин в ацетоне, затем обрабатывают мечеными ФИТЦ антителами к *T. pallidum* (используют заведомо положительную сыворотку больных сифилисом людей или зараженных кроликов, адсорбированные для удаления перекрестно-реагирующих антител взвесью трепонем штамма Рейтера, или моноклональные антитела к АГ *T. pallidum*). Так же ставят РИФ с биопсийным или аутопсийным материалом, но предварительно его фиксируют 24 ч в 10%-м нейтральном формалине, заключают в парафин и готовят гистологические срезы. При люминесцентной микроскопии в материале отмечают специфическое свечение типичных по морфологии трепонем.

Серологическое исследование. Для серологической диагностики сифилиса используют две группы тестов: неспецифические (без участия антигенов трепонем) и специфические. К *первой* группе относятся тесты с кардиолипиновыми антигенами: РСК (реакция Вассермана) и часто используемые для скрининговых исследований и экспресс-диагностики тесты микропреципитации с плазмой и сывороткой (за рубежом применяют их аналоги: тест на реакины плазмы (*RPR* или *TRUST*) и реакция флоккуляции на стекле — *VDRL* или *USR*). Ко *второй* группе относятся: РИБТ (реакция иммобилизации), непрямая РИФ (иммунофлюоресцентная микроскопия с сывороткой обследуемого), ИФА, РНГА (зарубежный аналог — *MHA-TP*, реакция микрогемагглютинации). Неспецифические тесты основаны на выявлении антител к липопротеиновым и другим липоидным антигенам, которые освобождаются в результате повреждения клеток макроорганизма и (вероятно) трепонем.

Неспецифические тесты отличаются низкой чувствительностью в начале и на поздних стадиях заболевания; специфические имеют низкую чувствительность в начале, но с переходом заболевания в серопозитивную стадию и в дальнейшем они отличаются высокой чувствительностью (около 100 %). Неспецифические тесты дают возможность поставить предварительный, а специфические — окончательный серологический диагноз сифилиса. Серодиагностика является практически единственным методом лабораторного подтверждения позднего и латентно протекающего сифилиса.

Для проведения *реакции Вассермана* используют сыворотку крови больного и спинномозговую жидкость (при поражении нервной системы на стадии нейросифилиса).

Методика реакции Вассермана не отличается от техники постановки РСК (см. табл. 1.7). Реакцию ставят с готовыми антигенами: специфическим (трепонемным) и неспецифическим (кардиолипидным). Специфический антиген получают из разрушенных ультразвуком трепонем Рейтера, выращенных в культуре, неспецифический представляет собой экстракт липидных фракций из бычьего сердца.

Перед проведением опыта антигены смешивают с ИХН, соблюдая правила, изложенные в инструкции. Все остальные ингредиенты реакции готовят так же, как и для РСК.

В качестве контроля используют заведомо положительную (большого сифилисом) и отрицательную (здорового человека) сыворотки.

Спинномозговую жидкость для реакции Вассермана не инактивируют, так как она не содержит комплемента. В опыт вводят неразведенную спинномозговую жидкость, а также разведенную в ИХН (1 : 1 и 1 : 5). Поскольку спинномозговая жидкость не обладает антикомплементарными свойствами, комплемент добавляют в количестве, соответствующем его титру.

Для проведения *тестов микропреципитации* (флоккуляции) плазму крови или непрогретую сыворотку крови смешивают с неспецифическим липидным антигеном в течение нескольких минут на предметном стекле или специальной подложке. При положительной реакции под малым увеличением микроскопа становятся видимыми укрупненные частицы антигена (флоккулят). В случае использования окрашенного антигена (тесты *RPR*, *TRUST*) или частиц угля, «нагруженных» кардиолипидным антигеном (вариант непрямоy PA), результат виден невооруженным глазом. Неспецифические тесты становятся положительными обычно через 1—4 нед после появления твердого шанкра. Использование сыворотки или плазмы крови в различных разведениях позволяет определить титр реакции, по которому можно судить о ее специфичности (при сифилисе титр обычно не менее чем 1 : 8), об эффективности лечения, стадии заболевания и т. п.

При оценке полученных результатов следует учитывать, что тесты с кардиолипидными антигенами могут быть положительными не только в результате накопления антилипоидных антител при сифилисе, но и при других трепонематозах, а также при аутоиммунных заболеваниях (например, системной красной волчанке), беременности, ряде острых и хронических состояний, сопровождающихся повреждением тканей (при вирусных, онкологических заболеваниях, лепре, у наркоманов). В этой связи для окончательного подтверждения диагноза ставят высокочувствительные специфические реакции.

Методика постановки РИБТ. Готовят специальный антиген — взвесь живых трепонем из тестикулярной ткани кролика, зараженного лабораторным штаммом *T. pallidum* (Никольса). Антиген считают пригодным,

если при микроскопии обнаруживают более 50 подвижных трепонем. Кровь (или ликвор) у больных берут асептически. Нельзя проводить реакцию, если больной менее чем за 3 нед до исследования получал антибиотики или другие противосифилитические препараты.

Для проведения реакции смешивают в пробирке 0,05 мл сыворотки крови, 0,3 мл антигена и 0,2 мл комплемента. Опыт сопровождается контролем сыворотки, антигена и комплемента. Пробирки помещают в анаэробный стат, который после создания вакуума заполняют смесью азота и углекислого газа, и выдерживают при 35 °С. Через 18 ч из содержимого каждой пробирки делают препараты раздавленной капли, насчитывают 25 трепонем и определяют, сколько из них подвижных и иммобилизованных. Процент иммобилизации трепонем вычисляют по формуле

$$\frac{(A - B)100}{A},$$

где A — количество подвижных трепонем в контроле; B — количество подвижных особей в опыте.

При иммобилизации от 0 до 20 % трепонем реакцию считают отрицательной, от 21 до 50 % — слабо положительной, от 51 до 100 % — положительной. При наличии у больного сифилиса в первом препарате отмечается иммобилизация трепонем, а в контрольных они остаются подвижными. Эта реакция отличается высокой специфичностью и чувствительностью, причем как с сывороткой больного, так и со спинномозговой жидкостью, особенно при врожденном, висцеральном сифилисе и сифилисе нервной системы.

Методика постановки непрямой РИФ. На предметное стекло наносят АГ — бледные трепонемы (штамм Никольса), полученные из тестикулярной ткани зараженного кролика в таком количестве, чтобы в поле зрения попадало 50—60 микроорганизмов. Мазки высушивают на воздухе и фиксируют в ацетоне в течение 5 мин. Сыворотку больного истощают взвесью непатогенных трепонем штамма Рейтера (по типу реакции Кастеллани) или разводят 1 : 200 (для предотвращения перекрестных реакций), затем наносят ее на приготовленные препараты, которые выдерживают во влажной камере при 35 °С в течение 30 мин (1-я фаза). Затем мазки промывают в течение 10 мин в забуференном ИХН и высушивают на воздухе. После этого на препарат наносят каплю флуоресцирующей сыворотки против глобулинов человека и инкубируют во влажной камере при комнатной температуре в течение 30 мин (2-я фаза). Мазки промывают в двух порциях забуференного ИХН, высушивают и просматривают в люминесцентном микроскопе, отмечая наличие и яркость специфического желто-зеленого свечения трепонем (см. цв. вклейку, рис. 23).

Методы ИФА или РНГА при сифилисе не имеют особенностей по сравнению с диагностикой других инфекций. Преимуществом ИФА является возможность дифференциации классов антитрепонемных иммуноглобулинов, выявляемых в исследуемой сыворотке крови.

Показано, что в этих случаях с использованием различных праймеров в ликворе пациентов удастся обнаружить даже очень небольшие количества генома трепонем (чувствительность — 100—130 клеток/мл). Специфичность метода составила 96,7 %.

2.10.2. Лептоспироз

Лептоспироз — острое инфекционное зоонозное заболевание с преимущественным поражением почек, печени, нервной системы и органов кровообращения. Возбудитель лептоспироза — *Leptospira interrogans* — относят к микроорганизмам 3-й группы патогенности.

Для лабораторной диагностики заболевания применяют бактериоскопический, бактериологический, биологический и серологический методы исследования.

От больного берут кровь, мочу, спинномозговую жидкость. В зависимости от эпидемиологических показаний дополнительно исследуют воду, пищевые продукты, материал животных.

Микроскопия. На первой неделе лептоспиры можно обнаружить в крови, а позже — в моче, спинномозговой жидкости, паренхиматозных органах.

Из вены берут 2—3 мл крови и смешивают ее с 2—3 мл 2%-го цитрата натрия. Полученную после центрифугирования плазму удаляют и микроскопируют осадок.

Мочу, спинномозговую жидкость изучают непосредственно после взятия, их осадок исследуют после центрифугирования в течение 30 мин при 10 000 об/мин. Секционный материал гомогенизируют, готовят 10%-ю суспензию, которую центрифугируют 15 мин при 2000 об/мин, отбирают надосадочную жидкость и далее ведут исследование, как при обнаружении лептоспир в моче.

Ввиду плохого окрашивания лептоспиры изучают в основном в нативных препаратах. Подготовленный исследуемый материал наносят на тонкое предметное стекло (не толще 1 мм) и накрывают покровным стеклом (не толще 0,2 мм). Полученный препарат раздавленной капли изучают в темнопольном микроскопе с объективами «сухой» системы. При микроскопии обнаруживают подвижные тонкие нити лептоспир с характерными изгибами на концах (вторичные завитки), придаю-

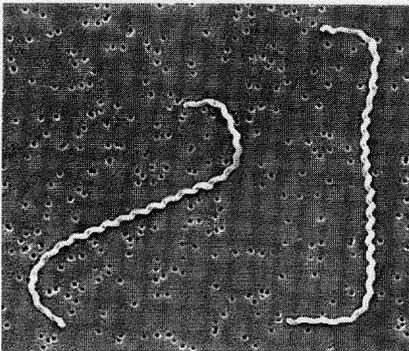


Рис. 2.7. Лептоспиры (сканирующая электронная микроскопия)

щими им вид скобы или буквы S, иногда можно различить мелкие первичные завитки (рис. 2.7). Микроскопическое исследование крови редко дает положительные результаты, поэтому используют другие методы исследования.

Для индикации лептоспир в исследуемом материале применяют также прямой вариант РИФ.

Бактериологическое исследование. Кровь, мочу, спинномозговую жидкость асептически засевают в количестве 5—20 капель в 3—5 пробирок с водно-сывороточной средой, средой Флетчера, Картофа или другой жидкой (полужидкой) специальной средой. Кроличья сыворотка или другие субстраты, добавляемые в среду, служат источником жирных кислот, необходимых для роста лептоспир. Для подавления роста сопутствующей микрофлоры, что особенно важно при культивировании лептоспир, в состав сред вводят неомицин или 5-фторурацил.

Посевы инкубируют до 30 сут при 28—30 °С в атмосфере CO₂.

Лептоспиры размножаются в питательной среде, не изменяя ее внешнего вида (среда остается прозрачной в течение всего периода наблюдения). Для выявления роста лептоспир через 10 дней после посева из каждой пробирки берут материал, готовят препарат раздавленной капли и изучают в темнопольном микроскопе. Из пробирки, где обнаружен рост лептоспир, пересевают по 0,5 мл в 3 пробирки с 5 мл свежей питательной среды, которые инкубируют 7—10 дней при той же температуре.

Для дифференциации патогенных (вид *L. interrogans*) и сапрофитических (вид *L. biflexa*) лептоспир изучают их культуральные и биохимические свойства. Наиболее показательным является:

бикарбонатный тест (гидрокарбонат, добавленный к питательной среде, подавляет рост патогенных лептоспир);

определение *гемолитической активности* (патогенные лептоспиры в отличие от сапрофитических не вызывают гемолиз эритроцитов кролика и белых крыс);

определение *фосфолипазной активности* (патогенные лептоспиры не обладают фосфолипазной активностью).

Выделенные лептоспиры идентифицируют по антигенной структуре — с помощью набора агглютинирующих сывороток определяют их принадлежность к одной из 23 известных серогрупп. Лептоспироз в нашей стране чаще вызывают представители сероваров *grippotyphosa*, *potomana*, *canicola*, *icterohaemorrhagiae*.

Биологическое исследование. Заражение экспериментальных животных проводят чаще для выделения лептоспир из проб воды, почвы и другого обильно контаминированного посторонней микрофлорой материала. Морским свинкам весом 150—200 г вводят 0,5—1,0 г исследуемого материала внутрибрюшинно и наблюдают в течение 1 мес, отмечая температуру и вес тела, появление признаков желтухи и кровоточивости сосудов (кровоизлияния), а

также гибель животных. Начиная с 7—10 дня проводят микроскопию мочи и при обнаружении лептоспир (а при их отсутствии через 1 мес) животных забивают, проводят микроскопические и патогистологические исследования внутренних органов.

Серологическое исследование. Антитела в сыворотке крови больного появляются со второй недели заболевания, их титр достигает максимума на 14—17-й день заболевания. Для выявления антител используют *реакции микроагглютинации и лизиса лептоспир*. Предварительно сыворотку больного 2-кратно разводят от 1:100 до 1:1600. В ряд пробирок вносят по 0,2 мл разведенной сыворотки и такое же количество живой культуры штаммов лептоспир из диагностического набора. После инкубации при 37 °С в течение 1 ч, из содержимого каждой пробирки готовят препарат раздавленной капли и изучают в темнопольном микроскопе.

Антитела сыворотки в первых разведениях обуславливают лизис (полное, частичное растворение или зернистое набухание лептоспир). В последующих разведениях сыворотки обнаруживают агглютинацию — появление агломератов в виде паучков. Диагностическое значение имеет положительная реакция в разведении 1:400 и выше.

При серодиагностике часто наблюдается положительный результат не только с лептоспирами серогруппы, вызвавшей заболевание, но и с лептоспирами других серологических групп (перекрестные реакции). Для уточнения серологического диагноза выявляют (например, в ИФА) *IgG*, которые в отличие от *IgM* строго специфичны.

С целью серологической диагностики могут быть также использованы реакции макроагглютинации, иммуноадсорбции и пассивной гемагглютинации.

ПЦР. Высокоэффективной в диагностике лептоспироза является ПЦР. Однако при лептоспирозе ПЦР имеет существенные ограничения, связанные с контаминацией образцов. Эта проблема решается при одновременном использовании нескольких праймеров. В настоящее время чаще применяют праймеры к *16S rRNA*, генам *proB*, *flaB* (чувствительность метода составляет 10—100 клеток/мл). Мультиплексная ПЦР позволяет одновременно определять в пробе геномы нескольких возбудителей, например представителей родов *Leptospira*, *Treponema* и *Borrelia*.

2.10.3. Возвратный тиф (эпидемический)

Возбудитель эпидемического (вшиного) возвратного тифа — *Borrelia recurrentis*, эндемического (клещевого) — *Borrelia persica*, *Borrelia caucasica* и другие относят к микроорганизмам 3-й группы патогенности. Они вызывают сходные по клинической картине острые инфекционные заболевания, протекающие с приступами

лихорадки, общей интоксикацией, увеличением печени и селезенки.

Основным методом исследования при возвратных тифах является бактериоскопический — обнаружение возбудителя в крови больного.

Микроскопия. У больного во время приступа или перед повторным приступом берут кровь из пальца и готовят препарат толстой капли и мазок. Вначале окрашивают препарат толстой капли, так как при его исследовании больше вероятности получить положительный результат. На высушенный нефиксированный препарат капли крови наливают на 35—45 мин краситель Романовского—Гимзы, затем препарат осторожно промывают водой и высушивают. Под микроскопом боррелии имеют вид тонких нитей сине-фиолетового цвета с несколькими большими неравномерными завитками (см. цв. вклейку, рис. 24).

Длина боррелии колеблется от 10 до 30 мкм и более. Иногда их величина в несколько раз превосходит поперечник лейкоцитов (в препарате находятся только лейкоциты, эритроциты — лизированы). При большом количестве боррелии, что характерно для эпидемического возвратного тифа, наблюдаются их скопления, которые трудно отличить от нитей фибрина. В таком случае микроскопируют мазок, который после высушивания фиксируют спиртом или смесью Никифорова и окрашивают по Романовскому—Гимзе или фуксином Пфейффера. При микроскопии мазка хорошо видны боррелии. Длина их всегда превосходит поперечник эритроцита в два раза и более. Если в толстой капле боррелии не обнаружены, мазки не исследуют.

Для обнаружения боррелий в крови применяют также микроскопию тушевых препаратов по Бурри и метод темнопольной микроскопии (изучают препараты толстой капли крови или сыворотки). В последнем случае видны типичные клетки боррелий, совершающие беспорядочные движения.

В период апирексии с помощью обычных методов исследования обнаружить боррелии не удастся. В таких случаях рекомендуется применять методы концентрирования клеток возбудителей. У больного из вены берут 8—10 мл крови, после свертывания отделяют сыворотку и центрифугируют ее при 3000 об/мин в течение 45—60 мин. Затем быстро выливают жидкость, опрокинув пробирку, а из осадка делают препараты раздавленной капли, которые исследуют в темном поле зрения, и толстые мазки, которые после фиксации окрашивают и изучают так же, как мазки из крови.

Биологическое исследование. Для дифференциации возбудителей эпидемического и клещевого возвратного тифа 0,5—1,0 мл цитратной крови больного вводят подкожно морским свинкам. В случае эндемического (клещевого) тифа через 5—6 дней в крови у животных появляется большое количество боррелии; в отли-

чие от них *B. recurrentis* непатогенна для морских свинок и заболевание не развивается.

Серологическое исследование. При отрицательном результате обнаружения боррелий в крови можно применять *методы серодиагностики*: реакцию иммобилизации боррелий референс-штамма сывороткой больного или реакцию нагрузки боррелий тромбоцитами.

2.10.4. Болезнь Лайма (клещевой системный боррелиоз)

Болезнь Лайма — инфекционное природно-очаговое трансмиссивное заболевание, возбудителем которого является *Borellia burgdorferi* (бактерии 3-й группы патогенности), а также *B. garinii* и *B. afzelii*, отличающиеся от *B. burgdorferi* по степени гомологии ДНК и клеточным белкам; переносчики — иксодовые клещи. На рис. 2.8 представлена электроннограмма возбудителя болезни Лайма.

При постановке диагноза учитываются клинические проявления заболевания (мигрирующая эритема и др.), а также эпидемиологические данные (пребывание в лесной зоне, сезон и распространенность клещей).

Выделение возбудителя из ликвора, крови, тканей, а также кожных поражений больных удается с трудом, требует специальных сред сложного состава и условий культивирования.

Серологическое исследование. Ввиду отсутствия выраженной спирохетемии для диагностики заболевания преимущественно используются методы серодиагностики.

Для выявления *антител* применяют реакцию непрямой иммунофлюоресценции (РНИФ). Перспективным является метод вестернблота (иммуноблотинга), позволяющий выявить антитела к своеобразному белку наружной мембраны с мол. м. 39 кД.

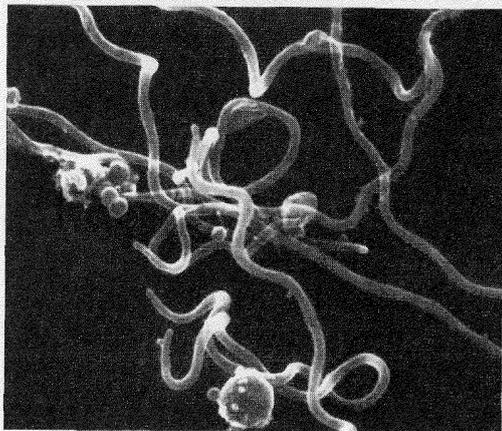


Рис. 2.8. *Borrelia burgdorferi* (сканирующая электронная микроскопия)

Выявление *антигенов* боррелий осуществляются с использованием иммуноферментного метода. Характерные нуклеотидные последовательности ДНК боррелий можно обнаружить с помощью ПЦР.

ПЦР. Для ранней диагностики болезни Лайма ПЦР является методом выбора, позволяя быстро выявить возбудителя (при чувствительности 10 клеток в пробе). Наиболее информативной при этом считается ПЦР с осадком мочи (специфичность 96—100%). Чувствительность ПЦР с кожным биоптатом из очага мигрирующей эритемы составляет примерно 80%, что в 5 раз выше, чем, например, у культурального метода. Использование ПЦР целесообразно также применять для оценки эффективности проведенной терапии у пациентов с мигрирующей эритемой.

2.11. Риккетсии и хламидии

2.11.1. Инфекции, вызываемые риккетсиями

Риккетсиозы — группа инфекционных болезней человека и животных, вызываемых риккетсиями. Известно 12 нозологических форм риккетсиозов, которые подразделяются на 5 групп в зависимости от особенностей возбудителей и переносчиков: I — группа сыпного тифа; II — группа клещевых риккетсиозов; III — группа лихорадки цуцугамуши; IV — эрлихиозы человека и животных; V — группа лихорадки Ку. Возбудители сыпных тифов, а также лихорадок цуцугамуши, пятнистой и Ку-лихорадки относят к бактериям 2-й группы патогенности, возбудители эндемических риккетсиозов — к 3-й группе.

Риккетсии — это мелкие полиморфные, грамтрицательные палочки и коккобактерии. Встречаются также нитевидные формы. Типичные риккетсии являются облигатными паразитами, поэтому не растут на искусственных питательных средах; для их выращивания используют культуры тканей или заражение экспериментальных животных.

Риккетсии выделяют из крови больных и другого материала только для научных целей *в специальных лабораториях* путем заражения экспериментальных животных, насекомых (переносчиков), куриных эмбрионов, а также культур клеток.

При заражении кровью больного куриных эмбрионов (по методу Кокса) можно сравнительно легко выделить возбудителей многих риккетсиозов. Ранее широко использовались методы заражения белых мышей и морских свинок-самцов (внутрибрюшинно или в ткань яичка). В настоящее время они вытесняются методами выделения риккетсий на культурах тканей. С этой целью применяют такие ткани, как *Vero*, *L-929*, *HEL* и др.

Выделение риккетсий на культуре ткани. Клинический материал в объеме 0,5 мл смешивают с таким же количеством среды для культуры ткани и сразу же вносят в ячейки специальных планшетов или контейнеры, где предварительно выращивают монослой соответствующей культуры клеток. Планшет центрифугируют в течение 1 ч при 700 g, после чего инокулюм удаляют, тщательно промывают ячейки с монослоем фосфатным буфером, вносят в них среду MEM с 10 % телячьей сыворотки крови и инкубируют при 34 °С в атмосфере 5 % CO₂. Через 48 и 72 ч культуральную жидкость сливают, монослой промывают, фиксируют и окрашивают соответствующими люминесцирующими сыворотками (прямая РИФ) для обнаружения возбудителя в клетках монослоя. При люминесцентной микроскопии обнаружение четырех и более характерно светящихся микроорганизмов расценивается как положительный результат. Идентификацию выделенных риккетсий проводят также методом ПЦР с амплификацией генов, специфичных для риккетсий (например, гена цитратсинтазы, белка 17 кДа, *OmpB* — для определения родовой принадлежности, белка *OmpA* — для выявления риккетсий сыпного тифа).

Для лабораторной диагностики риккетсиозов используют в основном серологическое исследование (РСК, РИФ, РА, ИФА, иммуноблотинг и др.). Имеющиеся особенности проведения этих реакций при некоторых риккетсиозах отражены в соответствующих разделах, посвященных описанию каждого заболевания.

В последнее время для диагностики риккетсиозов все чаще применяют метод ПЦР. В качестве клинических образцов для ПЦР-диагностики используют кожные биоптаты, лимфоциты периферической крови, ликвор, клетки эндотелия и другой материал, из которого предварительно экстрагируют ДНК. Для ПЦР-диагностики заболеваний, вызываемых риккетсиями группы сыпного тифа, группы клещевых риккетсиозов предложены различные тест-системы, включающие родо- и видоспецифичные праймеры.

Эпидемический сыпной тиф. Возбудитель эпидемического сыпного тифа и болезни Брилля—Цинссера — риккетсия Провачека (*Rickettsia prowazekii*) вызывает у человека острое заболевание с внезапным началом, высокой температурой тела и розеолезно-петехиальной сыпью.

Выделение риккетсий Провачека из крови больных, вшей, отловленных на больных, путем культивирования в желточном мешке куриного эмбриона в организме вшей или культуре клеток требует определенного навыка и связано с большой опасностью лабораторного заражения. Такие исследования (довольно редко) проводят в специализированных лабораториях. При этом риккетсии можно обнаружить в ходе микроскопии внутри инфицированных клеток (в ядре или цитоплазме). По методу Романовского — Гимзы они окрашиваются в пурпурно-фиолетовый цвет, по Здродовскому — в ярко-красный. Обнаружить риккетсии в материале можно также с помощью РИФ (прямой вариант) и ПЦР.

Ведущий метод диагностики заболевания — серологический, основанный на применении РСК, РА с диагностикумами из риккетсий Провачека и ОХ-штаммов протеев (реакция Вейля—Феликса), непрямой РИФ. Диагностическое значение имеет 4-кратное нарастание титра антител в парных сыворотках. Ввиду позднего получения результата серодиагностики эмпирическую терапию заболевания начинают, не дожидаясь подтверждения диагноза.

Серологическое исследование. РСК позволяет диагностировать как активную форму болезни, так и перенесенную в прошлом (ретроспективный диагноз). Кроме того, РСК применяют для дифференциальной диагностики эпидемического и эндемического (крысиного) сыпного тифа, а также первичного сыпного тифа от болезни Брилля—Цинссера (рецидива).

Реакцию проводят по общепринятой методике для выявления антител в сыворотке крови больных и переболевших. Кровь у больного берут на 5—7-й день болезни. Сыворотку разводят от 1 : 10 до 1 : 2560. В качестве антигена используют хорошо очищенную и высушенную в вакууме взвесь инактивированных риккетсий (корпускулярный антиген).

Связывание комплемента (I фаза реакции) проводится при +4 °С в течение 18—20 ч или при 37 °С в течение 1 ч. Диагностический титр при активной форме болезни — 1 : 80; ретроспективный диагноз ставят при обнаружении антител в разведении 1 : 20 и выше.

Реакцию агглютинации ставят обычным объемным методом, а также более экономичными (капельным или микроскопическим) методами с диагностикумом, приготовленным из риккетсий Провачека. Поскольку РА бывает положительной уже на 3—5-й день болезни, ее можно использовать для ранней диагностики заболевания (хотя в этот период возможны перекрестные реакции с другими риккетсиями группы сыпного тифа).

РА с антигеном протеев отличается высокой специфичностью (за счет структурного сходства с антигенами риккетсий Провачека), она положительна у больных сыпным тифом почти в 100 % случаев (при болезни Брилля—Цинссера реакция с антигеном ОХ₁₉, как правило, отрицательна). Диагностический титр — 1 : 160 (в микроскопической модификации — 1 : 40), но более достоверным является нарастание титра антител при использовании метода парных сывороток.

РИФ (непрямой вариант) для серологической диагностики сыпного тифа отличается высокой чувствительностью и специфичностью (особенно на поздних стадиях болезни). Ее преимуществом является возможность дифференциации антирикетсиозных IgG и IgM, что особенно важно для ранней диагностики и определения стадии заболевания. Используют следующую методику: на фиксированные риккетсиозные мазки, приготовленные из диаг-

ностикумов, наносят последовательные разведения сыворотки больного и инкубируют их во влажной камере при 37 °С 15—20 мин. Затем мазки 1 мин осторожно промывают под струей воды и помещают на 10 мин в кювету с фосфатным буферным раствором, промывают дистиллированной водой, высушивают на воздухе. После этого на мазки наносят антиглобулиновую люминесцентную сыворотку, взятую в рабочем разведении, указанном на этикетке ампулы, 20 мин инкубируют во влажной камере, промывают, высушивают и изучают в люминесцентном микроскопе.

Эндемический сыпной тиф. Возбудитель эндемического (крысиного) сыпного тифа — *Rickettsia typhi* вызывает заболевание, сходное по клинике с эпидемическим сыпным тифом. Дифференциальная диагностика с сыпным тифом, вызванным *R. prowazekii*, имеет эпидемиологическое значение.

Серологическое исследование. Для дифференциации эндемического и эпидемического сыпного тифа проводят РСК и реакцию агглютинации параллельно с антигенами из риккетсий двух видов. В случае эндемического сыпного тифа титр сывороточных антител к риккетсиям вида *R. typhi* в 3—4 раза превосходит титр к риккетсиям Провачека.

Биологическое исследование. В отсутствие культуры ткани проводят заражение экспериментальных животных. Морских свинок-самцов заражают внутрибрюшинно кровью больных. Появление скротальной реакции (периорхит), лихорадки и обнаружение риккетсий в соскобах влажных оболочек яичек с большой вероятностью подтверждает диагноз эндемического сыпного тифа.

Ку-лихорадка. Возбудитель Ку-лихорадки — *Coxiella burnetii* (риккетсий Бернета) относят бактериям 2-й группы патогенности. Они вызывают острое (реже подострое или хроническое) инфекционное заболевание с полиморфной клинической картиной. Для лабораторной диагностики этого риккетсиоза исследуют парные сыворотки в серологических реакциях (РА, РСК). В некоторых случаях применяют непрямую РИФ, биологическую и кожно-аллергическую пробы.

Серологическое исследование. Для *C. burnetii* характерна фазовая изменчивость антигенных свойств. Антиген I фазы представляет собой иммуногенный ЛПС (используется для получения вакцины). После длительных пассажей в курином эмбрионе коксиеллы трансформируются и у них преобладает антиген II фазы (малоиммуногенный). При серодиагностике Ку-лихорадки учитывают способность коксиелл к фазовой изменчивости и исследуют сыворотки с набором антигенов коксиелл I и II фаз.

РА проводят на второй неделе болезни (10—12-й день) с парными сыворотками. Сыворотку крови больного ввиду небольшого содержания в ней агглютининов разводят от 1:4 до 1:64, разливают в пробирки по 0,25 мл и в каждую из них добавляют по

0,25 мл антигена. Результаты реакции учитывают после 18—20 ч инкубирования пробирок в термостате. Положительным считают результат при титре реакции 1 : 4 и выше.

РСК может быть положительной в конце 1-й нед заболевания. Комплементсвязывающие антитела достигают наибольшей концентрации в сыворотке на 3-й нед болезни. Методика реакции та же, что и при сыпном тифе.

Аллергологическое исследование. Кожную пробу проводят по стандартной методике (см. подразд. 1.5.1). В качестве аллергена используют растворимый антиген из риккетсий Бернета I фазы. Возможно также постановка кожной аллергической пробы с автоклавированной культурой кокциелл или ЛПС I фазы в качестве аллергена. Результаты пробы учитывают через 24—48 ч после введения 0,1 мл аллергена по наличию и размерам инфильтрата и гиперемии, иногда с отеком. Проба является специфичной, но пригодна только для ретроспективного диагноза. У переболевших она остается положительной в течение 9—10 лет.

Биологическое исследование. Заражение морских свинок дает возможность выделить возбудителя Ку-лихорадки. Материал для исследования — кровь, мочу или мокроту больных в количестве 0,3—0,5 мл вводят морской свинке внутрибрюшинно или интратестикалярно (в толщу яичек). Материалом от инфицированной свинки заражают куриные эмбрионы (по Коксу). При повторных пассажах риккетсии из фильтрующихся форм переходят в видимые и обнаруживаются при окраске по Романовскому — Гимзе или Здродовскому. В настоящее время методы заражения лабораторных животных и куриных эмбрионов вытесняются методами исследования с использованием культур тканей.

Лихорадка цуцугамуши. Лихорадка цуцугамуши — острый зооантропонозный риккетсиоз, вызываемый *Orientia tsutsugamushi* и протекающий с множественными васкулитами, лихорадкой, поражением нервной системы и органов кровообращения.

Для исследования с целью выделения возбудителя используют кровь, взятую в период лихорадки, для серологической диагностики — сыворотку больных.

Серологическое исследование. Серодиагностика проводится со 2-й нед болезни; используют ИФА, РА (с антигеном из культуры *Proteus mirabilis* OXk), непрямую РИФ, РСК. Высокоспецифичные результаты получают при использовании в ИФА в качестве АГ рекомбинантного поверхностного белка возбудителя (56 кДа), но высокая стоимость тест-системы ограничивает ее практическое применение.

Биологическое исследование. Кровью больного внутрибрюшинно заражают белых мышей. Через 6—14 дней после заражения животные погибают. Для обнаружения риккетсий готовят мазки-отпечатки внутренних органов животного, окрашивают их по Рома-

новскому — Гимзе или Здродовскому (см. выше); можно также применять для этой цели прямую РИФ.

O. tsutsugamushi в исследуемом материале можно выявить путем заражения перевиваемой культуры клеток *L* и первично-трипсицизированных фибробластов куриного эмбриона.

Риккетсиозы группы пятнистой лихорадки Скалистых гор. К этой группе риккетсиозов относятся следующие заболевания: марсельская (Астраханская) лихорадка — возбудитель *Rickettsia conorii*; осповидный везикулярный риккетсиоз — возбудитель *Rickettsia akari*; пятнистая лихорадка Скалистых гор — возбудитель *Rickettsia rickettsii*; клещевой сыпной тиф Сибири и Северной Азии — возбудитель *Rickettsia sibirica*.

Лабораторная диагностика этих риккетсиозов основана на выделении возбудителя из крови больных с помощью биологической пробы на лабораторных животных или культивировании его в желточном мешке куриного эмбриона, а также на определении специфических антител в крови больного (серологический метод).

Биологическое исследование. В отсутствие культуры ткани проводят заражение экспериментальных животных. Из вены больного берут 3—5 мл крови и вводят внутрибрюшинно морским свинкам (самцам). Если материалом для исследования являются клещи, то их обрабатывают спиртом, промывают, растирают в ступке и готовят взвесь в ИХН, которую внутрибрюшинно вводят свинкам (самцам). Через 6—14 дней у животных появляются признаки перитонита. Возбудители пятнистой лихорадки Скалистых гор вызывают скротальный феномен с некрозом мошонки. Кровь больного везикулярным риккетсиозом, введенная внутрибрюшинно белым мышам, вызывает у них через 8—10 дней риккетсиозный перитонит с резким увеличением селезенки.

Серологическое исследование. Антитела в сыворотках крови больных накапливаются в достаточном количестве ко 2-й нед заболевания. Для их обнаружения используют непрямую РИФ, ИФА, РСК, РНГА. Определение нарастания титра антител при изучении парных сывороток позволяет считать диагноз обоснованным.

Для серологических реакций используют диагностикумы из риккетсий, вызывающих соответствующие заболевания.

2.11.2. Эрлихиозы

Эрлихии (*Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia sennetsu*) паразитируют преимущественно в лейкоцитах животных и человека и вызывают острую трансмиссивную генерализованную инфекцию, при которой в результате гибели тканевых макрофагов, моноцитов и гранулоцитов развивается вторичный иммунодефицит. Их относят к бактериям 3-й группы патогенности.

Заболевание начинается внезапно и характеризуется лихорадкой, лимфаденопатией, изменением формулы крови в зависимости от вида возбудителя. В отличие от других риккетсиозов на месте присасывания клеща-переносчика при эрлихиозах первичный аффект отсутствует. Поскольку патогномические симптомы эрлихиоза также отсутствуют, клиническая диагностика практически невозможна.

Микробиологическая диагностика эрлихиоза базируется на выявлении возбудителя в окрашенных микропрепаратах крови, методом ПЦР и серологическом исследовании парных сывороток в динамике заболевания.

Микроскопия. При микроскопии мазков из периферической крови эрлихии обнаруживают в цитоплазме инфицированных лейкоцитов. При окраске по Романовскому—Гимзе обнаруживают характерные окрашенные в пурпурный цвет *морулы* — компактные скопления паразитов в вакуолях-фагосомах, имеющие вид тутовой ягоды или малины.

Другие методы обнаружения возбудителя. При необходимости возбудитель может быть обнаружен в крови при заражении *культуры ткани* (линий *Vero*, *TNP-1*, *HL60* или др.). Для этого из исследуемой крови выделяют фракцию лейкоцитов или используют цельную кровь. После заражения клетки монослоя культивируют до 4 нед. Так как эрлихии имеют низкие темпы размножения (время генерации 8 ч и более), для ограничения роста эукариотических клеток уменьшают содержание в среде телячьей сыворотки, добавляют циклогексимид или эметин. Периодически (через 2—3 дня) культуры проверяют на наличие эрлихий. Для этого готовят окрашенные по Романовскому—Гимзе микропрепараты, применяют иммуногистологический метод или ПЦР. Положительный результат культивирования может наблюдаться на 3-и—30-е сут, в зависимости от вида эрлихий, характера, стадии заболевания и др. Этим методом удастся обнаружить возбудитель, не определяемый в крови микроскопическим методом.

ПЦР является эффективным методом выявления как моноцитотропных (*E. chaffeensis*), так и гранулоцитотропных (группы *E. phagocytophila*) эрлихий. Этот метод диагностики особенно важен при низкой концентрации возбудителя в крови и у больных с нарушением синтеза антител. Следует, однако, учитывать возможность ложноположительного результата при нарушении технологии ПЦР (контаминация посторонними ампликонами, выбор праймеров и др.). Отрицательный результат может быть следствием проводимой антимикробной терапии.

Серологическое исследование. Серологический диагноз является ретроспективным, но само исследование — самым чувствительным при эрлихиозе. С сывороткой больных ставят, как правило, непрямую РИФ и иммуноблотинг. В качестве антигена для РИФ

используют клетки культуры ткани, зараженные стандартными штаммами эрлихий (*E. chaffeensis* или *E. phagocytophila*). Ввиду перекрестных реакций внутри рода и с другими риккетсиями нередко требуется уточнение диагноза. С этой целью используют иммуноблотинг. Так, например, для гранулоцитотропного эрлихиоза характерно появление в сыворотке крови антител к главному белковому антигену *E. phagocytophila* (44 кДа).

2.11.3. Бартонеллезы

Несмотря на то что бартонеллы растут на искусственных питательных средах, ввиду выраженного внутриклеточного паразитизма и других биологических свойств их относят к риккетсиям. В ходе инфекции бартонеллы проникают в клетки эндотелия сосудов и эритроциты, размножаются в них, в результате чего может развиваться ангиоматоз или выраженная анемия. У людей бартонеллы вызывают полиморфные по клинической картине заболевания:

острые — волынскую (окопную) лихорадку, болезнь Карриона (лихорадку Оройя);

подострые — болезнь кошачьих царапин;

хронические — бациллярный ангиоматоз, перуанскую бородавку, пурпурный гепатит, эндокардиты и др.

Окопная (волынская или пятидневная) лихорадка — инфекционное заболевание, основным патогномоничным признаком которого является 5-дневный промежуток между приступами лихорадки. Эта особенность течения заболевания отражена в названии возбудителя — *Bartonella quintana*.

Болезнь Карриона — эндемичное инфекционное заболевание, характерное для северо-западной части Южной Америки, что связано с ареалом обитания переносчика — москитов рода *Phlebotomus*. Возбудитель (*Bartonella bacilliformis*) вызывает две клинические формы бартонеллеза:

лихорадка Оройя, которая характеризуется высокой летальностью (до 90 %);

перуанская бородавка (хроническое кожное заболевание с относительно доброкачественным течением).

Болезнь кошачьих царапин (возбудитель *Bartonella henselae*) передается контактным путем, после укуса или царапины, нанесенных кошкой. Этот самый распространенный бартонеллез начинается остро: на месте травмы отмечается первичное поражение, развивается лихорадка, односторонний лимфаденит и лимфангит. Течение подострое, доброкачественное.

Микробиологическая диагностика. Лабораторная диагностика бартонеллезов основана на обнаружении возбудителя методами непрямой РИФ, ПЦР, иммуногистологического исследования биоптатов из очагов бородавчатых разрастаний (при хроническом

течении бартонеллеза), а также в выделении возбудителя из крови больных бактериологическим методом. Проводят также серологическое исследование парных сывороток крови.

Бартонеллы выделяют из исследуемого материала при посеве на специальные полужидкие и плотные питательные среды с добавлением гемина, 5—10 % крови человека или животных (барана, кролика). Посевы инкубируют во влажной атмосфере с 5—10 % CO₂ при 35—37 °С (*B. bacilliformis* — при 21—30 °С). Характерный рост бартонелл проявляется через несколько недель (иногда через 45—60 сут). Идентификацию и дифференциацию выделенных чистых культур проводят по характеру и оптимальной температуре роста, подвижности, биохимическим свойствам (каталаза, оксидаза, нитратредуктаза и др.), а также по составу жирных кислот в клетке, определяемому методом газо-жидкостной хроматографии.

Ввиду длительности бактериологического исследования в диагностике бартонеллезозов существенную роль играет выявление антител к бартонеллам. С этой целью ставят ИФА, непрямую РИФ (например, для выявления *IgM* при лихорадке Оройя). Несколько меньшей чувствительностью при бартонеллезах обладает РНГА. Ценность результата серологического исследования существенно снижает наличие перекрестных реакций (в основном с коксиидами и хламидиями).

2.11.4. Инфекции, вызываемые хламидиями

Хламидии относятся к самостоятельному порядку *Chlamydiales*, в котором имеется один род *Chlamydia*, включающий виды: *C. psittaci* — возбудитель орнитоза, *C. trachomatis* — возбудитель трахомы, *C. pneumoniae* — возбудитель хламидиозных пневмоний и *C. pecorum* — возбудитель зоонозных инфекций.

Хламидии — представители семейства *Chlamydiaceae* — составляют группу облигатных внутриклеточных паразитов, вызывающих антропонозные или зоонозные инфекции с разнообразными клиническими проявлениями (табл. 2.25). Из четырех известных видов два (*C. trachomatis* и *C. pneumoniae*) относят к бактериям 3-й группы патогенности, *C. psittaci* — ко 2-й группе, а близкий к ним вид *C. pecorum* пока не относят к клинически значимым.

Поскольку хламидии проявляют тропизм к эпителиоцитам, при заболеваниях, вызванных *C. trachomatis*, материалом для исследования является соскоб со слизистой оболочки конъюнктивы глаз, уретры и цервикального канала. При ВЛР исследуют также гной и пунктат лимфоузлов. При пневмонии и ОРЗ исследуют мокроту, мазки из носоглотки и глотки, промывные воды бронхов, биопсийный и аутопсийный материал. По показаниям исследуют фекалии.

Клинически значимые виды и варианты хламидий

Вид микроорганизма	Вариант	Группа патогенности	Вызываемые заболевания
<i>C. trachomatis</i>	<i>A, B, Ba, C</i>	3	Трахома, паратрахома
	<i>D... K</i>	3	Урогенитальный хламидиоз, пневмония и другие инфекции новорожденных
	<i>L₁, L₂, L₃</i>	3	Венерическая лимфогранулема (ВЛГ)
<i>C. pneumoniae</i>	<i>TWAR, AR, KA, CWL</i>	3	ОРЗ, пневмония, атероматоз, атеросклероз
<i>C. psittaci</i>	—	2	Пневмония, полиартрит, энцефалит (особо опасный зооноз)

Для диагностики хламидийной инфекции применяют следующие виды исследований.

Микроскопия. Исследование является простым и доступным, имеющим наибольшее значение в диагностике урогенитального хламидиоза. Для ориентировочного определения хламидий в материале готовят препараты для световой микроскопии, для подтверждения и дифференциации обнаруженных возбудителей — прямую РИФ. Поскольку количество возбудителя в материале часто бывает небольшим, важно, чтобы в пробу попадало как можно больше клеток. С этой целью исследуют преимущественно соскобы, а не мазки с пораженных тканей. Для концентрирования клеток материал центрифугируют и для приготовления микропрепаратов берут осадок.

Приготовление микропрепаратов. На чистом обезжиренном стекле готовят мазок и подсушивают на воздухе. Полученный препарат фиксируют метиловым, абсолютным этиловым спиртом или смесью Никифорова в течение 5 мин либо охлажденным безводным ацетоном в течение 3—5 мин. После фиксации высушенные мазки окрашивают свежеприготовленным красителем Романовского — Гимзы в течение 1 ч, затем мазок быстро промывают 96%-м этиловым спиртом для удаления избытка красителя, высушивают и микроскопируют с использованием иммерсионной системы при увеличении 900—1500×.

Окраска по Макиавелло. Мазок на предметном стекле фиксируют над пламенем горелки несколько секунд и далее окрашивают 0,25%-м раствором основного фуксина в течение 5 мин. Затем краску смывают под проточной водой. Препарат помешают на несколько секунд в 0,5%-й ра-

створ лимонной кислоты и затем промывают в проточной воде. Последний этап — дополнительное окрашивание 1%-м раствором метиленового синего (20—30 с). Препарат промывают водой, высушивают и микро копируют.

Для люминесцентной микроскопии используют люминесцирующие моноклональные антитела к наружным белкам или ЛПС хламидий. Использование люминесцирующих гипериммунных сывороток менее предпочтительно ввиду перекрестных реакций с *S. aureus* и другими микроорганизмами.

При микроскопии препаратов, окрашенных по Романовскому—Гимзе, выявляют элементарные тельца хламидий, которые представляют собой мелкие (0,15—0,3 мкм) образования округлой формы, окрашенные в розовый или красноватый цвет. Они находятся преимущественно внеклеточно. Более крупные ретикулярные тельца (0,5—1,5 мкм) окрашиваются в различные оттенки от голубого до темно-синего цвета и находятся преимущественно внутриклеточно. При микроскопическом исследовании они обнаруживаются в виде скоплений вокруг ядра эпителиальной клетки в форме «шапочки жандарма» или диффузно. Ядра клеток имеют вишневый оттенок различной интенсивности, а цитоплазма окрашивается в нежно-голубой цвет.

При окраске по методу Маккиавелло ядра клеток окрашиваются в бледно-розовый цвет, цитоплазма — в нежно-голубой. Внутриклеточные ретикулярные тельца хламидий окрашиваются в различные оттенки голубого цвета (от светлого до темного). Элементарные тельца имеют красноватый цвет и могут находиться как внутри, так и вне клеток (преимущественно). Диагностическая значимость метода не очень высокая.

Люминесцентная микроскопия имеет преимущество в виде высокой специфичности, ее можно использовать для экспресс-диагностики хламидийной инфекции.

Культуральный метод. В связи с отсутствием роста возбудителя на питательных средах для его культивирования необходимо использовать живые системы (как в случае с вирусами). Культивирование возбудителей осуществляют только в специализированных лабораториях, поскольку хламидии (особенно *S. psittaci*) представляют опасность в плане лабораторного заражения.

Для культивирования используют перевиваемые клеточные культуры (наиболее чувствительными являются клетки *L-929*, *HeLa*, *McCo*), в которых хламидии образуют характерные цитоплазматические включения. Клетки обрабатывают цитостатиками (циклогексимидом) или облучают для того, чтобы обеспечить более полное усвоение хламидиями АТФ и других продуктов метаболизма эукариотических клеток.

Культивирование возбудителя проводят также в эпителиальных клетках оболочек желточных мешков, 6—7-дневных куриных

эмбрионов. Признаками присутствия хламидий является гибель зародыша, образование морфологических структур возбудителя разной степени зрелости в клетках эпителия (определяется при окраске мазков-отпечатков) и накопление антигенных частиц в различных титрах (определяется в РИФ).

Наличие родоспецифического хламидийного антигена в живых системах выявляют путем экстракции этиловым спиртом, осаждения ацетоном и последующей постановкой РИФ в непрямом варианте, РНГА, РСК.

Для определения биовара возбудителя с помощью иодного раствора Люголя выявляют наличие гликогена в цитоплазматических включениях (полисахаридный комплекс хламидий окрашивается в коричневый цвет). В составе включений, образованных *C. psittaci*, гликоген не выявляется.

Патогенность выделенных хламидий определяют на лабораторных животных. Используют мышей линий *СВА*, *СВА/м*, *С-57ВL6*, *С₃H₆ТО*. Заражение взвесью желточных мешков с накопленным возбудителем проводят интраназально, подкожно и внутривенно.

Идентификацию штамма проводят с помощью перекрестной непрямой РИФ или ИФА с использованием диагностических тест-систем и специально приготовленных антигенов из референс-штаммов хламидий.

Культуральный метод обнаружения и типирования хламидий считается самым специфичным и наиболее чувствительным. Однако в силу продолжительности и трудоемкости он не получил широкого распространения в лабораторной практике.

Экспресс-методом диагностики хламидиозов можно считать обнаружение в клиническом материале (моча, отделяемое половых органов, материал соскобов) группового антигена возбудителя. Для выявления антигенов как элементарных, так и ретикулярных телец используют ИФА, но чаще — РИФ (прямой и непрямой варианты). На рис. 25 (цв. вклейка) представлены результаты прямой РИФ с исследуемым материалом. При использовании антител меченных флюорохромом, свечение измеряют с помощью прибора — флюорометра.

Для серодиагностики используют ИФА, РИФ. Поскольку титры антител к хламидиям, как правило, невелики, рекомендуется применение метода парных сывороток. По единичному анализу сыворотки крови серологический диагноз хламидиоза ставят лишь при обнаружении высокого титра противохламидийных антител, относимых преимущественно к *IgA*.

ПЦР. ПЦР-диагностика хламидиозов основана на обнаружении разных фрагментов генома хламидий, например фрагментов криптической плазмиды *C. trachomatis*. При высокой чувствительности метода применение ПЦР позволяет сократить сроки анализа и, кроме того, дает возможность обнаружения нежизнеспособ-

ных форм хламидий. Широко изучены возможности применения ПЦР для анализа образцов мочи как перспективного неинвазивного способа диагностики хламидийной инфекции. Наиболее достоверные результаты получают при подтверждении диагноза двумя—тремя различными методами (ИФА, ПЦР, культуральный метод и др.).

Трахома. Трахома — инфекционный кератоконъюнктивит с хроническим течением, вызываемый определенными сероварами *C. trachomatis*.

Материал для исследования доставляют как можно быстрее, при отсутствии возможности — сохраняют в холодильнике (до 24 ч) или замораживают. Кроме того, для подавления сопутствующей микрофлоры его обрабатывают антибиотиками (кроме тетрациклинов, макролидов и других, активных в отношении хламидий). После анестезии глаза ватным тампоном удаляют с конъюнктивы гной, слизь и тупым скальпелем соскабливают эпителий конъюнктивы.

Микроскопия. Для обнаружения антигенов с помощью РИФ препараты-соскобы фиксируют в холодном ацетоне в течение 10—15 мин и обрабатывают флюоресцирующими антителами. При люминесцентной микроскопии хламидии трахомы представляют собой флюоресцирующие включения в цитоплазме клеток конъюнктивы.

Для световой микроскопии соскоб наносят на предметные стекла, препараты фиксируют и окрашивают 3—4 ч по Романовскому—Гимзе. В положительных случаях обнаруживают коккоподобные включения в клетках эпителия величиной до 10 мкм.

Культуральный метод. В связи с высоким риском заражения применение культурального метода диагностики хламидиозов ограничено. Возбудитель трахомы рекомендуют выращивать в культуре ткани или желточном мешке куриного эмбриона. Культуры клеток перед заражением облучают или обрабатывают цитостатиком. Материал обрабатывают антибиотиками в течение нескольких часов при +4 °С. В желточный мешок куриных эмбрионов вводят по 0,3 мл обработанного материала. При микроскопии мазков-отпечатков, приготовленных из желточного мешка погибших эмбрионов, обнаруживают большое количество *C. trachomatis*.

Серологическое исследование. В связи с тем что трахома является локальной инфекцией, серологические методы диагностики имеют второстепенное значение. Для выявления антител в сыворотках больных трахомой можно использовать РСК, РТГА, ИФА, непрямую РИФ. За титр сыворотки (непрямая РИФ) принимают то ее максимальное разведение, при котором видно свечение антигена в элементарных тельцах.

Урогенитальный хламидиоз и венерическая лимфогранулема (паховый лимфогранулематоз). Исследуют отделяемое половых орга-

нов, пунктат лимфоузлов. При диагностике следует учитывать, что хламидии могут находиться в ассоциации с другими возбудителями венерических инфекций и даже размножаться внутри *Trichomonas vaginalis*.

Материал из уретры и цервикального канала забирают специальными щетками или ложками Фолькмана и доставляют в лабораторию в специальной транспортной среде.

РИФ, ИФА и ПЦР позволяют обнаружить присутствие хламидий в исследуемом материале.

Бактериоскопический метод обнаружения «урогенитальных» хламидий является малоинформативным, так как редко позволяет обнаружить хламидии внутри пораженных клеток.

Культуральный метод. Это исследование традиционно считается «золотым стандартом» для диагностики уrogenитального хламидиоза. Выделение *C. trachomatis* осуществляют путем заражения культур тканей и куриных эмбрионов (в желточный мешок).

При наличии в исследуемом материале хламидий эмбрионы погибают на 5—8-е сут после заражения. Из желточных мешков куриных эмбрионов готовят мазки-отпечатки, которые фиксируют и окрашивают по Романовскому—Гимзе. Хламидии можно также обнаружить в желточном мешке куриных эмбрионов или культуре клеток с помощью РИФ.

Серологическое исследование. Этот метод имеет диагностическое значение только при ВЛГ. С этой целью применяют РНГА и ИФА. При диагностике ВЛГ используют также кожную аллергическую пробу.

Заболевания, вызываемые *C. pneumoniae*. Материалом для исследования являются мазки из зева, носоглотки, носоглоточные смывы, мокрота, бронхоальвеолярный лаваж.

Микроскопия. Хламидии пневмонии можно обнаружить в материале с помощью РИФ (используют групповые люминесцирующие антитела) или при микроскопии мазков, окрашенных по Романовскому—Гимзе.

Серологическое исследование. Серодиагностика основана на применении твердофазного ИФА и более чувствительной реакции микрофлюоресценции с целью выявления антител к *C. pneumoniae*. Реакция микрофлюоресценции позволяет также определять классы антихламидийных антител. Диагностическое значение этой реакции при пневмонии, вызванной *C. pneumoniae* серовара *TWAR*, например, имеет: четырехкратное нарастание титра антител в парных сыворотках, титр *IgM* 1 : 16 и более или титр *IgG* 1 : 512 и более.

Орнитоз. Орнитоз — зоонозная инфекция, вызываемая *C. psittaci*, эпидемически связанная с птицами и характеризующаяся поражением легких, общей интоксикацией.

В основе диагностики лежат иммунологические методы, так как выделение возбудителя ввиду его высокой контагиозности можно проводить только в специальных лабораториях.

Серологическое исследование. РСК, РНГА ставят с парными сыворотками крови больных по обычной методике, используя стандартный орнитозный антиген (орнитин). Диагностическое значение имеет 4-кратное нарастание титра антител в парных сыворотках. Для выявления антител в сыворотке больного используется также непрямая РИФ и реакция микроиммунофлюоресценции.

Аллергологическое исследование. Внутрикожную пробу со специфическим и контрольным стандартными аллергенами применяют для ранней или ретроспективной диагностики заболевания. Указанные аллергены готовят из культуральной жидкости, собранной из зараженных *C. psittaci* культур клеток (специфический орнитозный аллерген) и незараженных культур (контрольный аллерген). Препараты вводят строго внутрикожно в дозе 0,1 мл: специфический — на правом, контрольный — на левом предплечье. Результаты учитывают через 24—48 ч. Проба с орнитином становится положительной с 2—3-го дня заболевания (на месте введения аллергена появляется инфильтрат размером от 0,5 до 4,0 см и более).

Биологическое исследование. Для выделения возбудителя у больного берут кровь (5—10 мл в первые две недели заболевания), смывы из носоглотки, биоптат или мокроту, при аутопсии — пораженные участки легкого, печени, селезенки. Исследуемый материал доставляют в замороженном виде, обрабатывают антибиотиками, проверяют на отсутствие других бактерий и готовят взвеси.

Исследуемым материалом заражают перевиваемые культуры клеток — *L*, *Hela*, *HEp-2* и др. Для выделения возбудителей орнитоза используют также куриные эмбрионы или белых мышей.

Эффективность заражения культур клеток возрастает при использовании принудительной адсорбции. Для этого после нанесения исследуемого материала на монослой клеток культуры центрифугируют при 1000—1500 об/мин 20—30 мин. Кроме того, рекомендуется использование культур клеток, предварительно облученных или обработанных цитостатиками. После 24—48 ч культивирования монослои клеток для обнаружения и типирования возбудителя окрашивают по Романовскому—Гимзе и люминесцирующими антителами (РИФ). При микроскопии обнаруживают цитоплазматические включения возбудителя в виде образований округлой формы, дающие характерное свечение в ультрафиолете.

Возбудитель орнитоза можно также культивировать на куриных эмбрионах при заражении в желточный мешок, аллантаис-

ную полость или хорионлантоисную оболочку. Зараженные эмбрионы инкубируют при 35—36 °С в течение 4—7 сут. После 3—5 пассажей в мазках-отпечатках аллантоисной оболочки и в аллантоисной жидкости обнаруживают скопления возбудителя — элементарные тельца. На поверхности хорионлантоисной оболочки образуются бляшки, подобные оспенным. Элементарные тельца обнаруживают в мазках, окрашенных по Романовскому—Гимзе и с помощью РИФ.

Мышам вводят в мозг 0,5 мл взвеси исследуемого материала. Последовательно проводят три пассажа. В положительных случаях из мозга готовят гистологические срезы, мазки-отпечатки и окрашивают их по Романовскому—Гимзе или люминесцирующими антителами. Возбудитель орнитоза обычно обнаруживается в виде скоплений элементарных частиц в цитоплазме клеток или внеклеточно.

При интраназальном заражении белых мышей возбудитель орнитоза вызывает заболевание и гибель животных от пневмонии на 3—4-е сут. В мазках-отпечатках легочной ткани видны цитоплазматические включения и элементарные частицы в клетках эпителия альвеол, бронхиол и в фагоцитах. К хламидиям орнитоза чувствительны также кролики, молодые морские свинки, крысы и сирийские хомяки.

2.12. Микоплазмы

Основными возбудителями инфекций у человека являются условно-патогенные микроорганизмы родов *Mycoplasma* и *Ureaplasma*, семейства *Mycoplasmataceae*, входящего в порядок *Mycoplasmatales*, класс *Mollicutes*, а именно *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealiticum*. *M. pneumoniae* является частым возбудителем ОРЗ и пневмоний (особенно у молодых людей), а также поражений почек и суставов, два других вида — возбудители инфекций мочеполового тракта. Клиническое значение некоторых других видов (*Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma fermentans*) остается неясным.

В лабораторной диагностике используются методы индикации возбудителя (выявление АГ и/или НК), бактериологический и серологический методы исследования.

Бактериоскопический метод ввиду полиморфизма возбудителя имеет второстепенное (ориентировочное) значение.

Материалом для исследования в зависимости от формы микоплазменной инфекции являются: мокрота, мазки из зева, смывы из носоглотки, биоптаты легочной ткани, плевральная жидкость, а также моча, отделяемое уретры и влагалища, реже — синовиальная жидкость.

Микроскопия. Приготовление и окраску препаратов производят так же, как и при исследовании на хламидиоз. При микроскопии микоплазмы и уреоплазмы выявляются в виде полиморфных структур зерна, гранулы, коккобактерии. Они могут располагаться на поверхности эпителиальных клеток, лейкоцитов, а также во внеклеточном пространстве. Разработаны методы иммунофлюоресценции, позволяющие выявлять АГ возбудителя в мокроте и другом исследуемом материале.

Бактериологический метод. Выделение чистой культуры микоплазм является наиболее точным способом подтверждения диагноза. Микоплазмы относят к прихотливым бактериям. Для их культивирования используют питательные среды с добавлением лошадиной сыворотки (источник холестерина) и дрожжевого экстракта (источник компонентов для синтеза нуклеиновых кислот).

При росте в жидких питательных средах микоплазмы не образуют помутнения, поэтому для их выявления в среду вводят дифференцирующие субстраты, избирательно ферментируемые теми или иными видами микоплазм (глюкоза — для выявления *M. pneumoniae* и *M. genitalium*, L-аргинин — для *M. hominis*, мочевины — для *U. urealiticum*), и индикатор — феноловый красный или бромтимоловый синий. Для придания селективных свойств в состав сред вводят пенициллин и другие антибиотики. Так, для выделения *M. pneumoniae* и *M. hominis* используют среду SP-4, а среда R1 предназначена для первичных посевов клинических образцов, а также в качестве транспортной среды. Для выделения уропатогенных микоплазм (*M. hominis* и *U. urealiticum*) выпускаются готовые к посеву наборы питательных сред.

Микоплазмы лучше растут при содержании в атмосфере 5% CO₂ и 95% N₂. Посевы инкубируют при 37 °С в течение 7—14 дней. Обычно рост *U. urealiticum* появляется через 1—3 сут, *M. pneumoniae* и *M. hominis* — через 3—5 сут (рис. 2.9). Посевы на плотных средах просматривают на 3—5-е сут инкубации и позже при малом увеличении микроскопа (60—100×): *M. genitalium* и *M. hominis* образуют, как правило, более крупные колонии (0,1—0,3 мм), чем *U. urealiticum* (0,01—0,03 мм). Отличительной особенностью *U. urealiticum* явля-

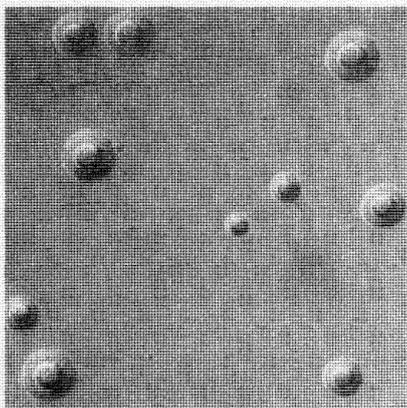


Рис. 2.9. Колонии *Mycoplasma hominis* на плотной среде (по виду напоминают яичницу-глазунью)

ется их способность гидролизовать мочевины до аммиака вследствие наличия у них уреазы.

Выделенные культуры идентифицируют, используя различные модификации иммунологических методов: реакцию подавления размножения, реакцию подавления метаболизма, РИФ (прямая или непрямая модификации).

Выделение микоплазм на культурах ткани является наиболее специфическим методом, однако он в связи с использованием сложных и дорогостоящих питательных сред, длительности исследования не нашел широкого практического применения.

Серологическое исследование. Учитывая широкое распространение носительства микоплазм, результат бактериологического исследования подтверждают серологическими данными. Для серологической диагностики ставят РСК, РНГА, ИФА с использованием метода парных сывороток.

Экспресс-диагностика. В качестве экспресс-диагностики используются молекулярно-биологические методы: выявление в клинических образцах нуклеиновых кислот возбудителя с помощью ПЦР и метод гибридизации на основе ДНК-зондов. Разработана мультиплексная ПЦР, позволяющая одновременно определять в клинических образцах нуклеотидные последовательности *M. genitalium*, *U. urealyticum* и *M. hominis*. Однако в связи с высокой частотой носительства полученные результаты требуют подтверждения методами серодиагностики.

2.13. Пищевые отравления бактериальной природы

При попадании в пищевые продукты и размножении в них условно-патогенных бактерий появляются условия для возникновения пищевого отравления бактериальной природы. Размножение микроорганизмов и накопление их токсинов в пищевом продукте становится возможным в результате нарушения норм их заготовки, процесса изготовления полуфабрикатов или готовых изделий, при неправильной транспортировке, хранении, превышении сроков реализации продуктов.

Отличительными особенностями пищевых отравлений являются:

массовый («взрывной») характер заболевания;

короткий инкубационный период (2—48 ч);

острое начало и непродолжительность заболевания (1—3 дня);

наличие в анамнезе у заболевших «общего» продукта питания;

прекращение вспышки заболеваний после изъятия причинного продукта;

отсутствие так называемого эпидемического «хвоста» (цепочки последовательных заражений человека от человека);

сходство клинической картины у заболевших и зависимость ее выраженности от количества употребленного продукта.

Пищевые токсикоинфекции вызывают: энтеробактерии (представители родов *Proteus*, *Morganella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Hafnia*, *Yersinia*), вибрионы (*Vibrio parahemolyticus*, *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides*), бациллы (*Bacillus cereus*), клостридии (*Clostridium perfringens*), псевдомонады (*Pseudomonas aeruginosa*), стрептококки (*Streptococcus pyogenes*) и др.

Пищевые токсикозы вызывают: *Clostridium botulinum* (ботулизм), *Staphylococcus aureus* (стафилококковая интоксикация).

По типу пищевых отравлений могут протекать заболевания, вызываемые некоторыми безусловно-патогенными бактериями (сальмонеллами, шигеллами, иерсиниями, эшерихиями, холерными вибрионами и др.). При выделении указанных бактерий из пищевого продукта и/или клинического (секционного) материала вместо диагноза пищевого отравления ставят диагноз соответствующей инфекции.

Следует учитывать, что определенные пищевые продукты могут быть как субстратом для размножения возбудителей пищевых отравлений, так и фактором передачи кишечных инфекций (табл. 2.26).

При микробиологической диагностике пищевого отравления обязательно учитывают клинико-эпидемиологические данные. Материал для исследования отбирает врач. Исследованию подлежат: рвотные массы, промывные воды желудка, испражнения, кровь, сыворотка крови, моча, секционный материал, остатки пищи и ее исходные компоненты. При необходимости обследуют персонал на микробоносительство, исследуют смывы с посуды и инвентаря пищеблока. Особенности диагностики являются:

обязательное проведение исследования с целью исключения роли безусловно-патогенных бактерий;

одновременное проведение исследований по нескольким направлениям;

определение количества условно-патогенных микроорганизмов в пробах;

проведение повторных исследований;

выявление в пищевом продукте и у выделенных культур специфических энтеротропных факторов патогенности (энтеротоксинов и др.);

комплексная оценка результатов исследований (сопоставление результатов исследования продукта и материалов от людей) с учетом клинико-эпидемиологических данных.

Материал для исследования отбирают как можно раньше, в асептических условиях (с использованием стерильных инструментов и герметично закрывающейся посуды) и немедленно отправляют в лабораторию, не допуская размножения в нем микроорга-

Исследования продуктов при подозрении на пищевое отравление или пищевую инфекцию

Тип (вид) пищевого продукта	Направление исследования
Ветчина	<i>S. aureus</i> и их энтеротоксины
Гамбургеры	<i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Salmonella</i> различных сероваров
Говядина и продукты, содержащие говядину	<i>Salmonella</i> различных сероваров, <i>C. perfringens</i> , <i>S. aureus</i> и их энтеротоксины, <i>E. coli</i> O157:H7, <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Toxoplasma gondii</i> , <i>Taenia saginata</i>
Свинина	<i>C. perfringens</i> , <i>S. aureus</i> и их энтеротоксины, <i>C. jejuni</i> , <i>Y. enterocolitica</i> , <i>T. gondii</i> , <i>Taenia solium</i>
Солонина	<i>S. aureus</i> и их энтеротоксины, <i>Salmonella</i> различных сероваров
Домашняя птица и продукты из нее	<i>Salmonella</i> различных сероваров, <i>C. jejuni</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>S. aureus</i> и их энтеротоксины, <i>Y. enterocolitica</i>
Рыба	<i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. cholerae</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Plesiomonas shigelloides</i> , гистамин, <i>Proteus</i> spp., <i>Morganella</i> spp., токсины рыб, <i>Diphyllobothrium</i> spp., <i>Anisakis</i> spp. и другие паразиты рыб, заражающие человека
Яйца и яичные продукты	<i>Salmonella</i> серовара <i>Enteritidis</i> и других сероваров, <i>Streptococcus pyogenes</i>
Майонез	рН, <i>E. coli</i> O157:H7
Паштеты	<i>B. cereus</i> , <i>S. aureus</i> и их энтеротоксины, патогенные варианты <i>E. coli</i>
Копченое мясо, рыба, домашняя птица	<i>Salmonella</i> различных сероваров, <i>S. aureus</i> и их энтеротоксины, <i>C. botulinum</i> и их нейротоксины
Супы, тушеное мясо, холодец	<i>B. cereus</i> , <i>C. perfringens</i>
Консервы (в первую очередь домашнего изготовления)	<i>C. botulinum</i> и их нейротоксины, рН
Блюда восточной кухни	<i>V. parahaemolyticus</i> , <i>B. cereus</i> , глутамат натрия
Ракообразные	<i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. cholerae</i> O1
Моллюски	<i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. cholerae</i> (O1 и не-O1), <i>Vibrio vulnificus</i> , <i>A. hydrophila</i> , <i>P. shigelloides</i> , токсины моллюсков, вирусы гепатита А, Норфолк и подобные

Тип (вид) пищевого продукта	Направление исследования
Моллюски	<i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. cholerae</i> (O1 и не-O1), <i>Vibrio vulnificus</i> , <i>A. hydrophila</i> , <i>P. shigelloides</i> , токсины моллюсков, вирусы гепатита А, Норфолк и подобные
Молоко сырое (или пастеризованное, загрязненное сырым)	<i>Salmonella</i> различных сероваров, <i>C. jejuni</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> и их энтеротоксины, <i>S. pyogenes</i> , <i>Y. enterocolitica</i>
Молоко кипяченое	<i>Salmonella</i> различных сероваров, <i>S. aureus</i> и их энтеротоксины
Сыр	<i>S. aureus</i> и их энтеротоксины, <i>Brucella</i> spp., <i>Salmonella</i> разных сероваров, патогенные варианты <i>E. coli</i> , а также рН, окислительно-восстановительный потенциал
Сыры мягких сортов	Те же и <i>L. monocytogenes</i>
Кондитерские изделия	<i>Salmonella</i> различных сероваров, <i>S. aureus</i> и их энтеротоксины
Изделия с кремом, заварные кремы	<i>S. aureus</i> и их энтеротоксины, <i>Salmonella</i> различных сероваров, <i>B. cereus</i> , рН, окислительно-восстановительный потенциал
Злаковые (каши), продукты с кукурузным крахмалом	<i>B. cereus</i> , микотоксины
Горох и другие бобовые	<i>C. perfringens</i> , <i>B. cereus</i>
Рис	<i>B. cereus</i>
Картофель	<i>B. cereus</i> , <i>C. botulinum</i> и их нейротоксины
Квашения	<i>S. aureus</i> и их энтеротоксины
Соленые или маринованные продукты, упакованные под вакуумом, в измененной атмосфере	<i>C. botulinum</i> и их нейротоксины, <i>L. monocytogenes</i>
Салаты из сырых овощей	<i>Shigella</i> различных видов и сероваров, патогенные варианты <i>E. coli</i>
Салаты, содержащие белок (с добавлением картофеля, яиц, мяса, домашней птицы или рыбы)	<i>S. aureus</i> и их энтеротоксины, <i>Salmonella</i> различных сероваров, <i>Shigella</i> различных видов и сероваров, <i>S. pyogenes</i> , патогенные варианты <i>E. coli</i> , рН, вирусы гепатита А, Норфолк и подобные

Тип (вид) пищевого продукта	Направление исследования
Сырые фрукты	<i>Shigella</i> различных видов и сероваров, патогенные варианты <i>E. coli</i>
Дыни	<i>Salmonella</i> различных сероваров, <i>Shigella</i> различных видов и сероваров, патогенные варианты <i>E. coli</i>
Безалкогольные напитки, фруктовые соки, концентраты (после экспозиции в металлических контейнерах или торговых автоматах)	Химические вещества (медь, цинк, кадмий, свинец, сурьма, олово), рН, окислительно-восстановительный потенциал

низмов. В сопроводительном документе указывают, помимо обычных сведений, клинико-эпидемиологические данные, которые могут помочь в выборе направления исследований.

Бактериологическое исследование. Выделение, идентификация и подсчет возбудителей пищевого отравления в исследуемом материале является основным методом диагностики. Для обнаружения безусловно-патогенных микроорганизмов на соответствующие накопительные и селективные питательные среды засевают неразведенный исследуемый материал. Для выявления условно-патогенных возбудителей готовят серийные разведения материала в 0,1%-й пептонной воде или ИХН и для посева на плотные среды берут 0,1 мл из разведений 10^{-2} — 10^{-6} (в зависимости от степени предполагаемого обсеменения). Плотные материалы перед посевом измельчают в асептических условиях с добавлением ИХН или 0,1%-й пептонной воды.

Для выделения и идентификации бактерий используют подходящие питательные среды и тесты (см. соответствующие разделы данной главы). Количество обнаруженных бактерий в исследуемом материале выражают в виде показателя КОЕ/г или КОЕ/мл. Так, если при посеве 0,1 мл из разведения 10^{-4} на чашке с питательной средой выросло 168 колоний *V. cereus*, обсемененность продукта составляет $1,7 \cdot 10^7$ КОЕ/г.

Помимо факта обнаружения бактерий и степени обсемененности ими материала, у выделенных культур выявляют эпидемиологические маркеры (серовар, фаговар и др.). Такие маркеры помогают установить идентичность культур, выделенных от больных и из подозреваемых пищевых продуктов.

В ряде случаев у выделенных культур или непосредственно в исследуемом материале определяют факторы патогенности возбу-

Диагностические критерии для расшифровки вспышек пищевых отравлений с типичной симптоматикой

Заболевание	Критерии для подтверждения этиологии заболевания или вспышки
Гастроэнтерит, вызванный <i>Bacillus cereus</i>	Выделение из кала большинства заболевших (но не от других лиц) микроорганизмов <i>B. cereus</i> одного серовара; выделение из подозреваемого продукта <i>B. cereus</i> в концентрации не менее 10^5 КОЕ/г; обнаружение энтеротоксина (на моделях перевязанной петли кишечника кролика, сосудистой реакции, методами иммунодиффузии в геле, агрегат-гемагглютинации или обратной пассивной агглютинации латекса); обнаружение «рвотного» энтеротоксина в тесте на культуре ткани <i>Нер-2</i>
Гастроэнтерит, вызванный <i>Vibrio parahemolyticus</i>	Выделение из рвотных масс или испражнений больных, употреблявших подозреваемый продукт, <i>V. parahemolyticus</i> , положительных в тесте Канагавы (продуцирующих гемолизин); выделение из подозреваемого продукта <i>V. parahemolyticus</i> , положительных в тесте Канагавы, в концентрации не менее 10^5 КОЕ/г
Энтерит, вызванный <i>Clostridium perfringens</i>	Обнаружение более 10^6 спор в 1 г фекалий большинства больных в первые дни заболевания; выделение от большинства заболевших (но не от других лиц) микроорганизмов <i>C. perfringens</i> одного серовара; выделение микроорганизмов <i>C. perfringens</i> одного серовара от заболевших и из подозреваемого продукта; обнаружение не менее 10^5 КОЕ <i>C. perfringens</i> в 1 г подозреваемого продукта; обнаружение в кале клостридиального энтеротоксина (реакция обратной пассивной геагглютинации и др.)
Энтерит, вызванный <i>Yersinia enterocolitica</i> , не относимыми к возбудителям иерсиниоза	Выделение от большинства заболевших (но не от других лиц) микроорганизмов <i>Y. enterocolitica</i> одного серовара; выделение микроорганизмов <i>Y. enterocolitica</i> одного серовара от заболевших и из подозреваемого продукта; обнаружение не менее 10^5 КОЕ <i>Y. enterocolitica</i> в 1 г подозреваемого продукта; обнаружение в продукте и у выделенных культур энтеротоксина (тест на мышцах-сосунках, реакция обратной пассивной геагглютинации и др.)

Заболевание	Критерии для подтверждения этиологии заболевания или вспышки
Ботулизм	Выделение <i>Clostridium botulinum</i> из кала больных, употреблявших подозреваемый продукт; обнаружение ботулинического токсина в сыворотке, стуле или пищевом продукте (биопроба на мышах); типичная клиническая картина у лиц, употреблявших тот же продукт, что и больные с лабораторно подтвержденным диагнозом (особое значение имеет употребление такими лицами консервированной или вяленой в домашних условиях рыбы, икры, мяса морских млекопитающих)
Стафилококковый гастроэнтерит	Выделение из рвотных масс или испражнений больных, употреблявших подозреваемый продукт, <i>S. aureus</i> одного фаговара (клона); обнаружение энтеротоксина одного серовара в пищевом продукте и у выделенных культур

дителей (чаще всего энтеротоксины). С этой целью используют различные модели: заражение лабораторных животных (ботулинический нейротоксин, стафилококковый энтеротоксин, токсины *B. cereus*, иерсиний и др.), заражение культур тканей («рвотный» токсин *B. cereus*), тесты *in vitro* (тест Канагавы для обнаружения гемолизина *V. parahemolyticus*). Кроме того, применяют иммунологические методы обнаружения токсинов (преципитация в геле, иммунодиффузия, РОНГА, реакция обратной пассивной агглютинации латекса и др.), а также геноиндикацию специфических нуклеотидных последовательностей, кодирующих синтез токсинов.

Серологическое исследование. В ряде случаев для подтверждения этиологической роли выделенных бактерий проводят ретроспективное серологическое исследование. Для этого обычно ставят реакцию агглютинации с диагностикумом из выделенной культуры и парными сыворотками переболевших (вторую сыворотку берут на 7 — 10-й день от начала заболевания). Диагноз подтверждает 4-кратное нарастание титра агглютининов.

В табл. 2.27 приведены критерии этиологической значимости широко распространенных возбудителей бактериальных пищевых отравлений.

РАЗДЕЛ II

ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ

ГЛАВА 3

МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

Для микробиологической диагностики вирусных инфекций в настоящее время применяют три основных методических подхода (приведены ниже).

Вирусологическая диагностика — основана на выделении из исследуемого материала вируса и его последующей идентификации.

Серологическая диагностика — определение специфических иммунологических изменений в организме под действием вирусов (чаще всего с помощью диагностикумов выявляют в сыворотке крови противовирусные антитела).

Молекулярно-биологическая диагностика — обнаружение в клиническом материале фрагментов нуклеиновых кислот вирусов-возбудителей с помощью зондов (гибридизация НК) или ПЦР.

3.1. Вирусологическое исследование

3.1.1. Работа с клеточными культурами

Как известно, вирусы являются генетическими внутриклеточными паразитами, способными к размножению только в живых системах. Следовательно, первым этапом вирусологической диагностики является получение и подготовка одной из живых систем: культур клеток, куриных эмбрионов или чувствительных лабораторных животных. Наиболее трудоемкой является работа с клеточными культурами, на которой следует остановиться подробнее.

На практике используют первичные, полуперевиваемые (диплоидные) и перевиваемые клеточные культуры.

Первичные клеточные культуры. Эти культуры получают непосредственно из ткани животного или человека путем разрушения протеолитическими ферментами (трипсин, коллагеназа, проназа) межклеточного вещества. Разобщенные (диспергированные) клетки, помещенные в питательную среду, способны прикрепляться к поверхности культурального сосуда и размножаться, образуя так называемый монослой — слой толщиной в одну клетку.

С помощью специальных реактивов (трипсина, версена) клетки можно снять с поверхности одного сосуда и пересадить в другой. Такая манипуляция называется пассажем. Поскольку перзичные культуры получают из уже сформировавшихся, высокодифференцированных клеток, их способность к делению и размножению ограничена. Первичные культуры выдерживают не более 5—10 пассажей.

Первичные клеточные культуры готовят из любой эмбриональной ткани животных и человека, поскольку эмбриональные клетки обладают повышенной способностью к росту и размножению. Чаще культуры клеток готовят из смеси нескольких тканей, например кожной, костной и мышечной. Так получают фибробласты эмбриона человека (ФЭЧ) и кур (КФ), клетки почек человека (КПЧ) и др. Для получения клеточных культур используют эмбриональную ткань человека (в случае прерывания беременности), а также 8—12-дневные куриные эмбрионы.

Культивирование клеток осуществляют в стеклянных или пластмассовых сосудах различной формы и размера, желателно одноразового пользования, при строгом соблюдении асептики на всех этапах.

Приготовление клеточной взвеси. Ткань, доставленную в лабораторию, отмывают от крови, жировых компонентов, клеточного детрита и других примесей в растворе Хенкса или фосфатного буфера с антибиотиками, измельчают ножницами и продолжают отмывать до полной прозрачности раствора. Затем ее заливают трипсином (на 100 г ткани — 200—300 мл раствора трипсина) и диспергируют при помощи магнитной мешалки или пипетированием. Надосадочную жидкость, содержащую трипсинизированные клетки, сливают и помещают в холодильник при 4 °С.

Трипсинизацию повторяют несколько раз. Взвесь клеток центрифугируют при 600 об/мин в течение 5—10 мин, ресуспендируют в питательной среде и окрашивают фуксином, метиленовой синью или другими красителями, а затем определяют их концентрацию в камере Горяева. Клеточную взвесь разводят питательной средой до концентрации $(4—8) \cdot 10^5$ клеток в 1 мл, разливают в культуральные сосуды, плотно закрывают резиновыми пробками и культивируют в термостате при 35—37 °С в течение 48—96 ч (пробирки кладут под углом 5°), после чего отбирают культуры с хорошо сформировавшимся монослоем.

Пассирование клеточных культур. Во флаконы с клетками после отсасывания питательной среды наливают подогретый до 37 °С раствор 0,25%-го трипсина или 0,02%-го версена и помещают их на 3—5 мин в термостат. Затем версен или трипсин удаляют, в культуральный сосуд добавляют небольшое количество питательной среды и, интенсивно взбалтывая, добиваются суспензирования клеток в питательной среде. После этого подсчитывают количе-

ство клеток, доводят их до необходимой концентрации и разливают в новые флаконы.

Перевиваемые (пассажные) клеточные культуры. Такие культуры способны выдерживать неограниченное число пассажей. Они происходят из опухолевых клеток, утративших дифференциацию и не имеющих ограничений роста. Перевиваемые (стабильные) клеточные культуры получены из разнообразных нормальных и опухолевых тканей человека: амниона (*A-0*, *A-1*, *FL*), почек (*Rh*, ППЧ), карциномы шейки матки (*HeLa*), раковой опухоли гортани (*HEp-2*), костного мозга больного раком легких (*Detroit-6*), рабдомиосаркомы эмбриона человека (*RD*) и др.

Клетки перевиваемых линий сохраняют замороженными в жидком азоте, при необходимости их оттаивают и используют для исследований.

Помимо стационарного способа культивирования с регулярными пассажами, описанного выше для первичных культур, для большинства перевиваемых клеточных культур возможно применение метода *сuspензионных культур*, при котором клетки находятся в жидкой среде во взвешенном состоянии. Модификацией данного метода является *проточное культивирование*, при котором в специальный аппарат (ферментер или роллерный культиватор) непрерывно добавляют свежую питательную среду и удаляют отработанную. Подобный метод позволяет в любой момент получить значительные количества клеточной массы для культивирования вирусов; он применяется, как правило, в крупных лабораториях или при промышленном производстве вакцин.

Полуперевиваемые (диплоидные) культуры. В результате нескольких последовательных пассажей иногда формируется так называемая диплоидная культура — популяция фибробластоподобных клеток, которые способны к быстрому размножению, выдерживают до 30—60 пассажей и сохраняют исходный набор хромосом. Диплоидные клетки человека высокочувствительны к ряду вирусов и широко используются в вирусологии, занимая промежуточное положение между первичными и перевиваемыми клеточными культурами.

Получены культуры диплоидных клеток человека (*WI-38*, *MRC-5*, *MRC-9*, *IMR-90* и др.), а также коровы, свиньи, овцы, ягненка.

Питательные среды для культур клеток. В составе этих сред имеется полный набор аминокислот, витамины, ростовые факторы. Наряду с сухими средами и отдельными компонентами выпускают готовые жидкие среды (199, Игла, гидролизат лактальбумина, сухие среды и концентраты), которые перед использованием обычно разводят в воде.

Культуральные среды делят на ростовые и поддерживающие. Для выращивания клеточных культур применяются *ростовые среды*, обогащенные сыворотками животных и человека, например бычьей

сыворотка, фетальная (эмбриональная) коровья сыворотка и др. Количество сыворотки в питательной среде обычно составляет 2—30 % и зависит от свойств культуры клеток и состава среды.

Поддерживающие среды. Их применяют для сохранения выросших монослоев клеток после заражения их вирусами. Эти среды содержат меньшее количество сыворотки или добавляются к культуре без нее. Перед использованием среды в нее вносят антибиотики для предотвращения роста случайно попавших микроорганизмов. Культуральные среды стерилизуют, а при наличии нестабильных компонентов — фильтруют. Оптимальные значения рН питательных сред (7,2—7,6) поддерживают с помощью буферных систем (чаще всего используют бикарбонатный буфер). В среды добавляют индикатор феноловый красный, который становится оранжево-желтым при закислении и малиновым при защелачивании среды.

После того как живые системы для культивирования вирусов подготовлены, дальнейшие этапы совпадают независимо от вида вирусов. Возможные отличия, связанные с различными способами культивирования, выявления и идентификации вирусов, будут рассмотрены по ходу изложения.

3.1.2. Взятие и подготовка материала для вирусологической диагностики

Для экспресс-диагностики и выделения вирусов важно взять материал у больного как можно раньше. Исследуют содержимое везикул, пустул, соскобы эпителия, спинномозговую жидкость, фекалии, мазки и смывы из верхних дыхательных путей.

Пробы для исследования нужно брать, соблюдая правила асептики, чтобы предотвратить внесение посторонней микрофлоры и не инфицировать себя. Сохраняют пробы во влажном состоянии на холоде и пересылают в контейнерах с сухим льдом. Если пробы не использованы сразу, их следует заморозить, желательно при -70°C . Такие материалы, как мазки из носоглотки и соскобы с пораженных участков кожи, погружают в стабилизирующую среду (нейтральный ИХН с белком и антибиотиками). Можно использовать также питательные среды или раствор Хенкса с добавлением 10 % инактивированной коровьей сыворотки и антибиотиков (для подавления сопутствующей микрофлоры).

3.1.3. Инфицирование живых систем вирусосодержащим материалом

Культуры клеток. Для выделения вируса отбирают пробирки со сформированным монослоем, сливают питательную среду и промывают клетки несколько раз раствором Хенкса для удаления сы-

вороточных антител и ингибиторов. В каждую пробирку вносят 0,1—0,2 мл материала, специально подготовленного для вирусологического исследования.

Для одной пробы используют не менее двух пробирок. Спустя 30—60 мин после заражения в пробирки вносят по 1 мл поддерживающей среды и помещают в термостат при 37 °С.

Чтобы исследуемый материал (фекалии и др.) не оказывал токсического действия на монослой клеток, его предварительно разводят в 1 мл питательной среды, а после контакта с культурой клеток в течение 30—60 мин его удаляют, заменяя поддерживающей средой.

Куриные эмбрионы. Вирусы культивируют на 6—15-дневных куриных эмбрионах. Материал вводят шприцем на хорионаллантоисную оболочку (ХАО), в желточный мешок, полости амниона и аллантоиса (рис. 3.1).

Для заражения на ХАО скорлупу обрабатывают иодом и спиртом, прокалывают над воздушным мешком, а сбоку, в месте наиболее разветвленных сосудов, делают отверстие размером 7 × 2 мм. Не повреждая оболочку под скорлупой, короткой тонкой иглой

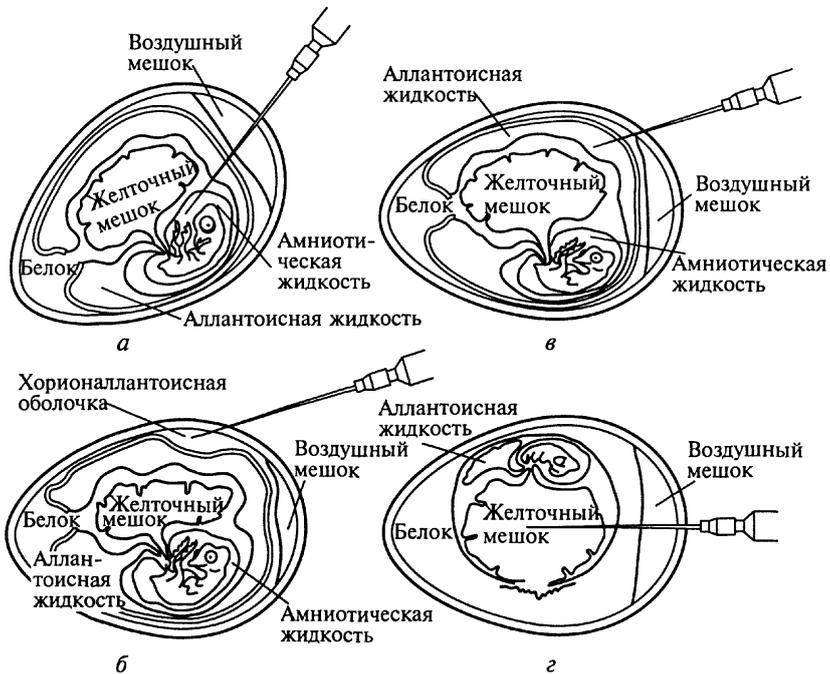


Рис. 3.1. Способы заражения куриного эмбриона:

а — в полость амниона; *б* — на хорионаллантоисную оболочку; *в* — в полость аллантоиса; *г* — в желточный мешок

на ХАО наносят 0,1—0,2 мл вирусосодержащего материала. Поврежденные участки скорлупы заливают стерильным парафином или коллодием. Эмбрионы помещают в термостат, укладывая яйца горизонтально.

Для заражения в полость аллантаоиса (см. рис. 3.1, в) исследуемый материал вводят через боковое отверстие в скорлупе на глубину 10—15 мм.

В полость амниона (см. рис. 3.1, а) вирусосодержащий материал вносят через отверстие на тупом конце яйца, игла должна быть направлена к телу эмбриона. В этом случае обеспечивается проникновение вируса в различные органы и ткани эмбриона.

Места уколов заливают парафином или коллодием.

Экспериментальные животные. Экспериментальные животные в вирусологии применяются для следующих целей:

диагностики вирусных инфекций (выделение, накопление, титрование и титрование вирусов);

получения иммунных противовирусных сывороток и ингредиентов крови (эритроцитов, лейкоцитов, плазмы и т.д.);

моделирования вирусных инфекций для изучения патогенеза, иммунитета, патоморфологии и т.д.;

разработки способов специфической и неспецифической профилактики и лечения.

Правила работы с экспериментальными животными при вирусных и бактериальных инфекциях аналогичны (см. подразд. 1.3).

3.1.4. Выявление (индикация) вирусов

В большинстве случаев перед обнаружением вируса в живой системе его следует освободить от компонентов клеток хозяина. Для этого предусмотрены следующие процедуры.

1. Для разрушения клеток в материале используют трехкратное замораживание с последующим оттаиванием или растирание материала в гомогенизаторе со стерильным песком или стеклянными бусами.

2. Для очистки от клеточного детрита и посторонних примесей полученный таким образом материал подвергают центрифугированию с последующим исследованием надосадочной жидкости или пропускают через бактериальные фильтры. При этом вирус ввиду малых размеров не осаждается при центрифугировании и не задерживается бактериальными фильтрами, оставаясь в жидкости.

3. Полученный материал обрабатывают антибиотиками (500—1000 ЕД/мл пенициллина и 200 ЕД/мл стрептомицина) для деконтаминации и предотвращения бактериального загрязнения.

Полученный таким образом материал принято называть *вирусосодержащим материалом*.

Обнаружение вирусов в культуре клеток. *Выявление по цитопатическому действию (ЦПД).* ЦПД представляет собой дегенеративные изменения в клетках, которые появляются в результате репродукции в них вирусов. Одни вирусы проявляют ЦПД в первые дни после заражения культур клеток (вирус оспы, полиомиелита и др.), другие — значительно позже, иногда спустя 1—2 нед после заражения (аденовирусы, вирусы парагриппа и др.). Характер ЦПД зависит в основном от вида вируса (рис. 3.2).

Различают полную и частичную дегенерацию клеток монослоя. При полной дегенерации, вызываемой, например, вирусами полиомиелита, Коксаки и ЕСНО, клетки монослоя подвергаются значительным изменениям, большее их количество слущивается со стекла. Остающиеся единичные клетки сморщены (пикноз ядра и цитоплазмы), для них характерно двойное лучепреломление — сильное свечение при микроскопии. Частичная дегенерация культур клеток имеет несколько разновидностей: а) по типу *гроздеобразования* — клетки округляются, увеличиваются, частично сливаются между собой с образованием особых гроздевидных скоплений (характерна для аденовирусов); б) по типу *очаговой деструкции* — на фоне в целом сохранившегося монослоя появляются очаги пораженных клеток — микробляшки (характерна для некоторых штаммов вирусов оспы, гриппа); в) по типу *симпластообразования* — под действием вирусов клетки сливаются между собой с образованием гигантских многоядерных

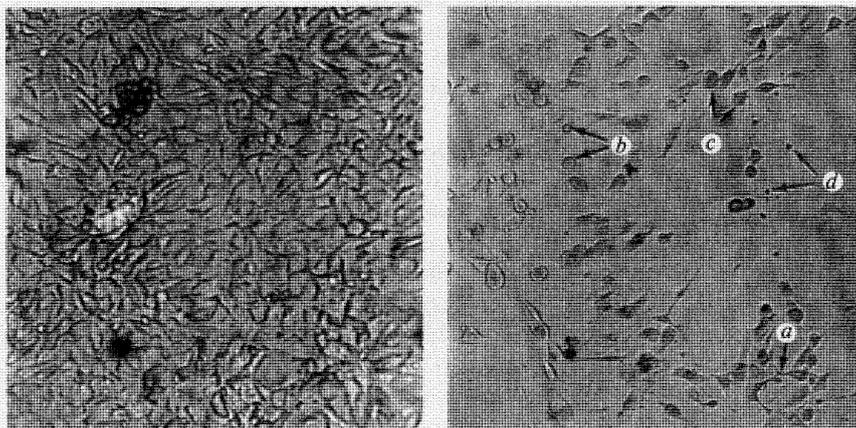


Рис. 3.2. Цитопатическое действие вируса полиомиелита на культуре клеток почки обезьяны в неокрашенных препаратах (слева — незараженный монослой):

видно разрушение монослоя и признаки клеточной дегенерации (*a* — сморщивание и образование звездчатых клеток, *b* — округление клеток, *c* — вздутие клеток, *d* — лизис и образование гранулярного детрита)

клеток — симпластов, синцитиев (характерна для вирусов кори, паротита, парагриппа, респираторно-синцитиального, герпеса, иммунодефицита человека).

Пролиферативный тип изменений характерен для некоторых онкогенных вирусов, трансформирующих клетки в злокачественные, что проявляется в приобретении ими способности к неограниченному делению.

Если в инфицированных культурах клеток ЦПД отсутствует или слабо выражено, проводят «слепые пассажи», т. е. заражают культуральной жидкостью новые культуры клеток.

Выявление по реакции гемадсорбции (РГадс). Эта реакция позволяет выявить вирусы до развития ЦПД благодаря адсорбции эритроцитов на поверхности клеток, инфицированных гемадсорбирующими вирусами. Эти сложные вирусы имеют в составе суперкапсида специфические гликопротеиды — гемагглютинины (например, орто- и парамиксовирусы). Для воспроизведения РГадс в культуру клеток (контрольную и зараженную вирусом) после определенного для каждого вируса срока инкубации добавляют 0,2 мл 0,5%-й взвеси эритроцитов так, чтобы был покрыт монослой и оставляют ее на 15—20 мин при 4, 20 или 37 °С (в зависимости от свойств вируса). Затем пробирки встряхивают для удаления неадсорбированных эритроцитов и учитывают под малым увеличением микроскопа скопление их на отдельных клетках или на всем монослое. На незараженных клетках эритроцитов не должно быть. Следует отметить, что не все вирусы, агглютинирующие эритроциты *in vitro*, способны вызывать гемадсорбцию в культуре клеток. Гемадсорбция наблюдается лишь в том случае, если в процессе взаимодействия вируса с клеткой вирусный гемагглютинин встраивается в структуру наружной клеточной мембраны и тем самым изменяет ее свойства.

Выявление по цветной пробе. Принцип данного теста заключается в следующем. В результате жизнедеятельности клеток в питательной среде накапливаются кислые продукты. В результате цвет входящего в состав среды индикатора (фенолового красного) становится оранжевым. При заражении культуры клеток такими цитопатогенными вирусами, как энтеровирусы или реовирусы, метаболизм клеток подавляется, рН среды и ее цвет не изменяются (она остается красной).

Выявление по внутриклеточным включениям. Внутриклеточные включения образуются при репродукции некоторых вирусов в цитоплазме и ядре клеток (оспы, бешенства, гриппа, герпеса и др.). Они представляют собой участки локализации вирусов и их компонентов в клетках. Включения обнаруживают при микроскопии после окраски монослоя по Романовскому—Гимзе или другими сложными методами, а также при люминесцентной микроскопии после обработки акридиновым оранжевым (1 : 20 000).

Электронно-микроскопическое выявление (ЭМВ). Это исследование дает возможность в зависимости от вида вируса выявить в клетках отдельные вирионы и их кристаллоподобные скопления в ядре или цитоплазме. ЭМВ, как правило, используется для обнаружения возбудителей вирусных инфекций с типичной морфологией (оспенные вирусы), особенно в тех случаях, когда их не удастся культивировать обычными методами (вирусы гепатитов А и В, ротавирусы). Вирусы, содержащиеся в исследуемом материале, очищают и концентрируют ультрацентрифугированием, колоночной хроматографией, адсорбцией с помощью специальных сорбентов или антител. Последний способ лежит в основе метода иммунной электронной микроскопии (ИЭМ).

Препараты для ЭМВ готовят методом негативного контрастирования. Для этого смешивают равные объемы вирусной суспензии и 1%-го раствора фосфорно-вольфрамовой кислоты («негативная краска») на формваруглеродной подложке. «Краска» окружает вирусную частицу и контрастирует наружную оболочку вириона, а иногда проникает внутрь капсида, в результате чего получают профильное изображение наружной оболочки. Для выявления вирусов в биологическом материале применяют также метод ультратонких срезов.

Выявление с помощью прямой РИФ. Как и при ИЭМ, в данном случае происходит взаимодействие вирусных антигенов с АТ диагностической иммунной сыворотки или моноклональными антителами (см. подразд. 1.4.5). С помощью РИФ также удается обнаружить специфический вирусный антиген в культурах клеток, инфицированных вирусом.

Выявление по образованию бляшек. Бляшки вирусов представляют собой очаги разрушенных вирусом клеток монослоя под агаровым покрытием. Вирусные бляшки подсчитывают для количественного анализа инфекционной активности вирусов.

Для получения бляшек разные разведения вирусной суспензии наносят на однослойные культуры ткани в плоских флаконах или чашках Петри и покрывают их слоем агарового покрытия. При этом репродукция вируса и ЦПД ограничиваются только первоначально инфицированными и соседними с ними клетками. Очаги клеточной дегенерации (бляшки) выявляют путем окрашивания культуры нейтральным красным, который либо включают в состав агарового покрытия, либо добавляют непосредственно перед учетом результатов. Бляшки состоят из погибших клеток, не окрашиваются нейтральным красным и поэтому выглядят в виде светлых пятен на фоне розово-красного монослоя.

Известны и другие способы выявления вирусных бляшек в культурах клеток. Так, например, используется определение бляшек под *бентонитовым покрытием*. Мелкодисперсный очищенный бентонит добавляют к жидкой питательной среде, и этой смесью за-

ливают инфицированный монослой клеток. В результате адсорбции частиц бентонита на поверхности клеток монослой приобретает молочный цвет. В месте размножения вируса, где клетки частично или полностью слущены со стекла, бентонитовое покрытие нарушено (бляшки).

Для выявления вирусных бляшек под бентонитовым питательным покрытием применяют многослойные культуры перевиваемых клеток человека или животных, чувствительные к исследуемому вирусу; пригодны 1—2-суточные негустые монослои клеток. Готовят 10-кратные разведения из исследуемого материала, каждым разведением инфицируют не менее двух матрасов (колб Эрленмейера или пенициллиновых флаконов) с культурой клеток. После адсорбции вируса (30—40 мин) монослои 3—4 раза отмывают стерильным ИХН и заливают бентонитовым питательным покрытием: бидистиллированная вода — 415 мл, 5—6%-й гель бентонита — 5 мл, раствор Эрла (десятикратный концентрат) — 50 мл, нативная бычья сыворотка — 15 мл, 7,5%-й раствор гидрокарбоната натрия — 15 мл, пенициллин — 200 ЕД/мл, стрептомицин или линкомицин — 100 ЕД/мл. Монослой зараженных клеток в колбах Эрленмейера емкостью 50 мл заливают 20—30 мл бентонитового покрытия, а монослой клеток на дне пенициллинового флакона — 5—6 мл.

Гель бентонита получают из сухого минерала. Чтобы улучшить сорбционные свойства бентонита, его насыщают катионами натрия. Затем его стерилизуют 40 мин при 111 °С. Сорбционные свойства геля бентонита не изменяются в процессе хранения при комнатной температуре в течение ряда лет.

Время бляшкообразования под бентонитовым покрытием для различных вирусов неодинаково. Результаты образования бляшек для энтеровирусов, например, учитывают через 36—48 ч. Культуральные сосуды переворачивают монослоем вверх, смывая средой дегенерировавшие клетки. Бляшки, образуемые различными типами энтеровирусов, отличаются по величине, интенсивности развития и характеру краев. Поскольку одна вирусная инфекционная частица (вирион) образует одну бляшку, метод бляшкообразования позволяет точно определить количество инфекционных единиц в материале, а также измерить нейтрализующую активность вирусных антител.

Обнаружение вируса в куриных эмбрионах. Зараженные эмбрионы выдерживают в термостате при 35—37 °С в течение 48—72 ч в зависимости от вида изучаемого вируса. Затем яйца охлаждают при 4 °С в течение 18 ч для максимального сужения кровеносных сосудов эмбриона и асептически вскрывают. Амниотическую и аллантоисную жидкость отсасывают шприцем, оболочки и эмбрион извлекают в стерильные чашки Петри.

Выявление по изменению ХАО. При репродукции вирусов в куриных эмбрионах появляются характерные изменения на ХАО. Вирусы натуральной оспы, осповакцины, простого герпеса на ХАО образуют бляшки — беловатые выпуклые пятна диаметром 1—

2 мм, количество которых соответствует числу инфекционных частиц.

Реакция гемагглютинации (РГА). Показателем накопления ортомиксовирусов и парамиксовирусов является гемагглютинация куриных или других эритроцитов аллантоисной и/или амниотической жидкостью зараженных эмбрионов. Концентрация вирусных частиц соответствует гемагглютинационному титру (максимальное разведение вирусосодержащей жидкости, вызывающее агглютинацию эритроцитов). Реакция основана на способности гемагглютинирующих вирусов (орто- и парамиксовирусы, аденовирусы и др.) склеивать (агглютинировать) эритроциты определенных видов животных, птиц или человека. Эти вирусы содержат поверхностные структуры, как правило, гликопротеидной природы — гемагглютинины, ответственные за агглютинацию эритроцитов. Следует подчеркнуть, что РГА не является иммунологической реакцией, так как в ее основе нет взаимодействия АГ и АТ, ведущего к образованию иммунного комплекса.

РГА ставят в пробирках, на специальных полистироловых планшетах, в аппарате Такачи. Из вирусосодержащего материала готовят двукратные разведения в 0,5 мл ИХН. Во все пробирки добавляют 0,5 мл 1%-й взвеси эритроцитов, трижды отмытых в ИХН. Для контроля смешивают 0,5 мл эритроцитов с равным объемом ИХН, не содержащего вируса. В зависимости от свойств изучаемого вируса инкубацию смеси можно проводить в термостате при 37, 20 или 4 °С. Результаты реакции учитывают через 30—60 мин после полного оседания эритроцитов в контроле: (++++) — интенсивная и быстрая агглютинация эритроцитов, осадок имеет вид коврика с фестончатыми краями («зонтик»); (+++) — осадок эритроцитов имеет просветы; (++) — менее выраженный осадок; (+) — хлопьевидный осадок эритроцитов, окруженный зоной комочков склеенных эритроцитов и (–) — компактный осадок эритроцитов такой же, как в контроле. Как указано выше, титром вируса называют его наибольшее разведение, при котором еще наблюдается агглютинация эритроцитов. Это разведение считают содержащим одну гемагглютинирующую единицу вируса (1 ГЕ).

Результаты РГА зависят от ряда факторов: видовой и индивидуальной чувствительности эритроцитов, температуры, рН среды и т.д. Гемагглютинацию эритроцитов могут вызывать и некоторые микроорганизмы — стафилококки, эшерихии, а также сальмонеллы, шигеллы, холерный вибрион Эль-Тор. Поэтому при выявлении вирусов в материале, загрязненном бактериями, нужно с осторожностью подходить к оценке результатов реакции.

Титрование вирусов можно проводить *на кусочках хорионаллантоисной оболочки*. В лунки стерильных пластин помещают кусочки скорлупы 11—12-дневного куриного эмбриона с неповрежденной ХАО, добавляют 0,5—1,0 мл вирусосодержащей жидкости,

десятикратно разведенной буфером, накрывают пластины фольгой и инкубируют при 35—37 °С.

Состав буфера: натрия хлорид — 8,0 г, калия хлорид — 0,6 г, глюкоза — 0,3 г, магния хлорид ($\cdot 6\text{H}_2\text{O}$) — 0,05 г, кальция хлорид ($\cdot 6\text{H}_2\text{O}$) — 0,8 мл, феноловый красный, 1 : 100 — 10,0 г, натрия гидроксид (1М) — 0,2 мл, желатин — 2,0 г, антибиотики.

Через 24—72 ч удаляют из лунок скорлупу, а к оставшейся среде добавляют 0,5%-ю взвесь куриных эритроцитов. Положительная РГА указывает на репродукцию вируса.

Обнаружение вирусов в организме лабораторных животных. Способы обнаружения вируса в организмах чувствительных животных различаются в зависимости от вида животного и типа вируса и будут рассмотрены в главах, посвященных диагностике отдельных инфекций.

3.1.5. Идентификация выделенных вирусов

Идентификацию вирусов проводят по следующим признакам: вирусиндуцированным патологическим изменениям в чувствительных живых системах;

антигенным свойствам вирусов в серологических реакциях с противовирусными видовыми и типовыми сыворотками (является основной и достаточно точной идентификацией);

выявлению вирусной НК, например, методом ПЦР;

результатам электронно-микроскопического изучения морфологии вирусов.

Идентификация по антигенной структуре. *Реакция нейтрализации (РН).* Реакция нейтрализации инфекционного и цитопатического действия вирусов воспроизводится в чувствительных к вирусу живых системах. РН основана на нейтрализации инфекционной активности вирусов при связывании со специфическими противовирусными антителами.

Из материала, содержащего вирус, готовят серийные разведения и добавляют к ним специфическую сыворотку в разведении в соответствии с титром, указанным на этикетке ампулы. Смеси вирус-сыворотка инкубируют 30—60 мин при 37 °С для обеспечения связывания антигенов с антителами. После этого смесью заражают культуру ткани, куриные эмбрионы или лабораторных животных. Контролем служит чувствительная система, зараженная вирусом без сыворотки.

Положительной считают реакцию в случае нейтрализации ЦПД в культуре клеток, патологических изменений в куриных эмбрионах или организме животных. На основании результатов РН определяют индекс нейтрализации — отношение титра вируса (где еще имеется ЦПД) в контроле к титру вируса в опыте. Если индекс нейтрализации менее 10 — реакция отрицательная, от 11 до

49 — сомнительная, от 50 и выше — положительная (достоверное соответствие вируса антисыворотке).

Наиболее чувствительным вариантом РН является подавление вирусного бляшкообразования под действием вирусспецифической антисыворотки (реакция редукции вирусных бляшек). При постановке этой реакции к вирусосодержащему материалу (50—100 БОЕ — бляшкообразующих единиц) добавляют антисыворотку (в разведении, соответствующем титру) и после инкубации в термостате в течение 30—60 мин смесь наносят на монослой чувствительных культур клеток. Бляшкообразование выявляют вышеописанными методами (с применением агарового или бентонитового покрытия). Соответствие вируса антителам сыворотки проявляется подавлением бляшкообразования (в сравнении с контролем). РН позволяет определить видовую и типовую (вариантную) принадлежность вируса.

Одним из вариантов РН является цветная проба (колориметрическая реакция нейтрализации). При положительном результате противовирусные антитела блокируют размножение вируса в культуре клеток, и под действием кислых метаболитов последних в среде меняется цвет индикатора. В пробирку вносят по 0,25 мл рабочего разведения вируса (100—1000 ЦПД₅₀) и соответствующего разведения сыворотки. Смесь выдерживают при комнатной температуре 30—60 мин, добавляют в каждую пробирку по 0,25 мл клеточной суспензии и закрывают их резиновыми пробками или заливают стерильным вазелиновым маслом. Пробирки помещают в термостат на 6—8 дней при 37 °С. Результаты реакции учитывают колориметрически: рН 7,4 и выше указывает на репродукцию вируса, 7,2 и ниже — на нейтрализацию вируса антителами.

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА). Эта реакция основана на блокировании вирусных гемагглютининов специфическими антителами. Ее можно рассматривать как частный случай реакции нейтрализации. РТГА может быть использована как для серологической диагностики, так и для идентификации гемагглютинирующих вирусов. Феномен РТГА проявляется в образовании компактного осадка эритроцитов вместо «зонтика» гемагглютинации. Реакцию проводят на полистироловых пластинах и оценивают по отсутствию склеивания эритроцитов, добавленных к смеси вируса и специфической сыворотки. Для удаления или разрушения неспецифических ингибиторов гемагглютинации сыворотки, используемые для РТГА, предварительно обрабатывают периодатом калия, каолином, бентонитом, ацетоном или другими веществами. Затем готовят двукратные разведения сыворотки в ИХН и к каждому разведению добавляют равное количество вирусосодержащей жидкости с активностью 4 ГЕ. Смесь инкубируют 30—60 мин при необходимой для данного типа вирусов температуре (0, 4, 20, 37 °С), а затем добавляют равный объем 0,5—

1,0%-й взвеси эритроцитов. После этого смесь снова инкубируют в течение 30—45 мин и учитывают результаты реакции. Титром сыворотки считают ее наибольшее разведение, которое «тормозит» гемагглютинацию. Для РТГА широко применяется также микрометод с использованием микропланшетов и делютеров Такачи (для разведения материала).

Реакция торможения гемадсорбции (РТГадс). Данная реакция основана на нейтрализации эффекта адсорбции эритроцитов на поверхности клеток, инфицированных вирусами. РТГадс используется для идентификации гемадсорбирующих вирусов. По 0,2 мл специфической сыворотки, разведенной 1 : 5, вносят в пробирки и после инкубации в течение 30—60 мин добавляют по 0,2 мл 0,5%-й взвеси эритроцитов. В контрольные пробирки закапывают нормальную сыворотку (неиммунную сыворотку того же вида животного) и эритроциты. Пробирки инкубируют 20—30 мин при температуре, оптимальной для гемадсорбции выделяемого вируса. О видовой принадлежности вируса судят по отсутствию адсорбции эритроцитов в опыте при типичной гемадсорбции в контрольных пробирках.

Для антигенной идентификации вирусов в клеточных культурах можно также использовать РПГ, РСК, РИФ, РОПГА ИФА, РИА со специфическими иммунными противовирусными сыворотками или моноклональными АТ. Методики этих реакций описаны в подразд. 3.2.

Идентификация по другим признакам. Специфические вирусиндуцированные патологические изменения в живых системах и морфологические свойства вирусов приведены при рассмотрении конкретных вирусных инфекций. Молекулярно-биологические методы диагностики вирусных инфекций детально описаны в подразд. 1.7.

3.2. Серологическое исследование

Серологическая диагностика вирусных инфекций основана на выявлении в крови большого противовирусных антител в серологических реакциях с использованием специфических вирусных антигенов — диагностикумов или специфических тест-систем. В основе большинства серологических реакций при вирусных инфекциях лежит реакция взаимодействия вирусных антигенов и гомологичных антител в жидкой среде (РСК, РТГА, РНГА, РОНГА, РТОНГА, РИА), в геле (РПГ, РРГ, РВИЭФ), при фиксации одного из ингредиентов на твердой основе (ИФА, ИЭМ, РГадсТО, РИФ, РГадс, РТГадс).

Для выявления антител асептически берут стерильным сухим шприцем 15—20 мл крови, не добавляя антикоагулянтов и консервантов, так как они могут повлиять на результаты серологи-

ческого исследования. Цельную кровь нельзя замораживать, так как это ведет к гемолизу. Сыворотку хранят при -20°C . Нарастание титра антител определяют путем исследования *парных сывороток*, взятых в начале и в разгаре болезни или в периоде реконвалесценции. Для постановки диагноза достоверным считается нарастание титра антител в четыре и более раз.

Для повышения чувствительности тестов антигены или антитела адсорбируют на эритроцитах (РНГА, РОНГА, РТОНГА, РГадСТО, РРГ), метят их ферментами (ИФА), радиоактивными изотопами (РИА, РПГ), флюорохромами (РИФ) или же используют принцип лизиса эритроцитов при взаимодействии антигенов и антител в присутствии комплемента (РСК, РРГ).

Методики перечисленных серологических реакций подробно описаны в разделах, посвященных выявлению и идентификации вирусов в культурах клеток. Здесь мы приводим их особенности и модификации, которые применяются при серологической диагностике вирусных инфекций.

Реакция связывания комплемента (РСК). В вирусологии РСК используется для серологической ретроспективной диагностики многих вирусных инфекций, а также для определения вирусспецифических антигенов в различных материалах, полученных от больных.

Особенностями РСК в вирусологии является осуществление связывания комплемента на холоде (в течение ночи при $+4^{\circ}\text{C}$), а также включение дополнительного контроля с так называемым нормальным антигеном (антигены из клеток, в которых репродуцировался вирус). Этот антиген используется в том же разведении, что и вирусный. Рабочее разведение комплемента готовят *ex tempore* за 1—2 ч до использования и хранят при 4°C . Реакцию можно ставить микрометодом (табл. 3.1).

Реакция радиального гемолиза (РРГ). Реакция основана на феномене гемолиза сенсibilизированных антигеном эритроцитов под влиянием вирусспецифических антител в присутствии комплемента в агарозном геле. Метод широко применяется для серологической диагностики гриппа, ряда других респираторных инфекций, краснухи, паротита, арбовирусных инфекций, вызываемых тогавирусами.

Агарозу (30 мг) расплавляют в 2,5 мл фосфатного буфера (рН 7,2), охлаждают до 42°C и смешивают с 0,3 мл сенсibilизированных эритроцитов и 0,1 мл комплемента.

Для постановки реакции бараньи эритроциты отмывают фосфатным буфером (рН 7,2) и готовят 0,3 мл 10%-й суспензии с оптимальным для данного вируса рН (например, для вируса клещевого энцефалита рН 6,2—6,4). К эритроцитам добавляют 0,1 мл неразведенного антигена, тщательно смешивают и оставляют при комнатной температуре на 10 мин. Сенсibilизированные эритроциты осаждают центрифугированием в те-

Титрование антител в РСК (микрометодом) для диагностики вирусных инфекций

Ингредиент и последовательность операций	Разведение сыворотки и количество вносимых ингредиентов, мл							Контроль					
	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	исследуемой сыворотки на реакцию с АГ хозяина	исследуемой сыворотки на антикомплемментарность	антигенов на антикомплемментарность		гемолитической системы	сенсibilизированных эритроцитов
										специфического	контрольного антигена хозяина		
Исследуемая сыворотка	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	Исследуемая сыворотка 1 : 4 0,025	Исследуемая сыворотка 1 : 4 0,025	ИХН 0,025	ИХН 0,025	ИХН 0,025	ИХН 0,025
Антиген (2 ед.)	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	Контрольный антиген хозяина 0,025	ИХН 0,025	Специфичный антиген 0,025	Контрольный антиген 0,025	—	—
Комплемент (2 ед.)	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	Комплемент 0,025	Комплемент 0,025	Комплемент (ед): 2,0; 1,5; 1,0; 0,5; 0,025	Комплемент (ед): 2,0; 1,5; 1,0; 0,5; 0,025	Комплемент 0,025	—

<i>Инкубация в течение ночи при 4 °С и 15 мин при комнатной температуре</i>														
Гемоли- тическая система	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,05; 0,05; 0,05; 0,05	0,05; 0,05; 0,05; 0,05	Суспен- зия сен- сibili- зирова- нных эри- троцитов 0,050	Суспен- зия сен- сibili- зирова- нных эри- троцитов 0,050
Пример учета РСК	+	+	+	-	-	-	-	Гемолиз	Гемолиз	Гемолиз	Гемолиз	Гемолиз	Гемолиза нет	
Интерпретация результата: обнаружены специфические комплементсвязывающие антитела в титре 1: 1 6														

Примечание. При учете знаком «+» обозначено отсутствие гемолиза (положительный результат), «-» — наличие гемолиза (отрицательная РСК).

чение 10 мин при 1000 об/мин, осадок отмывают фосфатным буфером (рН 7,2) и ресуспензируют в 0,3 мл боратно-фосфатного буфера (рН 6,2—6,4).

Добавляют 1 каплю борной кислоты. Смесь осторожно перемешивают и теплой пипеткой емкостью 5 мл разливают в лунки специальных полистироловых панелей (или на предметные стекла). Толщина слоя не должна превышать 2 мм. Через 3—4 мин после застывания агарозы панель закрывают крышкой, переворачивают и оставляют на 30 мин при комнатной температуре. В застывшей агарозе вырезают отверстия с помощью пробойника и наполняют их исследуемой и контрольной сыворотками. Панель закрывают крышкой и помещают в перевернутом положении во влажную камеру (чашки Петри со смоченным кусочком ваты) при 37 °С на 16—18 ч.

Результаты реакции учитывают по величине зоны гемолиза вокруг отверстий, заполненных сывороткой. В контроле гемолиза быть не должно.

3.3. Экспресс-диагностика вирусных инфекций

В последнее время для экспресс-диагностики вирусных инфекций используют также ряд методов, направленных на выявление вирусов или их компонентов в различных видах клинического материала. По сути их можно отнести к методам вирусологической или серологической диагностики; их отличает высокая специфичность и чувствительность.

Реакция иммунофлюоресценции. РИФ применяют в прямом и непрямом вариантах (см. подразд. 1.4.5) для выявления вируса в материале, полученном от больных, в инфицированных культурах клеток и организме животных (табл. 3.2).

Имунная электронная микроскопия. ИЭМ позволяет обнаружить специфически связанные с антителами вирусные частицы. Преимуществом этого метода является одновременная концентрация вируса и его идентификация с помощью специфической сыворотки. Предложенные модификации ИЭМ предусматривают обработку вирусосодержащего материала антисывороткой в высоком титре, добавление к осадку фосфорно-вольфрамовой кислоты или уранилацетата с последующим нанесением на пленку (подложку) и высушиванием. При электронной микроскопии видны скопления вирусных частиц.

ИЭМ используют также для выявления в биологическом материале полиовирусов, цитомегаловирусов, вирусов гепатита А и В, некультивируемых аденовирусов в ткани миндалин, некультивируемых энтеро- и ротавирусов в фекалиях, вирусов оспы в оспенном детрите.

Диагностика вирусных инфекций при помощи РИФ

Вирусная инфекция	Материал для иммунофлюоресцентного исследования	
	от больных для экспресс-диагностики	из инфицированных культур клеток и животных для выявления и идентификации вируса
Грипп	Слушенные эпителиальные клетки носовых ходов, кусочки легких и трахеи, полученные при аутопсии	Первичные культуры клеток почек обезьян, эпителиальные клетки носовых ходов от экспериментально зараженных хорьков
Парагрипп	То же	Культуры клеток почек обезьян, эмбрионов человека, СОЦ, <i>HEp-2</i>
Аденовирусная	Соскоб с конъюнктивы	Культуры клеток (<i>Hela</i> , <i>HEp-2</i> , <i>KB</i> и др.)
Респираторно-синцитиальная	То же	Культуры клеток (<i>HEp-2</i> , <i>Hela</i> ; диплоидные человека)
Корь	Эпителиальные клетки в осадке мочи, смывы из глотки, лейкоциты крови, биопсийные и секционные препараты мозга	—
Краснуха	—	Культуры клеток почек кролика, обезьян, <i>RK</i> , <i>Vero</i> , <i>SIRK</i> , ВНК-21 Культуры клеток почек обезьян
Энтеровирусная	Секционные препараты миокарда (Коксаки), эпителиальные клетки в осадке мочи	Культуры клеток почек обезьян
Паротит	—	Культуры клеток почек обезьян, амниона человека, куриных фибробластов
Бешенство	Биопсийные препараты мозга	Мазки-отпечатки мозга и слюнных желез инфицированных мышей
Герпетическая	Мазки из содержимого везикул, соскоба везикул и роговицы, секционные и биопсийные препараты мозга	Культуры диплоидных клеток <i>WI-38</i> , фибробластов; срезы ткани мозга зараженных мышей

Вирусная инфекция	Материал для иммунофлюоресцентного исследования	
	от больных для экспресс-диагностики	из инфицированных культур клеток и животных для выявления и идентификации вируса
Цитомегало-вирусная	Лейкоциты крови	Культуры диплоидных клеток <i>WI-38</i> , фибробластов
Ветряная оспа	Мазки из содержимого везикул	То же
Натуральная оспа	Соскобы с макул и папул, мазки из содержимого везикул	Культуры клеток эпителиального происхождения <i>Hela</i> , <i>Vero</i> и др.
Арбовирусная	Лейкоциты крови (при крымской геморрагической, денге, колорадской лихорадках)	Культуры клеток эмбриона курицы, почек эмбриона свиньи, ВНК-21, СПЭВ, ПЭС; препараты слюнных желез переносчиков, гемолимфа клещей
Гепатит В	Биопсийные и секционные препараты печени	—
Ротавирусная	Клетки желудка и кишок в фекалиях	—

Встречный иммуноэлектрофорез. РВИЭФ в вирусологической диагностике широко применяется для обнаружения в сыворотках больных не антител, а поверхностных антигенов (например, *HBsAg* у больных гепатитом В), а также для выявления других вирусных антигенов, имеющих отрицательный заряд.

На стеклянную пластину наносят слой агара. После затвердения в нем вырезают два параллельных ряда лунок. Антигены помещают в лунки, расположенные ближе к катоду, а антитела — в лунки, находящиеся ближе к аноду, и проводят электрофорез. *HBsAg*, имея отрицательный заряд, передвигается к аноду, а антитела — к катоду. Затем стекла помещают во влажную камеру и через 12—24 ч учитывают результаты реакции по образованию линий преципитации между искомым антигеном и антителом.

Реакция гемадсорбции на твердой основе. РГадСТО можно считать сочетанием ИФА с РНГА. Высокая чувствительность реакции позволяет применять ее для экспресс-диагностики вирусных инфекций.

Методика. Лунки полистироловых панелей одноразового использования обрабатывают иммунным глобулином (иммунной сывороткой) и вносят в них суспензию исследуемого материала, содержащего антиген.

Через 30—60 мин лунки многократно промывают буфером, добавляют взвесь эритроцитов, покрытых специфическим иммуноглобулином, и спустя 30—60 мин определяют наличие гемагглютинации.

Если в материале содержится специфический антиген, он соединяется с сывороткой, адсорбированной на поверхности лунок, и, в свою очередь, связывает иммуноглобулины на поверхности эритроцитов. В результате происходит агрегация эритроцитов (гемагглютинация). В описанной модификации реакция применяется для выявления антигенов ротавирусов и других вирусов в фекалиях больных.

Молекулярно-биологические методы. ПЦР и другие методы генодиагностики, применяемые для экспресс-диагностики вирусных инфекций, детально описаны в подразд. 1.7.

Выбор вышеперечисленных методов лабораторной диагностики отдельных вирусных инфекций определяется характером заболевания, клиническими особенностями течения, биологическими свойствами возбудителя, периодом болезни и возможностями лаборатории.

ГЛАВА 4 МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ОТДЕЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ

4.1. Грипп

Грипп — острое инфекционное заболевание, проявляющееся общей интоксикацией и поражением респираторного тракта. Возбудители гриппа — РНК-содержащие вирусы семейства *Orthomyxoviridae* (род *Influenzavirus*, типы А, В и С).

Лабораторная диагностика гриппа включает экспресс-методы, выделение вируса и серологическое исследование (см. прил.).

Для изучения используют смыв с носовой части глотки, отделяемое слизистой оболочки носовых ходов, которое берут с помощью сухих или влажных тампонов. Тампоны помещают в пробирки, содержащие 2—5 мл буфера (рН 7,0—7,2), или делают отпечатки на стекле. Кроме того, вирус можно выделить из крови, спинномозговой жидкости, а также трупного материала (кусочки пораженных тканей верхних дыхательных путей, головного мозга и др.).

Экспресс-диагностика. Обнаружение в исследуемом материале вируса гриппа основано на выявлении специфического вирусного антигена с помощью *прямой* и *непрямой* РИФ. При наличии вируса гриппа в клетках эпителия обнаруживается зеленовато-желтое свечение (см. цв. вклейку, рис. 16).

Через 30—60 мин лунки многократно промывают буфером, добавляют взвесь эритроцитов, покрытых специфическим иммуноглобулином, и спустя 30—60 мин определяют наличие гемагглютинации.

Если в материале содержится специфический антиген, он соединяется с сывороткой, адсорбированной на поверхности лунок, и, в свою очередь, связывает иммуноглобулины на поверхности эритроцитов. В результате происходит агрегация эритроцитов (гемагглютинация). В описанной модификации реакция применяется для выявления антигенов ротавирусов и других вирусов в фекалиях больных.

Молекулярно-биологические методы. ПЦР и другие методы генодиагностики, применяемые для экспресс-диагностики вирусных инфекций, детально описаны в подразд. 1.7.

Выбор вышеперечисленных методов лабораторной диагностики отдельных вирусных инфекций определяется характером заболевания, клиническими особенностями течения, биологическими свойствами возбудителя, периодом болезни и возможностями лаборатории.

ГЛАВА 4 МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ОТДЕЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ

4.1. Грипп

Грипп — острое инфекционное заболевание, проявляющееся общей интоксикацией и поражением респираторного тракта. Возбудители гриппа — РНК-содержащие вирусы семейства *Orthomyxoviridae* (род *Influenzavirus*, типы А, В и С).

Лабораторная диагностика гриппа включает экспресс-методы, выделение вируса и серологическое исследование (см. прил.).

Для изучения используют смыв с носовой части глотки, отделяемое слизистой оболочки носовых ходов, которое берут с помощью сухих или влажных тампонов. Тампоны помещают в пробирки, содержащие 2—5 мл буфера (рН 7,0—7,2), или делают отпечатки на стекле. Кроме того, вирус можно выделить из крови, спинномозговой жидкости, а также трупного материала (кусочки пораженных тканей верхних дыхательных путей, головного мозга и др.).

Экспресс-диагностика. Обнаружение в исследуемом материале вируса гриппа основано на выявлении специфического вирусного антигена с помощью *прямой* и *непрямой* РИФ. При наличии вируса гриппа в клетках эпителия обнаруживается зеленовато-желтое свечение (см. цв. вклейку, рис. 16).

Для выявления специфического гриппозного антигена можно также использовать РОНГА и ИФА. Перспективным методом экспресс-диагностики является ИФА для индикации М-белка вируса гриппа. Разработана также ПЦР.

Выделение вируса. Вирусологическое исследование следует проводить как можно раньше, так как после 3-го дня болезни вероятность получения положительного результата резко уменьшается.

Для подавления бактериальной флоры исследуемый материал обрабатывают антибиотиками (500—1000 ЕД/мл пенициллина и 200 ЕД/мл стрептомицина) и вводят по 0,2 мл его 10—11-дневным куриным эмбрионам в полость амниона и аллантоиса (см. подразд. 3.1.3). Материалом одной пробы заражают не менее пяти эмбрионов, которые инкубируют в течение 3—4 дней при 37 °С. После инкубации эмбрионы охлаждают в течение 2—4 ч при 4 °С. Аллантоисную жидкость отсасывают шприцем или пастеровской пипеткой, амниотическую — шприцем с короткой иглой. Накопление вируса в куриных эмбрионах обнаруживают с помощью РГА, для чего аллантоисную и амниотическую жидкости серийно разводят и добавляют 1%-ю суспензию куриных эритроцитов. Инфекционным материалом можно также заражать культуры клеток почек обезьян, эмбриона человека и другие, используя питательные среды без сыворотки. Однако эти методы употребляются реже, чем заражение куриных эмбрионов. Вирус выявляют с помощью РИФ, а также по ЦПД, РГадс с 0,4%-й суспензией эритроцитов морской свинки.

Для идентификации вирусов применяют РТГадс, РТГА, РСК, ИФА (в РТГадс используют сыворотки с титрами не менее 1 : 160). Если выделенный вирус имеет измененную антигенную структуру, то РТГадс и РТГА с имеющимися специфическими сыворотками могут быть отрицательными. В таком случае используют РСК, выявляющую более стабильные в антигенном отношении типоспецифические вирусные белки. Для идентификации вируса в куриных эмбрионах и тканевых культурах широко применяется РН.

Серологическое исследование. Это исследование подтверждает диагноз гриппа при нарастании титра антител в крови больных не менее чем в 4 раза.

Первую сыворотку берут у больного в остром периоде болезни (до 3—5-го дня), обычно одновременно со смывом из носовой части глотки, вторую — после 10-го дня болезни. Для одновременного изучения сывороток первую из них хранят при -20 °С.

Ставят РСК, РТГА, ИФА, РРГ. Чтобы удалить неспецифические ингибиторы вируса гриппа в исследуемых сыворотках, их обрабатывают рецепторо-разрушающим ферментом. Последний (в концентрации 100 ЕД/мл) смешивают с сывороткой в определенном соотношении и оставляют на 10—12 ч при 37 °С. Затем к этой смеси добавляют 3 объема 2,5%-го раствора цитрата натрия,

прогревают 30 мин при 50 °С и добавляют 2 объема фосфатного буфера для получения конечного разведения сыворотки 1 : 10.

Антитела у больных гриппом можно определять с помощью РН на куриных эмбрионах или культуре ткани почек обезьян.

4.2. Острые респираторные вирусные инфекции

ОРВИ характеризуются катаральными явлениями различной интенсивности в результате повреждения эпителия слизистой оболочки верхних дыхательных путей, полиморфизмом клинических проявлений, от легких и стертых форм заболевания до очень тяжелых с летальным исходом.

Вирусы, вызывающие ОРВИ, многочисленны (более 200), относятся к разным таксономическим группам. Наиболее часто вызывают ОРВИ парамиксовирусы, реовирусы, коронавирусы, риновирусы, энтеровирусы, аденовирусы.

В основе лабораторной диагностики ОРВИ лежат экспресс-методы, вирусологическое и серологическое исследования (см. табл. 4.1).

При заболеваниях, вызванных парамиксовирусами, респираторно-синцитиальным, корона-, рео- и аденовирусами, для диагностики используют смывы с носоглотки и отделяемое слизистой оболочки задней стенки глотки, которое снимают несколькими ватными тампонами. Из одного тампона делают мазки-отпечатки, а остальные погружают в 2—5 мл раствора Хенкса. Для повышения жизнеспособности парамиксовирусов к раствору добавляют 0,5 % желатина или бычьего альбумина.

Адено-, энтеро- и реовирусы можно также выделить из крови, мочи, фекалий, трупного материала, а энтеровирусы — из спинномозговой жидкости.

Пробы следует брать как можно раньше после начала заболевания. Для осветления их центрифугируют при 3000 об/мин в течение 30 мин. Сопутствующую бактериальную флору подавляют пенициллином и стрептомицином (200—250 ЕД/мл).

Хранение материала осуществляют путем замораживания при температуре –30 ... –70 °С.

Экспресс-диагностика. Исследование заключается в обнаружении вирусного антигена в клетках исследуемого материала с помощью РИФ, ИФА, РОПГА и др. Реовирусы экспресс-методами выявить, как правило, не удается.

Выделение вируса. Для выделения вирусов используют культуры тканей почек обезьяны и эмбриона человека (парамиксо-, рео- и аденовирусы), культуры *HEp-2*, *KB*, *HeLa* (респираторно-синцитиальный вирус), органнотипы трахеи и легкого человеческих эмбрионов (коронавирусы).

Наличие вируса определяют по его цитопатическому действию, которое выражается в образовании синцития (парамиксо-, респираторно-синцитиальный вирусы), прекращении и ослаблении мерцательных движений эпителиальных клеток в органных культурах трахеи (коронавирус), появлении зернистости и цитоплазматических включений (рео-, аденовирусы).

Выделенные вирусы идентифицируют специфическими иммунными сыворотками с помощью РН в культуре ткани (парамиксовирусы, респираторно-синцитиальный, корона-, рео-, аденовирусы), РТГадс (парамиксо-, реовирусы), РТГА (парамиксо-, рео-, аденовирусы), ИФА (парамиксовирусы), РСК (все перечисленные вирусы), РИФ (респираторно-синцитиальный, реовирусы), а также путем внутримозгового заражения мышей-сосунков (коронавирусы).

Серологическое исследование позволяет поставить диагноз в случае обнаружения специфических антител в сыворотке больных. Для серологических реакций используют парные сыворотки, которые берут в первые дни от начала заболевания и спустя 1—3 недели, но изучают одновременно. Диагностическое значение имеет нарастание титра антител в 4 раза и более. РТГА, РН, РСК, РТГадс, РИФ, РИА, ИФА ставят с антигенами (диагностикумами), приготовленными из эталонных штаммов соответствующих вирусов.

4.3. Герпетические инфекции

Герпес — хроническое рецидивирующее заболевание с пузырьковыми высыпаниями на коже и слизистых оболочках; возможны врожденные уродства, поражения различных органов и систем (нервной системы, органов дыхания, печени, слизистой оболочки полости рта и половых органов, глазного яблока), особенно у новорожденных. Рецидивы герпетической инфекции обусловлены снижением антиинфекционной резистентности, в том числе на фоне других острых инфекционных заболеваний, проявления которых являются преобладающими.

Вирусы герпеса человека входят в состав семейства *Herpesviridae*. Современная классификация герпесвирусов представлена в табл. 4.1.

Материалом для исследования в зависимости от клинических проявлений заболевания может быть содержимое везикул, корочки, слюна, спинномозговая жидкость, кусочки головного (полученные при аутопсии и биопсии) и спинного мозга, печени, лимфатические узлы (материал аутопсии), сгусток крови, форменные элементы крови, мазки из отделяемого язвочек слизистой оболочки полости рта, половых органов или роговицы глаз и др.

Классификация герпесвирусов и вызываемые ими заболевания

α-Герпесвирусы	β-Герпесвирусы	γ-Герпесвирусы	Нетипируемые вирусы
ВПГ-1: гингивиты, стоматиты, конъюнктивиты, менингиты ВПГ-2: генитальные инфекции, уретрит, цистит, врожденные пороки (микроцефалия) Вирус ветряной оспы (у детей, <i>varicella zoster</i>) и опоясывающего лишая (у взрослых)	ЦМВ (цитомегаловирус): поражение иммунокомпетентных клеток, почек, разных органов	Эпштейна — Барр вирусы (ЭБВ): лимфома Беркита, инфекционный мононуклеоз, назофарингеальная карцинома	Вирус герпеса человека 6 типа (ВГЧ 6): тропен к В-лимфоцитам, а также к глиальным, лимфоидным клеткам; участвует в патогенезе злокачественной В-клеточной лимфомы, лимфомы Ходжкина, синдрома хронической усталости ВГЧ 7: латентные инфекции ВГЧ 8: возможно, вызывает саркому Капоши

Вирусы лучше всего сохраняются в присутствии 10 % сыворотки при -70°C .

Лабораторная диагностика герпетической инфекции включает экспресс-методы, вирусологическое и серологическое исследование (см. прил.).

Экспресс-диагностика. Для экспресс-диагностики герпетической инфекции используют электронную микроскопию, РИФ, ИФА. Они позволяют выявить вирусные частицы с характерной морфологией или вирусспецифический антиген (см. цв. вклейку, рис. 26). Вирионы обнаруживают в содержимом везикул, в ядрах клеток мозговой ткани, реже в жидкой фракции растертых в дистиллированной воде корочек, в смывах, мазках-отпечатках, полученных с высыпаний на коже.

Вирусспецифический антиген выявляют с помощью иммуноморфологических методов исследования в соскобах везикул, пораженной роговицы, в мазках из отделяемого везикул, в клетках спинномозговой жидкости.

Выделение вируса. Для выделения герпесвирусов используют мышей-сосунков 2—4-дневного возраста (заражение в мозг — 0,01 мл; в брюшную полость — 0,05 мл), взрослых белых мышей (заражение в мозг — 0,05 мл), кроликов (заражение на скарифи-

цированную роговлицу, в мозг), морских свинок (заражение на роговлицу), хомяков, хлопковых крыс (заражение через нос), одноклеточных цыплят (заражение в мозг — 0,05 мл), 12-дневных куриных эмбрионов (заражение на хорионаллантоисную оболочку), культуры клеток почек кролика, эмбриона человека, курицы, амниона человека, *HeLa* и другие клеточные культуры. При наличии вируса в исследуемом материале у мышей (через 3—7 дней) развиваются параличи, наступает летальный исход, на ХАО куриных эмбрионов (через 48 ч) появляются бляшки, у кроликов (через 2—5 дней) отмечается кератит, иногда наступает летальный исход. В клетках зараженной роговлицы выявляют вирусспецифический антиген (РИФ), внутриядерные включения.

В инфицированных клеточных культурах через 4—7 дней отмечается появление многоядерных гигантских клеток (поликариоцитов), увеличение и округление клеток (баллонизирующая дегенерация).

Выделенные штаммы вируса простого герпеса (ВПГ) идентифицируют с помощью стандартных иммунных кроличьих сывороток в РН на мышках (по летальному эффекту), куриных эмбрионах (по количеству оспин на хорионаллантоисной оболочке), в культуре клеток (по количеству бляшек, ЦПД).

Серологическое исследование. Серодиагностика основана на выявлении нарастания титров антител в РН, РСК при исследовании парных сывороток заболевших. Реже применяют РНГА, РТГадс.

При первичной герпетической инфекции диагностическое значение имеет выявление вируснейтрализующих и комплементсвязывающих антител. Для выявления первичной герпетической инфекции важное значение приобретает определение *IgM*.

При цитомегаловирусной инфекции вирус из мочи, слюны выделяют путем заражения культуры фибробластов эмбриона человека, реже — из биопсийного материала (кусочки печени), лейкоцитов крови и других материалов. Цитопатическое действие развивается медленно: обнаруживают увеличенные, многоядерные клетки с внутриядерными включениями.

Вирус ветряной оспы или опоясывающего лишая из содержимого везикул, носоглотки, соскоба папул выделяют путем инфицирования культур фибробластов и эпителиальных клеток человека и обезьян, которые после заражения инкубируют при 34—35 °С. Развивается очаговый цитопатический эффект, который регистрируют на 6—13-й день или позднее. Отмечают появление синцитиев, цитоплазматических и внутриядерных включений. Для серологической диагностики, помимо РСК и РН, используют непрямую РИФ. В качестве антигена для этой реакции применяют фиксированные препараты клеток, зараженных вирусом ветряной оспы.

ПЦР. Этот метод широко применяется для подтверждения герпесвирусной этиологии менингоэнцефалитов, особенно у детей, для диагностики генитального герпеса. Его отличает быстрота получения результата (4—48 часов), высокая чувствительность (10 копий в образце) и возможность одновременного определения разных герпесвирусов (например, ВПГ-1, ВПГ-2 и *ВУ-З*). В качестве мишени при амплификации обычно используется общий для ВПГ-1 и ВПГ-2 высококонсервативный участок ДНК гена полимеразы.

При постановке гнездового варианта ПЦР с праймерами, распознающими нуклеотидные последовательности ЦМВ, в крови или моче удается обнаружить вирус на 2—2,5 нед раньше, чем при использовании культурального метода. Количественный метод ПЦР эффективен также при контроле за течением инфекционного процесса и эффективностью терапии, особенно у лиц с иммунодефицитами.

Несколько вариантов ПЦР используют для обнаружения вируса *Эпштейна-Барр*. Для диагностики хронических герпетических нейроинфекций разработан вариант мультиплексной ПЦР, позволяющий дифференцировать в одной реакционной смеси шести различных герпесвирусов, включая ВЭБ.

4.4. Натуральная оспа

Натуральная оспа — острое инфекционное заболевание, характеризующееся явлениями общей интоксикации, лихорадкой, появлением папулезно-пустулезной сыпи на коже и слизистых оболочках. Она относится к числу особо опасных, карантинных, конвенционных заболеваний.

Вирус натуральной оспы — *Variola virus* относится к семейству *Poxviridae*, которое включает несколько родов. В род *Orthopoxvirus* входят вирусы натуральной оспы, осповакцины, оспы коров, буйволов, верблюдов, овец, обезьян, кроликов и мышей.

Материалом для исследования при натуральной оспе является соскоб макул и папул, содержимое везикул и пустул, корочки оспенных пустул, слюна, смыв со слизистой оболочки носовой части глотки. От трупа берут на исследование содержимое везикул и пустул, кровь из сердца, кусочки легкого, селезенки и печени. Кровь исследуют вирусологическими и серологическими методами, начиная с последних дней инкубационного или продромального периодов до стадии истинных высыпаний включительно, затем проводят только серодиагностику. В смыве со слизистой оболочки носоглотки вирус обнаруживается в последние дни инкубационного периода и в продромальном периоде (до появления высыпаний на коже).

Лабораторная диагностика натуральной оспы

Вид исследования	Цель	Материал	Заражение	Выявление	Идентификация
Экспресс-диагностика	Выявление вирионов и антигена оспенной группы	Мазки из содержимого везикул, соскоба макул и папул; мазки-отпечатки с основания везикул, соскобов макул и папул, из отделяемого слизистой оболочки носоглотки	—	ЭМ, РНГА, РИФ, РПГ, ИФА	—
Вирусологическое	Выделение и идентификация вируса по биологическим свойствам	Кровь (с гепарином), соскобы папул и макул, содержимое везикул, пустул, корочки, слюна, смывы с носоглотки, кусочки органов; посмертно — кровь из сердца, кусочки легкого, почек	ХАО куриных эмбрионов Культуры клеток Роговицы кроликов	Появление бляшек на ХАО (оспины), РГА КЦПД, РИФ, РГадс, РТГА, РГА, РТГадс, РПГ, ИФА, внутрицитоплазматические включения Проба Пауля, тельца Гварниери, РИФ, люминесцентная микроскопия клеток роговицы (окраска акридиновым оранжевым)	Характер и динамика развития бляшек, подавление репродукции вируса при температуре выше 38,5 °С, низкие титры гемагглютининов и патогенность для куриных эмбрионов
Серологическое	Выявление увеличения титра антител в 4 раза и более	Кровь (без антикоагулянтов) — парные сыворотки	—	РТГА, РСК, РН, РИА	Характер ЦПД, бляшек, подавление репродукции вируса при 39—40 °С, низкие титры гемагглютининов

Исследуют содержимое не менее 10 элементов кожных поражений и 5—6 корочек оспенных пустул.

Для РИФ готовят мазки из содержимого везикул, соскоба макул и папул (без крови), а также мазки-отпечатки из соскоба макул и папул или отделяемого слизистой оболочки носоглотки, взятого тампоном.

Правила взятия, упаковки, пересылки и обработки проб для диагностических исследований детально описаны в специальных инструкциях, например в «Инструкции по лабораторной диагностике натуральной оспы» Министерства здравоохранения СССР от 4.04.1972 г.

Этапы и методы лабораторной диагностики оспы представлены в табл. 4.2.

Экспресс-диагностика. Быстрое обнаружение вируса основано на прямом исследовании материала от больного и дает возможность установить ориентировочный диагноз заболевания, вызванного одним из вирусов оспенной группы. Для выявления вирионов используют электронную микроскопию, а антигенов вирусов — РИФ, РОПГА, РПГ, ИФА.

Для положительного ответа достаточно обнаружить при ЭМ 2—3 частицы с характерной для оспенных вирусов морфологией, что возможно при высокой концентрации вируса в исследуемом материале: 10^6 оспинообразующих единиц (ООЕ) вируса в 1 мл. Вирионы оспенной группы надо дифференцировать с вирусами герпеса.

В РИФ исследуют мазки содержимого элементов кожных высыпаний, отделяемого носоглотки, соскоба оспенных пустул. Для исключения ложно-положительных результатов при проведении РИФ используют заведомо положительные и отрицательные контроли, применяют контрастирование препаратов бычьим альбумином, меченым фторидом сульфородамина, истощение иммунной сыворотки (удаления специфических антител) и другие пробы.

РОПГА проводят с бараньими эритроцитами, на поверхности которых фиксированы противооспенные антитела (антительный диагностикум). Антиген, находящийся в исследуемом материале, взаимодействует с антителами на поверхности эритроцитов, что приводит к агглютинации эритроцитов.

РПГ позволяет выявить антигены в материале при использовании тест-системы, состоящей из антигена оспенной группы и иммунной сыворотки. При положительных результатах линии преципитации иммунной сывороткой тест-антигена и исследуемого антигена совпадают. Минимальная концентрация вируса, выявляемая в реакции, — 10^4 ООЕ/мл.

Для обнаружения антигена оспенных вирусов применяется прямой или непрямой вариант ИФА.

Внутригрупповая дифференциация вирусов оспенной группы основана на выделении вирусов и изучении их биологических свойств в культуре клеток, на куриных эмбрионах, лабораторных животных (табл. 4.3).

Таблица 4.3

Дифференциация вирусов оспы по биологическим свойствам

Изменение в чувствительной живой системе	Вирус	
	натуральной оспы	вакцины
Куриные эмбрионы		
Характер и динамика развития оспин на ХАО	На 3-й день после заражения мелкие (диаметром 1 мм), белые, плотные, резкоограниченные, куполообразные, возвышающиеся над окружающей непораженной тканью количество оспин увеличивается до 8-го дня	На 3-й день после заражения крупные (диаметром 3—5 мм) плоские с расплывчатыми краями, желтоватого цвета, иногда с изъязвлениями, не возвышающиеся над окружающей тканью; максимальное количество оспин отмечается на 3-й день
Гибель эмбрионов	На 4—5-й день после заражения гибели не наступает (при первичном выделении)	На 3—5 день после заражения
Титр гемагглютининов в суспензии ХАО	0—1/40	Свыше 1/80
Репродукция при температуре выше 38,5 °С	—	+
Клеточные культуры (<i>HeLa</i>, <i>HEp-2</i>, <i>FL</i>)		
Характер ЦПД	Медленное развитие (через 3—4 дня), очаговый характер	Быстрое развитие (через 24 ч), разлитой характер, образование гигантских клеток и многоядерных вакуолизированных симпластов, гиперплазия клеток отсутствует
Бляшки в культуре клеток	На 4—5-й день мелкие (диаметр 0,5—1,0 мм), с гиперпластическими краями (пролиферативного типа)	На 2—3-й день крупные (диаметр 5—7 мм), литические

Изменение в чувствительной живой системе	Вирус	
	натуральной оспы	вакцины
Репродукция при температуре 39—40 °С	—	+
Лабораторные животные		
Патогенность	Низкая	Высокая
Заражение кроликов на скарифицированную кожу	Бледные царапины	На 3—5-й день сливные элементы (папулы и пустулы), выступающие над поверхностью кожи
Пассирование на кроликах	Не вызывает поражения	Вызывает поражение кожи

Выделение вируса. Для выделения оспенных вирусов 0,1—0,2 мл исследуемого материала (неразведенного и разведенного 1 : 10) вводят шприцем на ХАО 11—12-дневных куриных эмбрионов. Затем эмбрионы инкубируют в течение 3—5 сут при 35 °С. Вирус натуральной оспы образует на ХАО мелкие белые, куполообразные оспины. Он обладает низкой патогенностью для куриных эмбрионов, не размножается при температуре выше 38,5 °С и характеризуется слабой гемагглютинирующей активностью. Дифференциацию вирусов натуральной оспы и вакцины проводят путем заражения 3—4-суточных культур перевиваемых линий клеток *HeLa*, *HEp-2*, *FL*, фибробластов кожи человека и животных при их параллельной инкубации при 35 °С и 39—40 °С (см. табл. 4.3).

Индикацию оспенных вирусов в зараженных клеточных культурах проводят с помощью РИФ, РОПГА, РПГадс. Вирусы простого герпеса и ветряной оспы отличаются от оспенных образованием внутриядерных включений, отсутствием гемадсорбции в культуре клеток и характером цитопатического действия.

Серологическое исследование. Серодиагностика позволяет поставить диагноз ретроспективно, на основании увеличения титра противооспенных антител в крови больных, выявленного с помощью РТГА, РСК, РН на куриных эмбрионах и в культурах клеток. Антигенами для серологических реакций служат 10%-е центрифугаты суспензии ХАО, зараженной вирусом вакцины. Результаты РН с сывороткой больного в культуре ткани учитывают по ЦПД и РГадс, а на куриных эмбрионах — по образованию оспин на ХАО и накоплению гемагглютининов в РГА.

4.5. Арбовирусные инфекции

В настоящее время насчитывают более 500 типов арбовирусов, из них около 100 патогенны для человека. Арбовирусы входят в состав семи семейств: *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Picornaviridae*, *Iridoviridae*, *Poxviridae*, *Arenaviridae*. По антигенным свойствам арбовирусы составляют более 60 антигенных групп с различным количеством представителей.

К арбовирусным инфекциям относятся системные арбовирусные лихорадки (флеботомная, Денге), арбовирусные геморрагические лихорадки (желтая, Денге, Чикунгунья, крымская геморрагическая, омская геморрагическая, киассанурская лесная болезнь), арбовирусные энцефалиты и энцефаломиелиты (клещевой энцефалит, американские, западный, восточный и венесуэльский лошадиный энцефаломиелиты, энцефалит Сан-Луи, долины Муррея, западно-нильский, японский, африканский) и др.

Многие арбовирусы вызывают однотипные клинические проявления и стертые формы заболевания. Эти особенности арбовирусных инфекций, а также одновременное распространение в эндемических очагах сходных по клинике заболеваний вирусной и бактериальной природы, вызванных аденовирусами, энтеровирусами, риккетсиями, спирохетами, затрудняют их клиническое распознавание. В связи с этим решающее значение приобретает лабораторная диагностика арбовирусных инфекций. Следует отметить, что при этих исследованиях необходимо строго соблюдать правила безопасности. Вирусологическое исследование арбовирусов должны проводить квалифицированные вирусологи в специальных лабораториях для работы с возбудителями особо опасных инфекций.

Вирусологическое и серологическое исследования для выявления природных очагов арбовирусных инфекций предполагают сбор членистоногих, взятие крови у домашних и диких животных, кусочков внутренних органов (мозг, печень, почки, селезенка, легкие) у павших домашних животных и у диких позвоночных с признаками заболевания.

Членистоногих сортируют по видам, помещают в химические пробирки и плотно закрывают ватно-марлевыми пробками. В пробирку вкладывают этикетку с указанием номера животного, с которого собраны эктопаразиты, его вида, места и даты взятия материала и транспортируют в лабораторию.

Для изучения природных очагов арбовирусных инфекций применяют метод сторожевых животных, заключающийся в том, что чувствительных животных (мышей-сосунков, кроликов, морских свинок, цыплят и др.) держат в клетках в очаге, где они подвергаются нападению инфицированных переносчиков-членистоно-

гих. У животных периодически берут кровь и исследуют на наличие вируса или противовирусных антител.

Лабораторная диагностика арбовирусной инфекции у человека основана на применении экспресс-методов, выделении вируса и выявлении нарастания титра антител при исследовании парных сывороток (см. прил.; табл. 4.4).

Материалом для исследования служат кровь, спинномозговая жидкость, смывы из носоглотки, моча и плевральная жидкость, которые берут в течение первых 3—4 дней острого периода. Кусочки мозга, печени, селезенки, легких, почек у трупа желатель- но отбирать в течение 3—4 ч после смерти. Выделение вируса наи- более вероятно при использовании материала от людей, погиб- ших в течение первой недели острого периода болезни.

Кровь из локтевой вены в количестве 5—10 мл переносят в пробирку с гепарином (из расчета 10 МЕ на 1 мл крови), для серологического исследования гепарин не добавляют. Первую сы- воротку получают на 1—3-й день болезни, вторую — спустя 2— 3 нед после ее начала. Материал, полученный для вирусологи- ческого исследования, необходимо использовать в тот же день. Для кратковременного хранения материала (1—2 дня) достаточ- но +4 °С, а для длительного — необходимо замораживание при –80—180 °С (кусочки органов можно хранить в 50%-м глицерине при +4 °С). Допускается только однократное замораживание и от- таивание инфекционного материала.

Сыворотку хранят во флаконах небольшого объема при 4 °С (не- продолжительное время) или в замороженном виде. При подозре- нии на бактериальное загрязнение к сыворотке добавляют 1 % азида натрия (конечная концентрация).

Из исследуемого материала в асептических условиях готовят 10%-ю суспензию в ИХН, растворе Хенкса (рН 7,4—7,6) или в питательных средах при заражении клеточных культур. Добавляют 0,75—2,0 % бычьего альбумина или 10—25 % нормальной кроли- чьей сыворотки и центрифугируют при 4 °С в течение 20 мин при 1500—2000 об/мин.

Для устранения бактериального загрязнения материал обраба- тывают пенициллином (200 ЕД/мл) и стрептомицином (100 ЕД/мл). Часть материала хранят при температуре ниже –20 °С (для повтор- ного исследования).

Экспресс-диагностика. Экспресс-методы основаны на прямом обнаружении антигена в исследуемом материале от больного. Для этих целей используют РИФ, РНГА, ИФА и их модификации, которые дают возможность обнаружить и типировать вирусспеци- фический антиген в клетках.

С помощью РИФ выявляют вирусспецифический антиген, дли- тельное время связанный с лейкоцитами крови (при лихорадке Денге, крымской геморрагической и колорадской лихорадке). При

колорадской лихорадке вирусный антиген сохраняется в лейкоцитах более 3 мес. Следует учитывать возможность ложноположительных результатов за счет аутофлюоресценции лейкоцитов. РИФ применяется также для обнаружения вирусного антигена в слюнных железах переносчиков и в гемолимфе клещей.

При японском энцефалите вирусспецифический антиген в биопсийном материале можно выявить методом ИФА.

Обнаружить в исследуемом материале вирусный антиген позволяет РОНГА с эритроцитарным антигальным диагностикумом. Эту реакцию используют для экспресс-диагностики крымской геморрагической лихорадки, лимфоцитарного хориоменингита. Обнаружение и типирование вирусспецифического антигена достигается также путем применения ИФА и РОНГА на твердой основе. Положительные результаты указывают на наличие соответствующих антигенов.

Выделение вируса. Для выделения вируса исследуемым материалом (неразведенным и в разведениях 1 : 10 и 1 : 50) заражают новорожденных белых мышей, культуры клеток, реже куриные эмбрионы (табл. 4.4). При этом исключается возможное действие на вирус антител или интерферона. Новорожденных мышей заражают в мозг (0,01 — 0,02 мл), внутривентриально (0,05 мл) или подкожно (0,03 мл) (при выделении аренавирусов заражают только взрослых белых мышей). Затем животных наблюдают в течение 2—3 нед, заболевших особей забивают и исследуют 10%-ю суспензию мозга. Животных, погибших в течение 1—3 дней после заражения, не учитывают.

Для выделения вируса от больных лихорадкой Денге в связи с его низкой способностью адаптироваться к мозговой ткани мышей необходимо проведение 6—7 слепых пассажей через мозг животных.

Для выделения вирусов используют первичные культуры клеток — куриные и утиные фибробласты, клетки почек эмбриона свиньи, перевиваемые линии ВНК-21, СПЭВ, ПЭС, *Vero*, а также культуры тканей членистоногих (клещей, комаров).

Куриные эмбрионы заражают в тело, амнион, желточный мешок, на ХАО.

Индикацию вирусов проводят в РГА, по ЦПД, образованию бляшек, гибели мышей, куриных эмбрионов. Для РГА обычно используют гусиные эритроциты.

Для идентификации выделенных вирусов используют РН как наиболее специфическую. Менее специфичны РТГА и РСК: они дают возможность выявить общие антигены, характерные для определенных групп арбовирусов. Реже применяют РИФ, РИА и др.

В тех случаях, когда изолированный вирус идентифицировать не удастся, целесообразно изучить его физико-химические свойства: размеры вирионов, тип нуклеиновой кислоты, наличие ли-

Таблица 4.4

Лабораторная диагностика арбовирусных инфекций

Вид исследования	Цель	Материал	Заражение	Выявление	Идентификация
Экспресс-диагностика	Выявление и идентификация вирус-специфического АГ и противовирусных АТ	Кровь, ткани внутренних органов, сыворотка крови	—	РИФ, РОПГА, ИФА	РИФ, РОПГА, ИФА
Вирусологическое	Выделение и типирование вируса	Кровь, ликвор (при энцефалитах), ткани внутренних органов (при геморрагических лихорадках), носоглоточные смывы (редко)	Мышей-сосунков в мозг и подкожно, молодых мышей в мозг и внутрибрюшинно Куриных эмбрионов в амнион, желточный мешок, на хорионлантоисную оболочку, в тело (эмбриона) Культур клеток куриного эмбриона, почек эмбриона свиньи, ВНК-21, <i>Vero</i> , СПЭВ, ПЭС	Тремор, атаксии, конвульсии, параличи, гибель животного, а также в РГА Замедленные движения эмбриона, гибель, РГА	РН, РТГА, РСК (реже), РПГ, РОПГА, ИФА —
Серологическое	Выявление нарастания титра антител в 4 раза и более, появление антител (сероконверсия)	Парные сыворотки, полученные в начале болезни и спустя 2—3 нед после ее начала	—	—	Одновременное проведение РТГА, РСК, РН, реже РИФ, РПГ, ИФА, РИА, РОПГА

пидов. Эти косвенные признаки помогают произвести предварительную «досерологическую» идентификацию арбовирусов (табл. 4.5).

Комплексное изучение указанных свойств позволяет сделать предварительное заключение о принадлежности возбудителя к той или иной группе арбовирусов. Исследование свойств выделенного агента включает изучение его патогенности для лабораторных животных и тканевых культур. С целью дифференциальной диагностики получают иммунные сыворотки или иммунные асциты-

Таблица 4.5

Идентификация арбовирусов по физико-химическим свойствам

Признак	Методика определения	Примечания
Размер вирионов	Фильтрация вирусной суспензии последовательно через фильтры с диаметром пор 220, 100 и 50 нм	Размеры изученных арбовирусов колеблются в пределах 20—120 нм. Большинство арбовирусов проходит фильтр с диаметром пор 100 нм. Все изученные арбовирусы являются РНК-содержащими; вирус африканской чумы свиней содержит ДНК. Арбовирусы, как правило, чувствительны к эфиру или дезоксихолату натрия. Нечувствительны к эфиру или дезоксихолату вирусы африканского падежа лошадей, синего языка овец, вирусы из группы Кемерово
Тип нуклеиновой кислоты	Добавление 40 мкг/мл 6-бром-2-дезоксигуанидина (БДУР) приводит к подавлению размножения ДНК-содержащего вируса в культуре ткани	
Химический состав (содержание липидов)	1. Встряхивание равных объемов вирусной суспензии и эфира в течение 20 мин при комнатной температуре и инкубация при -4... 8 °С в течение 18—20 ч 2. Смешивание вирусной суспензии с равным объемом 1%-го дезоксихолата натрия (1 : 500) и инкубация 1 ч при 37 °С. Результаты реакции оценивают по разнице титров обработанной и необработанной суспензий	

ческие жидкости против выделенного вируса и ставят с ними перекрестные серологические реакции.

Недостатком вирусологического исследования является его продолжительность (до трех недель), что позволяет ставить лишь ретроспективный диагноз.

Серологическое исследование. Серодиагностика основана на изучении парных сывороток крови. При выборе антигена учитывают эпидемиологическую обстановку и клинические данные. Для выявления нарастания титра антител гемагглютинирующих арбовирусов используют РТГА, для всех остальных арбовирусов — РСК и РН. Трудность диагностики заключается в том, что циркуляция в очаге какого-либо вируса может сопровождаться выработкой групповых антител к антигенно-родственным вирусам. В таких случаях целесообразно применение РСК и РН, которые более специфичны, чем РТГА. Диагностическое значение имеет 4-кратное и более увеличение титра антител в одной из указанных реакций. Следует отметить, что комплементсвязывающие антитела сохраняются непродолжительный период.

Для серологической диагностики арбовирусных инфекций используют также РИФ, РНГА (антигенный диагностикум), РОНГА, РРГ, ИФА, РИА.

4.6. Энтеровирусные инфекции

Энтеровирусы человека входят в род *Enterovirus* семейства *Picornaviridae*. К ним относятся вирусы полиомиелита (3 серотипа), Коксаки А (23 серотипа)*, Коксаки В (6 серотипов), ЕСНО (31 серотип)** и энтеровирусы человека 68 — 71-го серотипов. Энтеровирус 70 вызывает острый геморрагический конъюнктивит. Вирус гепатита А, ранее имевший номер 72 в роду *Enterovirus*, теперь выделен в отдельный род *Hepatovirus* семейства *Picornaviridae*. В род *Enterovirus* входят также вирусы животных (крупного рогатого скота, обезьян, свиней, мышей) и насекомых. Энтеровирусы животных характеризуются видовой специфичностью.

Энтеровирусы характеризуются полиорганным тропизмом и поэтому вызывают у человека поражения различных органов и систем: центральной нервной системы (энцефалит, менингоэнцефалит, полиомиелит, менингит), желудочно-кишечного тракта (диарея, гепатит, панкреатит), а также дыхательных путей (ринит, фарингит, пневмония новорожденных и др.), сердечно-сосудистой системы (миокардит, перикардит). Возможно также развитие герпетической ангины, экзантемы, везикулярного стома-

* Коксаки А 23 идентичен ЕСНО 9.

** ЕСНО 28 отнесен к риновирусам, ЕСНО 34 — вариант Коксаки А24.

тита, миалгии и конъюнктивита. Различные энтеровирусы могут обуславливать одинаковые клинические проявления, в то же время один энтеровирус способен привести к развитию разных клинических синдромов.

Материалом для исследования служат фекалии, смывы с носовой части глотки, спинномозговая жидкость, кровь, сыворотка, содержимое везикул, моча, асцитическая жидкость. От трупа берут на исследование кровь, спинномозговую жидкость, ткань спинного и продолговатого мозга, варолиева моста, кусочки кишечника и их содержимое, кусочки печени, селезенки, легкого, поджелудочной железы, миокарда, лимфатические узлы. Материал берут в первые часы болезни, от трупа — не позднее чем через 3—4 ч после смерти.

Кровь (около 10 мл) для вирусологического анализа и приготовления сыворотки берут натощак в начале болезни, а затем спустя 3—4 нед (для получения парной сыворотки).

Фекалии (4—6 г) собирают с интервалом 1—2 дня. Готовят 10%-ю суспензию в растворе Хенкса, встряхивают и осветляют центрифугированием в течение 30 мин при 3000—10 000 об/мин. Надосадочную жидкость обрабатывают эфиром (добавляют равный объем диэтилового эфира, смесь оставляют в холодильнике под ватно-марлевой пробкой на 12—16 ч) и антибиотиками.

Ректальные тампоны помещают в пробирку с 1—2 мл раствора Хенкса или Эрла, споласкивают, отжимают. Материал центрифугируют и обрабатывают эфиром и антибиотиками.

Глоточный смыв в объеме 20 мл получают при 2-кратном (с интервалом 3 мин) полоскании горла стерильным солевым раствором или дистиллированной водой. Тампонами протирают заднюю стенку глотки, миндалины и небные дужки и погружают в пробирку с 1—2 мл раствора Хенкса. Материал центрифугируют и обрабатывают эфиром и антибиотиками.

Стерильную прозрачную спинномозговую жидкость (около 3 мл) используют для выделения вируса без предварительной обработки. Мутную спинномозговую жидкость, а также содержащую эритроциты центрифугируют. Мочу в объеме 10 мл берут в стерильный сосуд в середине акта мочеиспускания и обрабатывают антибиотиками.

Пробы секционного материала растирают в стерильной ступке, готовят 20%-ю суспензию в растворе Хенкса, центрифугируют 5—10 мин при 2000 об/мин.

Материал обрабатывают антибиотиками — пенициллином (1000 ЕД/мл) и стрептомицином (500 ЕД/мл) в течение 2 ч при комнатной температуре, а затем используют его для выделения вируса. Часть материала замораживают и хранят при -70°C . Многократное замораживание и оттаивание недопустимо, так как приводит к инаktivации вируса.

Экспресс-диагностика. Этот подход не нашел широкого применения при энтеровирусных инфекциях из-за особенностей их патогенеза. Описано применение РИФ (для исследования клеток спинномозговой жидкости). При ротавирусных инфекциях применяют ЭМ и ИЭМ (см. подразд. 4.8).

Выделение вируса. Исследование проводят с применением культур клеток и/или однодневных белых мышей (табл. 4.6).

Полиовирусы (1—3-й типы), большинство вирусов Коксаки В, ЕСНО, некоторые типы вирусов Коксаки А (7, 9, 14, 16, 21-й) при размножении в культуре клеток почек обезьян проявляют ЦПД (см. рис. 3.2). В культуре клеток почек эмбриона человека, амниона

Таблица 4.6

Методы обнаружения и идентификации энтеровирусов

Материал	Живая система для заражения	Виды (типы) энтеровирусов	Способ идентификации
Клинический материал: фекалии (ректальные тампоны), носоглоточные смывы (тампоны), ликвор, кровь, содержимое везикул, моча	Первичные культуры клеток почек обезьян, фибробластов эмбриона человека, перевиваемые культуры клеток <i>Vero</i> , <i>Hela</i> , <i>HEp-2</i> , <i>RD</i> и др.	Полиовирусы (1—3), Коксаки В (1—6), вирусы ЕСНО, Коксаки А (непостоянно)	РН со смесями поливалентных сывороток в культурах клеток и на мышьяк-сосунках; типовая принадлежность вируса — в РН с моновалентной сывороткой; РПГ, РИФ, РСК
Секционный материал: кровь, ликвор, кусочки спинного, продолговатого мозга, варолиева моста, кусочки и содержимое кишечника	Культуры клеток	Вирусы Коксаки группы А и В, полиовирусы и другие энтеровирусы	РТГА с эритроцитами человека 0(1) группы крови, некоторые типы энтеровирусов (непостоянно)
При подозрении на инфекции, вызванные ЕСНО и Коксаки — кусочки внутренних органов, печени, селезенки, легкого, миокарда, лимфатические узлы	Однодневные мыши-сосунки	Вирусы Коксаки групп А и В	Данные патоморфологического исследования

человека, диплоидных клетках WI-38 репродуцируются вирусы Коксаки А (11, 13, 15, 18, 20, 21, 24-й), ЕСНО (21-й, 34-й). Большинство серотипов Коксаки А размножаются и вызывают ЦПД в культуре клеток RD (культура из рабдомиосаркомы человека). Для выделения вирусов Коксаки параллельно с культурами клеток заражают новорожденных мышей.

Вирусы Коксаки А из материала от больных наиболее успешно удается выделить только на однодневных мышях-сосунках, так как они не размножаются в большинстве культур клеток обезьян и человека.

Мышей-сосунков заражают в мозг (0,01 мл), подкожно (0,03 мл), внутривентриально (0,05 мл) или комбинированным методом с последующим наблюдением в течение 14 дней. При развитии клинических симптомов из мозга больных животных и тушек готовят 20%-ю суспензию для дальнейшего пассирования вируса. Берут также кусочки тканей для гистологического исследования.

Индикацию энтеровирусов проводят по ЦПД и бляшкообразованию под агаровым или бентонитовым (см. подразд. 3.1.4) покрытиями, в культуре клеток, развитию параличей у мышей-сосунков и их гибели, а также по физико-химическим свойствам: небольшие размеры, резистентность к жирорастворителям и низким значениям pH (3,0), термостабильность при 50 °С в присутствии 1 М хлорида магния.

Для идентификации энтеровирусов применяют РН, РТГА, РСК, РПГ, РИФ с типоспецифическими иммунными сыворотками.

РН проводят в культуре клеток или на мышях-сосунках по общепринятой методике (см. подразд. 3.1.5).

Идентификацию штаммов вирусов Коксаки А, В и ЕСНО, обладающих гемагглютинирующими свойствами, осуществляют с помощью РТГА с использованием антигенов из зараженных клеточных культур и 1%-й взвеси эритроцитов человека группы 0(1).

Для РСК вместо антисывороток применяют иммунную асцитическую жидкость мышей, обладающую меньшей антикомплемментарностью.

РПГ дает хорошие результаты с антигеном, концентрированным в 200—400 раз.

Для концентрации энтеровирусов применяется бентонитовый метод. К 500 мл культуральной вирусосодержащей жидкости добавляют 0,05—0,1 % геля бентонита по сухому весу сорбента, pH смеси доводят 0,1N раствором HCl до 3,5—4,0. Смесь встряхивают 3—5 мин, центрифугируют при 2000—3000 об/мин в течение 10—15 мин. Осадок (вирус-бентонит) отмывают 20—40 мл дистиллированной воды. Элюцию вируса осуществляют 0,05 М раствором трис-буфера (pH 9,0) при интенсивном встряхивании в течение 4—5 мин. После этого смесь центрифугируют и

исследуют надосадочную жидкость, в которой находится вирус. Этот метод позволяет сконцентрировать вирус в 100—200 раз.

Серологическое исследование. Для серодиагностики применяют РН, РСК, РТГА. Диагностическое значение имеет 4-кратное и более нарастание титра антител. Результаты серологического исследования необходимо сопоставить с вирусологическими, эпидемиологическими и клиническими данными.

Для проведения РН смешивают 100 доз вируса с 2-кратными разведенными сыворотками больного. При проведении РН в культурах клеток результаты учитывают на 3—4-й и 7—8-й день, на мышцах-сосунках — на 10—14-й день.

РСК используют для диагностики полиомиелита. Диагностическое значение имеет выявление антител в титре 1 : 32 и выше, а также увеличение титра антител в четыре раза и более. РТГА для серологической диагностики энтеровирусных инфекций применяется редко.

4.7. Ящур

К семейству *Picornaviridae* относится также вирус ящура (род *Aphthovirus*), который вызывает заболевания у крупного рогатого скота и, реже, у человека. Вирус содержит линейную одноцепочечную РНК.

Материалом для исследования служит содержимое везикул, которые появляются у больного на коже (рук, ног и других частей тела) и слизистых оболочках (языка, полости рта, реже конъюнктивы и наружных половых органов).

Кровь берут без применения антикоагулянтов в начале заболевания и спустя 2—3 нед (парные сыворотки для серологических исследований).

Экспресс-диагностика. Для выявления специфического антигена в мазках из содержимого везикул, мазках-отпечатках афтозных поражений используют РИФ с гомологичными сыворотками к эндемическому серотипу вируса.

Выделение вируса. Вирус выделяют в культуре клеток крупного рогатого скота, коз, хомяков. Применяется также метод внутрикожного заражения (в подушку лапки) морских свинок.

В течение 1—4 дней после заражения у животных развивается нелетальная генерализованная инфекция с вирусемией и сыпью вначале на пораженной конечности (в месте введения), а затем — на слизистой оболочке полости рта. Мышей-сосунков в возрасте 7—14 дней заражают в мозг. Через 1—3 дня у животных появляются спастические параличи и наступает смерть.

Выделенный вирус идентифицируют в РН, РСК, РИФ методом перекрестного иммунитета и патогенности для животных, диф-

ференцируя с вирусами везикулярного стоматита и везикулярной экзантемы свиней. Вирус ящура непатогенен для лошадей при нанесении на слизистую оболочку языка; вирус везикулярного стоматита не вызывает заболевания у коров при внутримышечном заражении, а вирус везикулярной экзантемы свиней непатогенен для коров при любом способе заражения.

Серологическое исследование. Серодиагностика основана на исследовании парных сывороток в РН, РСК с серотипом вируса ящура, циркулирующим в данном регионе. Вирус получают из содержимого везикул зараженных морских свинок, инфицированных мышей-сосунков или из клеточных культур. В качестве контроля можно использовать сыворотки иммунизированных или переболевших морских свинок. РН ставят на культуре клеток, мышцах-сосунках (заражение в мозг), морских свинках (инфицирование в кожу подошвы). Для РСК в качестве антигена используют зараженные культуры клеток и мозг мышей.

Диагностическое значение имеет 4-кратное увеличение титра антител.

4.8. Ротавирусный гастроэнтерит

В настоящее время установлено, что ротавирусы человека (семейство реовирусов) вызывают около 50 % гастроэнтеритов у детей в экономически развитых странах. Этиологическая роль этих вирусов установлена и при гастроэнтеритах животных.

Материалом для исследования служат испражнения больного. Ротавирус регулярно обнаруживается в фекалиях в течение первых 6—8 дней болезни. На 3—5-й день после появления симптомов заболевания его количество бывает максимальным и достигает 10^{10} — 10^{11} вирусных частиц в 1 г фекалий.

Фекалии собирают в стерильные флаконы из-под пенициллина, которые заполняют на $\frac{1}{3}$, закрывают стерильными пробками и транспортируют в контейнерах с тающим льдом. Пробы обрабатывают сразу после доставки в лабораторию или хранят в замороженном виде.

Для ЭМ и вирусологического исследования готовят 10—20%-ю суспензию фекалий на растворе Хенкса. Суспензию центрифугируют 30 мин при 3000 об/мин для удаления крупных частиц, надосадочную жидкость переносят в стерильный флакон, добавляют пенициллин (1000 ЕД/мл) и стрептомицин (500 ЕД/мл) и выдерживают 10—12 ч при 4 °С.

Экспресс-диагностика. В пробах фекалий, взятых в первые дни болезни, концентрация вирусных частиц достигает 10^6 — 10^8 /г и более, что позволяет обнаружить их при электронной микроскопии. Для этого каплю надосадочной жидкости после центрифуги-

рования экстракта фекалий контрастируют 2%-й фосфорновольфрамовой кислотой (рН 6,5), готовят препарат и микроскопируют при увеличении 50 000×.

Наиболее широкое распространение получила ИЭМ, которая дает возможность не только обнаружить вирус в фекалиях, но и идентифицировать его. Для этого 0,1 мл иммунной сыворотки в разведении 1 : 5 смешивают с 0,4 мл 10%-й отцентрифугированной суспензии фекалий. Смесь выдерживают 1 ч при комнатной температуре и 12 ч при 4 °С, а затем центрифугируют в течение 90 мин при 15 000 об/мин. Осадок ресуспензируют в нескольких каплях дистиллированной воды, контрастируют 2%-й фосфорновольфрамовой кислотой (рН 6,5) и просматривают под электронным микроскопом. В препаратах выявляются агрегаты вирионов с характерной морфологией.

Для экспресс-диагностики используют реакцию иммунной преципитации с окрашиванием преципитатов флюоресцирующими антителами. Готовят 2%-ю суспензию фекалий, центрифугируют и пропускают ее через фильтр с диаметром пор 1,2 мкм. Суспензию (0,2 мл) смешивают с 0,2 мл разведенной иммунной сыворотки, выдерживают смесь 1 ч при 37 °С и центрифугируют 1 ч при 12 000 об/мин. Осадок ресуспензируют в 0,2 мл фосфатного буфера и добавляют 0,2 мл флюоресцирующего иммуноглобулина. После инкубации в течение 10 мин смесь центрифугируют 10 мин при 2000 об/мин, осадок ресуспензируют в фосфатном буфере, наносят на предметное стекло, накрывают покровным стеклом и исследуют под иммерсионным объективом в люминесцентном микроскопе.

Наиболее чувствительными методами обнаружения ротавирусного антигена являются РИА и ИФА. Для проведения ИФА в лунки полистироловых планшетов, обработанные противоротавирусными антителами, вносят по 50 мкл 2%-й суспензии фекалий, добавляют в каждую лунку по 25 мкл 2%-й телячьей эмбриональной сыворотки с 0,1%-м твином-20, инкубируют 1 ч при 37 °С, затем трижды промывают лунки фосфатным буфером с твином-20 и вносят 100 мкл конъюгированной ферментом ротавирусной антисыворотки. После инкубации в течение 1 ч при 37 °С лунки промывают и добавляют хромогенный субстрат. Результаты реакции учитывают по интенсивности окраски субстрата.

Все более широкое применение для экспресс-диагностики ротавирусных инфекций находят РОНГА и РГадСТО. Выделение ротавирусов из фекалий осложнено отсутствием чувствительных к ним клеточных культур и животных.

Серологическое исследование. Серодиагностика направлена на обнаружение специфических антител в парных сыворотках крови, взятых в первые 3—4 дня болезни и спустя 12—14 дней от начала заболевания. Наличие антител устанавливают с помощью

ИЭМ, используя в качестве антигена препарат фекалий с высоким содержанием ротавирусных частиц или препарат ротавирусов животных в пассируемых культурах ткани.

Широкое распространение имеет РСК с использованием в качестве антигена заранее отобранных суспензий фекалий больных гастроэнтеритом или ротавирусов животных. Применяют РТГА с антигеном ротавирусов животных, РИФ с культурой клеток, зараженных ротавирусами животных (обычно вирусом диареи телят Небраски), а также РИА и ИФА.

4.9. Вирусные гепатиты

4.9.1. Гепатит А

Понятие «вирусные гепатиты» включает в себя поражения печени, вызванные различными типами вирусов, среди которых могут быть герпесвирусы, цитомегаловирусы и др. Современная классификация *гепатотропных* вирусов включает в себя восемь различных типов вирусов, обозначаемых аббревиатурами из заглавных букв латинского алфавита от А до G (например, *HAV* — *hepatitis A virus* — вирус гепатита А) и вирус *TTV* (*transfusion transmitted virus* — вирус, передающийся при трансфузиях). Вирусы *TTV* и *HFV* мало изучены. Спектр гепатотропных вирусов и информация о них постоянно уточняется и пополняется.

Вирус гепатита А (*HAV*) относится к семейству пикорнавирусов и выделен в отдельный род *Hepatovirus*.

Материал для исследования — фекалии больного. Для выделения вируса готовят 10—40%-й экстракт фекалий, гомогенизированный в фосфатном буфере (рН 7,4). Крупные частицы удаляют низкоскоростным центрифугированием. Вирус концентрируют, комбинируя дифференциальное центрифугирование с экстракцией органическими растворителями (хлороформом), фильтрацией через агарозу (сефарозу *CL-2B*) и плотностным центрифугированием в хлориде цезия.

Наиболее интенсивное выделение вируса с фекалиями больных происходит за несколько дней до начала клинических проявлений инфекции (в конце инкубационного периода), с наступлением манифестной инфекции содержание вируса в фекалиях прогрессивно уменьшается. Концентрация вируса может составлять 10^6 и более вирионов в 1 г фекалий.

Экспресс-диагностика. Быстрое обнаружение вируса осуществляют с помощью ИЭМ, РИА, ИФА.

ИЭМ позволяет выявлять в экстракте фекалий вирусные частицы при концентрации их не ниже 10^4 /г. Экстракт (10—20 %) смешивают со специфической сывороткой в соотношении 9:1,

инкубируют при 37 °С, осаждают центрифугированием при 10 000 об/мин в течение 30 мин и осадок исследуют под электронным микроскопом.

Твердофазный РИА состоит из трех этапов: а) адсорбция антител на поливиниловую поверхность пробирок; б) связывание антигена из фекального экстракта фиксированными антителами; в) определение адсорбированного антигена с помощью специфических, меченных радиоактивным иодом антител. Препарат меченых антител должен содержать 1—2 атома радиоактивного иода на 1 молекулу гамма-глобулина.

Высокой чувствительностью обладает ИФА, позволяющая выявить вирусный антиген в экстракте фекалий с помощью специфической сыворотки и конъюгированной антисыворотки.

Выделение и идентификация вируса. Вирус выделяют путем заражения чувствительных животных (шимпанзе и обезьян-мармозеток), а также культуры человеческих лимфоцитов, стимулированных фитогемагглютинином, фильтратом фекалий. Вирусный антиген в цитоплазме гепатоцитов определяют с помощью РИФ, скопления вируса позволяет выявить также электронная микроскопия.

Серологическое исследование. Серодиагностика основана на выявлении специфических *IgM*, которые появляются очень рано (одновременно с подъемом уровня сывороточных ферментов), а также *IgG*. Для выявления антител классов *IgM* и *IgG* применяются ИЭМ, РСК, РИА, ИФА.

ПЦР. Метод ПЦР в диагностике гепатита А не получил широкого распространения, так как к моменту обращения за медицинской помощью у пациентов уже удается обнаружить специфические *IgM* методом ИФА. Выявление *HAV* методом ПЦР может быть использовано для ранней диагностики гепатита у пациентов с иммунодефицитами, когда титр антител не определяется в ИФА (в качестве мишени при этом используют РНК *HAV*).

4.9.2. Гепатит В

Вирус гепатита В (*HBV*) относится к роду *Orthohepadnavirus* семейства *Hepadnaviridae*. Вирус содержит три антигена — поверхностный *HBsAg* и два внутренних: *HBcAg* (сердцевинный) и *HBеAg*, обладающий свойствами ДНК-полимеразы. В организме больных к каждому из антигенов в различные стадии болезни образуются антитела: анти-*HBs*, анти-*HBc* и анти-*HBе*.

Экспресс-диагностика. При остром вирусном гепатите *HBsAg* обычно появляется в сыворотке крови больного в инкубационном периоде, за 2—8 нед до биохимических изменений и повышения активности аминотрансфераз. Следует отметить, что *HBsAg* удастся определить лишь у 50—80 % больных, поэтому

отрицательный результат не исключает диагноз вирусного гепатита В.

Существуют различные методы выявления *HBsAg* в сыворотке крови. Наиболее простым, обладающим высокой специфичностью, но и менее чувствительным, чем другие методы (ИФА, РИА и РОНГА), является РПГ. Применяют также встречный иммуноэлектрофорез (РВИЭФ). Для повышения чувствительности этих реакций рекомендуется концентрировать сыворотки с помощью высушивания в термостате при 37 °С и последующего разведения в меньшем объеме дистиллированной воды.

Из высокочувствительных методов широкое распространение для экспресс-диагностики гепатита В получили РИМ, РОНГА и ПЦР.

Для определения ДНК *HBV* разработано несколько методов (метод гибридизации, метод гибридизации с усилением сигнала, лигазная цепная реакция и др.), но наибольшее распространение получил метод ПЦР. Его считают арбитражным (референс-методом). Он дополняет метод ИФА-диагностики при бессимптомных, хронических и микст-инфекциях, в других неясных случаях. Количественный вариант ПЦР наиболее часто используют для оценки уровня виремии у хронических больных, получающих противовирусные препараты, и определения эффективности терапии. В качестве мишени для праймеров служат консервативные участки генома вируса (*S* и *C*).

Серологическое исследование. Для выявления антител к антигенам *HBV* применяются РПГ, РВИЭФ. Наиболее чувствительными и специфичными являются РИА, ИФА, а также РНГА с использованием эритроцитов, нагруженных *HBsAg*.

Определение антигенов *HBV* и антител к ним имеет важное значение не только для диагностики вирусного гепатита В, но и для прогнозирования его исходов, так как в разных стадиях болезни обнаруживаются различные маркеры *HBV*. Для инкубационного периода характерно наличие в крови *HBsAg*, который сохраняется в течение 2—5 мес, а при хроническом течении — значительно дольше. В остром периоде болезни появляются *HBcAg* и *HBeAg*. Последний циркулирует в сыворотке крови в течение 1—7 нед, причем его появление на 1—3-й нед болезни прогностически неблагоприятно. Стадия ранней реконвалесценции характеризуется исчезновением из сыворотки крови *HBcAg* и *HBeAg* и появлением в ней анти-*HBc* (в возрастающих титрах), могут появиться также анти-*HBe*. В стадии поздней реконвалесценции в сыворотке крови обнаруживаются антитела ко всем трем антигенам *HBV*.

Хронический агрессивный гепатит В характеризуется циркуляцией в крови *HBsAg* и *HBeAg*, высокими титрами анти-*HBc IgM* (это свидетельствует о продолжающейся репликации вируса).

При носительстве *HBsAg*, помимо этого антигена, в сыворотке выявляются антитела (анти-*HBc*, анти-*HBe IgM* и анти-*HBc IgG* в низких титрах, редко — анти-*HBs*).

При данной форме гепатита нередко выявляется, помимо частиц Дейна, еще один вид вирусных частиц — дельта-частицы (или дельта-антиген). Характерной особенностью дельта-частиц является зависимость их репродукции от репродукции частиц Дейна. Это мелкие РНК-содержащие вирусы, поверхностный (капсидный) белок которых представлен *HBsAg*. Они получили наименование *HDV* и будут рассмотрены ниже.

4.9.3. Другие гепатиты

Вирус гепатита D (*HDV*). *HDV* — дефектный РНК-содержащий вирус рода *Deltavirus* семейства *Togaviridae*. Поскольку в состав вируса входит значительное количество *HBsAg HBV*, самостоятельная инфекция, вызванная вирусом гепатита D, не наблюдается. Таким образом, гепатит D протекает только на фоне гепатита В, осложняя его течение.

Вирус гепатита С (*HCV*). *HCV* — РНК-геномный, включен в состав рода семейства *Flaviviridae*. Выделяют 6 сероваров *HCV*, каждый из которых преимущественно встречается в определенной стране (например, 1-й тип — в США, 2-й тип — в Японии).

Вирус гепатита Е (*HEV*). *HEV* — РНК-геномный, относится к роду *Calicivirus* семейства *Caliciviridae*.

Вирус гепатита G (*HGV*). *HGV* пока четко классифицировать не удастся. В настоящее время его условно относят к семейству *Flaviviridae*.

В связи с большими трудностями при выделении всех перечисленных вирусов практически единственным методом диагностики гепатитов является *серологическая диагностика*. В парных сыворотках крови больных выявляют *IgM* с помощью ИФА, РИА, ИЭМ, РИФ. Для исключения ложноположительных результатов ИФА рекомендуется метод рекомбинантного иммуноблотинга.

Для вирусов гепатита D, E и G можно выявить *IgM* через 10—15 дней после начала клинических проявлений. К антигенам вируса гепатита С *IgM* обнаруживают в среднем через 3 мес. Вирусспецифические *IgG* возможно обнаружить для вирусов гепатита D через 2—11 нед, для вирусов E и G — через 1 мес после перенесенного заболевания.

Во всех случаях эффективным *экспресс-методом* диагностики является выявление вирусной РНК в материале от больных с помощью ПЦР и молекулярной гибридизации. Вирусную РНК обнаруживают с первых суток инфицирования.

ПЦР. ПЦР является важным методом диагностики *HCV*-инфекции, который позволяет выявлять РНК вируса в плазме крови

уже в инкубационном периоде, задолго до появления антител, выявлять вирусемия у бессимптомных доноров крови, оценивать уровень вирусемии у заболевших, что важно для выбора наиболее благоприятного момента для начала противовирусной терапии и прогноза при хронической инфекции. Кроме того, ПЦР является единственным методом, позволяющим отличить перенесенную инфекцию от текущей.

РНК *HDV* обнаруживается методом ПЦР при всех вариантах ко- и суперинфекции с участием этого вируса (исследуют сыворотку, плазму крови, биоптаты печени). Этот метод подтверждает результаты ИФА, которые могут быть сомнительными в период «маскировки» анти-*HDV-IgG* в составе иммунных комплексов.

4.10. Бешенство

Вирус бешенства относится к РНК-содержащим вирусам рода *Lyssavirus*, семейства *Rhabdoviridae*. При бешенстве поражается центральная нервная система, поэтому диагностика заболевания основана на обнаружении в ткани мозга теляц Бабеша — Негри (в области гиппокампа), вирусного антигена или самого вируса. При исследовании животного, нанесшего укус, определяют наличие вируса или вирусного антигена в ткани слюнной железы с помощью РИФ и биологической пробы.

Для выделения вируса на самых ранних стадиях болезни используют спинномозговую жидкость, мокроту, мочу, слюну из-под языка. Ее собирают на ватный тампон, который прополаскивают в нескольких миллилитрах стерильного ИХН и отжимают.

При исследовании материала в течение первых суток пробы хранят при 4 °С. Для транспортировки материал замораживают и пересылают в сухом льду. Для длительного хранения (при –60 °С) готовят 20%-ю суспензию материала.

Экспресс-диагностика. Наиболее распространенным методом исследования является обнаружение теляц Бабеша — Негри в препаратах мозговой ткани при световой микроскопии. Для этого исследуют ткань гиппокампа, кору большого мозга и мозжечка. Предметное стекло слегка прижимают к поверхности среза, отпечаток окрашивают по Романовскому — Гимзе, Туревичу или Муромцеву, высушивают и микроскопируют (с препаратом следует обращаться как с заразным материалом). Тельца Бабеша — Негри видны в цитоплазме крупных нейронов. Они представляют собой сферические или продолговатые образования розовато-фиолетового цвета размером 2 — 10 мкм с видимой внутренней структурой (см. [цв. вклейку, рис. 27](#)).

Вирус выявляют в препаратах мозга с помощью электронной микроскопии. Вирусный антиген в мозговой ткани, отпечатках под-

нижнечелюстных слюнных желез, слизистой оболочки полости рта определяют в РИФ с использованием гипериммунных люминесцирующих сывороток.

Выделение вируса. Для выделения вируса взвесью ткани головного мозга и других органов, погибших от инфекции людей, а также ликвором и слюной больных заражают белых мышей (лучше 1—2-дневного возраста).

В положительном случае у мышей появляются мышечный тремор, расстройство координации, возбуждение или параличи. Обычно животные погибают в течение 5 дней.

Для подтверждения диагноза мозг заболевших мышей исследуют на наличие телец Бабеша—Негри или антигена вируса бешенства в РИФ. Идентификацию проводят с помощью РН на мышах.

Серологическое исследование. Для выявления антител в сыворотке крови больных используют РН на мышах. РТГА, РСК, РИФ, ИФА. Указанные методы применяют также для определения уровня иммунитета людей и животных после вакцинации.

4.11. ВИЧ-инфекция (синдром приобретенного иммунодефицита — СПИД)

Возбудителями ВИЧ-инфекции являются РНК-геномные вирус иммунодефицита человека (ВИЧ-1, ВИЧ-2, английская аббревиатура — *HIV*) из семейства *Retroviridae*, подсемейства *Lentivirinae*.

Лабораторная диагностика ВИЧ-инфекции включает в себя индикацию ВИЧ и его компонентов в материале от больных и выявление противовирусных антител в крови больных и ВИЧ-инфицированных.

Выделение вируса. При выделении ВИЧ из организма больного материалом служит кровь (периферические *T*-лимфоциты), биоптаты костного мозга (лейкоциты), пунктаты из лимфоузлов, сперма, спинномозговая жидкость, возможно, слюна, секционный материал. Культивирование вирусов чрезвычайно затруднено в связи с использованием сложных в работе культур клеток лимфоцитов *H9*, клеток *MT-2* и *MT-4*, полученных из лимфоцитов пупочной вены при трансформации вирусом *HTLV-1*.

Вирусы обнаруживаются в культуре клеток по выраженному ЦПД, образованию симпластов или с помощью РИФ, электронной микроскопии. Возможно определение активности специфического фермента ретровирусов — РНК-зависимой-ДНК-полимеразы (обратной транскриптазы).

Серологическое исследование. При рутинной диагностике наиболее распространены методы серологических исследований, при

которых выявляют специфические антитела в крови больных. С этой целью используют ИФА, РИА, РИФ. ИФА проводится по непрямому или конкурентному методу. В реакциях используют тест-системы, включающие антигены, выделяемые из инфицированных клеточных культур либо полученные с помощью рекомбинантных ДНК.

Для уменьшения количества ложноположительных результатов ИФА рекомендуется проведение фотометрического учета с использованием световых волн разной длины, например 492 нм и 690 нм.

Высокоспецифичным для диагностики ВИЧ-инфекции является метод иммуноблотинга (см. подразд. 1.4.5). При этом проводится электрофоретическое разделение вирусных белков с последующим перенесением их на мембрану из нитроцеллюлозы. Затем мембрана обрабатывается исследуемой сывороткой. Заключительный этап исследования состоит в выявлении антител к различным белкам ВИЧ. Для этого в систему добавляют антивидовые меченые сыворотки. Индикацию образующихся иммунных комплексов проводят с использованием ИФА или РИА. Результаты иммуноблотинга считают положительными при обнаружении антител к определенным вирусным антигенам: *p24*, *p31*, а также к *gp41* или к *gp120*.

Другие методы исследования. Высококчувствительными и специфичными являются *молекулярно-биологические методы*, в частности ПЦР. Обнаружение ВИЧ в крови методом ПЦР возможно в двух вариантах: ПЦР-анализ ДНК провируса ВИЧ, интегрированного в геном мононуклеаров периферической крови, и ПЦР-анализ РНК ВИЧ, входящей в состав вирионов. Качественная ПЦР на ДНК провируса используется для диагностики ВИЧ-инфекции, а ПЦР на РНК вируса — для количественного определения концентрации ВИЧ в крови с целью прогноза уже установленной ВИЧ-инфекции. Чувствительность ПЦР на провирусную ДНК в настоящее время составляет от 96 до 99 %, что объясняют очень низким содержанием провирусной ДНК в клетках крови, а также высокой вариабельностью ВИЧ и неравномерным географическим распространением подвидов вируса. В настоящее время ведется работа по подбору новых праймеров, позволяющих с большей эффективностью выявлять разные подвиды и варианты ВИЧ.

4.12. Парвовирусные инфекции

Возбудителями являются парвовирусы — простые ДНК-геномные вирусы эукариотов (*parvus* — маленький). В настоящее время в семейство *Parvoviridae* входит более 50 вирусов.

Для людей патогенен только один вид — парвовирус *B-19*. Он вызывает патологию и гибель плода, воспалительную инфекцию матки, инфекционную эритему кожи, острые артропатии, васкулиты, тромбоцитопению, гемофагоцитарный синдром, транзиторный апластический криз, петехиальный синдром, хронические инфекции у пациентов с иммунодефицитами, миокардиты, аритмию сердечных сокращений, перикардиты, невралгические амиотрофии, нейропатию плечевого сплетения, гепатиты. Выбор материала для исследования зависит от клинической формы парвовирусной инфекции. В любом случае для исследования берут сыровотку крови.

Серологическое исследование. Инфекции, вызванные парвовирусами *B-19*, в 20—50 % случаев протекают бессимптомно. В связи с этим во многих случаях диагноз может быть установлен только с использованием серологических методов исследования, позволяющих выявить специфические антитела: ИФА, иммуноблотинг.

Для определения *сероконверсии* рекомендуются повторные серологические исследования. Обычно диагноз инфекции *B-19* ставят при обнаружении *IgM* к вирусу *B-19* в сыворотке (приблизительно через 14 дней после начала инфекции). Специфические *IgG* выявляются в течение 4 мес и дольше. Обнаружение *IgG* к вирусу *B-19* свидетельствует о наличии протективного иммунитета. Использование иммуноблотинга позволяет оценить давность инфекции, поскольку антитела к антигену *VP2* появляются раньше, чем антител к антигену *VP1*. Это имеет большое значение для установления сроков инфицирования беременных.

Важным аспектом в проведении иммунологических исследований является подбор источников антигенов для выявления противовирусных антител. В доступных коммерческих тест-системах для обнаружения антител *IgM* и *IgG* к вирусу *B-19* используются рекомбинантные антигены — аналоги белков вируса *VP1* и *VP2*. Следует отметить, что использование синтетических пептидов снижает чувствительность метода.

Диагноз ставят с учетом уровня антител к вирусу *B-19*, клинических проявлений и состояния иммунной системы хозяина.

Выделение вируса. При проведении вирусологических исследований следует учитывать, что для культивирования *B-19* обычные клеточные культуры не подходят. Он развивается в культурах клеток костного мозга человека, селезенки плода, пуповинной крови и культурах периферической крови, стимулированных эритропоэтином. Выход вирусов при этом незначительный. Идентификацию вируса в культуре клеток проводят путем выявления специфических вирусных белков (преимущественно в ядре и периферической части цитоплазмы) в РИФ, а также путем выявления вирусной ДНК с помощью ПЦР или ДНК-гибридизации. При

выявлении вирусной ДНК основным способом является ПЦР, которая позволяет выявить ДНК в сыворотке крови, мононуклеарных клетках периферийной крови, биоптатах синовиальной сумки и т.д. ДНК парвовирусов определяется в инкубационном периоде и острой фазе заболевания. Использование «гнездовой» ПЦР повышает чувствительность определения ДНК парвовирусов в 100 раз. Минимальное количество ДНК, обнаруживаемой с помощью ПЦР, — 10—100 фрагментов.

Сводные данные о методах лабораторной диагностики вирусных инфекций приведены в приложении.

РАЗДЕЛ III

МИКОЗЫ

ГЛАВА 5

МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

Среди представителей обширного царства грибов встречаются более 100 видов, имеющих медицинское значение. В том числе совершенные и несовершенные, дрожжевые, дрожжеподобные, плесневые и диморфные грибы, относимые к условно- и безусловно-патогенным видам. Они вызывают широкий спектр заболеваний (от легких косметических дефектов до жизнеугрожающих системных инфекций), имеющих, как правило, хроническое течение и низкую контагиозность, характеризующихся поражением различных тканей, органов и систем.

Для диагностики микозов применяются микроскопические (в том числе гистологические), микологические (культуральные), аллергические, серологические, экспериментальные, молекулярно-биологические и другие методы исследования. Ввиду морфологического многообразия грибов, а также их медленного роста ведущее значение в диагностике микозов имеют морфологические методы обнаружения и идентификации возбудителя. В зависимости от клинических проявлений болезни исследуемым материалом служат: пораженные волосы, чешуйки кожи, кусочки ногтей, кожные и ногтевые скарификаты, гной, мокрота, пунктаты лимфатических узлов, костного мозга, внутренних органов, кровь, спинномозговая жидкость, желудочный сок, желчь, испражнения, кусочки тканей, полученные при биопсии или аутопсии, и др. Материал берут по возможности из очага инфекции при соблюдении правил асептики эпиляционным пинцетом, скальпелем, препаровальной иглой, лезвием бритвы, ножницами, ложечкой Фолькмана, пастеровской пипеткой и др. Тампонами материал стараются не брать. Чтобы лучше рассмотреть пораженный участок, можно пользоваться лупой, у больных микроспорией — люминесцентной лампой, в лучах которой пораженные волосы имеют изумрудно-зеленое свечение. При подозрении на поражение дерматофитами ногти обрабатывают 70%-м этанолом для инактивации и удаления наружной (сопутствующей) микрофлоры, состригают и в сухом контейнере доставляют в лабораторию. Патологический материал следует брать в количестве, достаточном для

микроскопического изучения в неокрашенном и окрашенном виде, для посева на питательные среды или заражения экспериментальных животных, а также проведения других исследований. Как правило, параллельно с микологическим проводится бактериологическое исследование патологического материала.

При необходимости транспортировки материала в лабораторию его помещают в стерильные пробирки, контейнеры, между предметными стеклами и др., указав в направлении паспортные данные больного, локализацию поражения, дату взятия материала, диагноз. Несмотря на то что многие возбудители микозов устойчивы во внешней среде, материал рекомендуется держать во влажной атмосфере в присутствии кислорода и доставлять в лабораторию в течение 2 ч, особенно в случае контаминации материала бактериями. С возбудителями гистоплазмоза, кокцидиоидоза и других особо опасных микозов работают в специально оборудованных лабораториях с соблюдением специальных правил, позволяющих предотвратить лабораторное заражение и распространение инфекции.

5.1. Микроскопическое исследование

При микроскопическом исследовании изучают неокрашенный (нативный) и окрашенный материал.

Нативные препараты готовят из волос, соскобов с ногтей, чешуек кожи и других тканей, предварительно обработанных 10—30%-м раствором КОН для растворения кератина и просветления препарата (рис. 5.1).

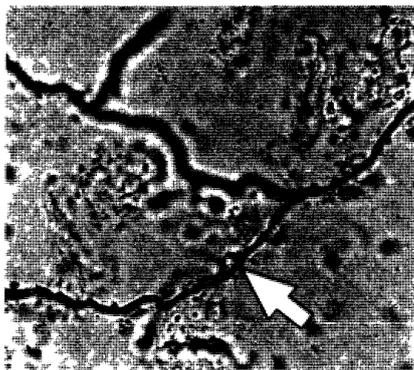


Рис. 5.1. Кожная чешуйка в нативном микропрепарате после обработки 10%-м КОН:

стрелкой показаны гифы возбудителя дерматомикоза

Можно использовать также хлораллактофен по Аману (хлоралгидрат + фенол + молочная кислота), лактофенол (20 % фенола, 20 % молочной кислоты, 40 % глицерина, 0,5 % метиленового синего) или другой раствор. Материал помещают на предметное стекло в каплю КОН, перемешивают, накрывают покровным стеклом и выдерживают 5—15 мин при комнатной температуре, затем прижимают покровным стеклом. Для более выраженного просветления препарат слегка подогревают или применяют для просветления раствор КОН с диметил-

сульфоксидом (ДМСО): 20 г КОН + 100 мл 60%-го ДМСО. После обработки препарат изучают в обычном световом микроскопе (при увеличении 40×, часто с опущенным конденсором) или в фазово-контрастном микроскопе.

Если исследуемый материал жидкий, его предварительно центрифугируют и делают мазки из осадка.

При микроскопии нативных препаратов можно определить характерное расположение спор гриба в пораженных волосах, мицелия в чешуйках кожи и соскобах с ногтей, что позволяет лаборатории дать предварительное заключение. Окончательное заключение о видовой принадлежности гриба дают только после микологического исследования материала.

Окрашенные препараты готовят, как правило, из материала, имеющего вязкую или жидкую консистенцию. В окрашенном материале легче выявить элементы гриба, чем в нативных препаратах. Чаще всего используют следующие методы окраски: по Граму, Романовскому—Гимзе, по Гомори (метенаминовым серебром), по Мак-Манусу (периодной кислотой и реактивом Шиффа), Цилю—Нильсену, Граму—Вельшу, Райту, Лейшману, лактофенолом, лактофуксином, по Аравийскому. Для окраски дерматофитов применяют методы Сабуро, Адамсона, Хоммершмидта, Берка и др.

Для экспресс-диагностики используют специальные методы окраски, так как окраска по Романовскому—Гимзе или по Граму не всегда позволяет выявить в материале клетки грибов. При необходимости применяют люминесцирующие иммунные сыворотки (РИФ).

Клетки грибов, как правило, грамположительны. Окраска по Граму помогает выявить сопутствующие бактериальные клетки и обнаружить капсулу у криптококков. Тушевая (негативная) окраска по Бурри позволяет выявить инкапсулированные клетки *Cryptococcus neoformans* в препаратах ликвора при криптококковом менингите. Окраска по Романовскому—Гимзе используется для обнаружения в мокроте трофозоитов *Pneumocystis carinii*, в крови или костном мозге (как и окраска по Райту) — дрожжевую форму возбудителя гистоплазмоза. Для выявления нокардий и других кислотоустойчивых грибов применяют метод окраски по Цилю—Нильсену или модифицированный метод Хенкса.

Многие методы окраски подробно изложены в специальных руководствах, приводим прописи некоторых из них.

Окраска по Мак-Манусу (Шик-реакция). Фиксированный в абсолютном спирте препарат обрабатывают 5 мин 5%-м раствором иодной кислоты, промывают в течение 2 мин водой, помещают на 2 мин в раствор основного фуксина (0,1 г основного фуксина растирают в 5 мл этилового спирта и 95 мл воды), а затем, быстро промыв водой, опускают на 10 мин в раствор гидросульфита цинка (1 г цинка гидросульфита, 0,5 г виннока-

менной кислоты, 100 мл дистиллированной воды). Промывают 5 мин водой, обезвоживают по 2 мин в возрастающих концентрациях этанола (70—80—95—100 %) и в течение 2 мин просветляют в ксилоле. Грибы окрашиваются в малиновый цвет, фон мазка — бледно-розовый.

Окраска по Граму — Вельшу. Препарат обезжиривают смесью Никифорова в течение 24 ч, окрашивают 1 мин генциановым фиолетовым (1 часть генцианового фиолетового + 2 части анилинового масла), а затем 1 мин обрабатывают смесью 5%-го раствора иодида калия и 3%-го раствора перекиси водорода (1 : 1). Под контролем микроскопа препарат обесцвечивают 1%-м раствором анилина и обезвоживают абсолютным алкоголем.

Окраска лактофенолом. Мазок на стекле заливают на 30—60 мин смесью, содержащей 2 части глицерина и по 1 части карболовой, молочной кислот и дистиллированной воды. При добавлении 5%-го раствора метиленового синего грибки окрашиваются в светло-голубой цвет.

Окраска лактофуксином. Мазок заливают на 4—5 мин смесью, содержащей 0,1 г кислого фуксина на 100 мл молочной кислоты. На розовом фоне отчетливо видны элементы гриба голубого цвета.

Окраска по Аравийскому. Фиксированный над пламенем мазок заливают в чашке Петри гематием Майера (1 г гематеина, 50 мл этилового спирта (95 %), 5 % калийных квасцов, 100 мл дистиллированной воды) и помещают на 15 мин в термостат при 37 °С. Затем краску сливают и 3 мин окрашивают препарат эозином (на 1 мл воды добавляют 5 капель насыщенного спиртового раствора эозина), после чего мазок промывают водой и обрабатывают 1—2 мин 1%-м раствором перманганата калия. Промытый водой препарат просушивают и микроскопируют. Сферулы возбудителя кокцидиоза окрашиваются в желтовато-розовый цвет, оболочка — в бледно-розовый цвет в центре и розово-фиолетовый по краям.

Метод Сабуро. Чешуйки и волосы вначале обезжиривают в хлороформе, затем помещают на часовое стекло с муравьиной кислотой и нагревают до кипения. Хорошо промывают в воде и в течение 1 мин окрашивают насыщенным водным раствором метиленового синего (24 части метиленового синего, 16 частей 5%-го раствора бората натрия, 40 частей дистиллированной воды). Промытый в воде препарат обезвоживают в абсолютном спирте, просветляют ксилолом и заливают канадским бальзамом.

Метод Адамсона. Просветленные в течение 15—30 мин в 10%-м растворе КОН волосы и чешуйки кожи промывают в 1%-м растворе этилового спирта, высушивают и окрашивают в течение 15—60 мин генциановым фиолетовым. На 3—5 мин их погружают в раствор Грама, а потом на 2—3 ч — в анилиновое масло, после чего высушивают фильтровальной бумагой и заливают канадским бальзамом.

Метод Хаммершмидта. Патологический материал, фиксированный в смеси Карнуа (10 г ледяной уксусной кислоты, 60 мл абсолютного спирта, 30 мл хлороформа), в течение 1 мин обрабатывают на стекле 70%-м этанолом. Затем препарат промывают водой и погружают на 10 мин в свежееотфильтрованный насыщенный водный раствор коричневого бисмарка. Осторожно промывают водой, высушивают в спирте восходящей

концентрации или на воздухе, просветляют ксилолом и заливают канадским бальзамом.

Метод Берна. После обезжиривания в смеси Никифорова волосы и чешуйки кожи в течение 1 мин окрашивают раствором Берка (16 частей 5%-го раствора бората натрия, 20 частей насыщенного водного раствора метиленового синего и 24 части дистиллированной воды). Затем препарат помещают в свежеприготовленный жидкий раствор резорцина, промывают этанолом (чешуйки кожи для обесцвечивания обрабатывают перекисью водорода), обезвоживают спиртом возрастающей концентрации (70—95 %), просветляют ксилолом и заливают канадским бальзамом.

Метод Бессоне. После обезжиривания кожи эфиром на участок поражения накладывают полоску липкого целлофана (скотча) и прижимают его пальцем. Затем полоску снимают, прополаскивают в бензоле и липкой стороной накладывают на тщательно обезжиренное предметное стекло. Для получения окрашенного препарата полоску целлофана после снятия с кожи погружают на 15—20 с в раствор Берка, быстро промывают водой и дважды в абсолютном спирте, затем — в бензоле и наклеивают на предметное стекло. Иногда перед нанесением полоски липкого целлофана на кожу окрашивают в течение 15—20 с несколькими каплями красителя (избыток его удаляют фильтровальной бумагой).

Модифицированный метод Хенкса. После приготовления мазка и фиксации его в пламени горелки на него в избытке наливают раствор карболового фуксина и выдерживают 5 мин. Затем краску сливают, заливают мазок 50%-м этанолом и сразу промывают мазок водой. Для обесцвечивания фона на мазок наносят 1%-ю серную кислоту, после чего тщательно промывают мазок водой. Для контрастирования фона мазок докрашивают 2,5%-м метиленовым синим (в 95%-м этаноле) в течение 1 мин. *Nocardia* spp. и другие кислотоустойчивые грибы окрашиваются в бордово-красный цвет, фон — голубой.

Наиболее приемлемым методом окраски гистологических препаратов является метод Гомори, позволяющий выявлять в тканях элементы гриба.

Высокой чувствительностью обладает метод прямой люминесцентной микроскопии (вносимый при обработке препарата флюорохром связывается с полисахаридами клеточной стенки гриба, обеспечивая затем яркое свечение клетки при ультрафиолетовом облучении).

Высоко специфичным методом выявления грибов в тканях является применение прямой РИФ на основе моноклональных антител, меченных флюорохромом.

5.2. Микологическое исследование

Микологическое (культуральное) исследование направлено на выделение чистой культуры гриба и ее идентификацию. Посевы производят на плотные и жидкие, неселективные и селективные питательные среды: Сабуро, сусло-агар, Чапека, кукурузный, ри-

совый, картофельный агар, Френсиса, Полаччи и др. Грибы хорошо растут также на некоторых средах для бактерий — кровяном, шоколадном, сердечно-мозговом агаре, угольно-дрожжевой среде. Их, как и картофельный агар с глюкозой, используют для выделения грибов из «стерильных» материалов (крови, ликвора, биоптатов и т. п.) и инкубирование ведут более длительное время. Для приготовления селективных сред к неселективным добавляют антибиотики (левомицетин — 20—50, стрептомицин — 40, пенициллин — 20 мкг/мл и др.), а также красители (бенгальский розовый и др.) или дезинфектанты. Так, для выделения грибов из контаминированных бактериями материалов используют агар Сабуро с глюкозой, в который добавляют пенициллин и гентамицин или гентамицин и хлорамфеникол.

Для первичной дифференциации грибов за рубежом широко используют хромогенный агар *CHROM*. В его составе имеются хромогенные субстраты, которые при действии на них того или иного фермента грибов расщепляются с образованием окрашенных соединений. В результате этого колонии различных грибов на агаре *CHROM* отличаются по цвету: белые, кремовые, желтые, коричневые, черные, розовые, красные и т. д.

Среды для культивирования дерматофитов и других грибов. Агар Сабуро (г/л): мальтозы (глюкозы) — 40, пептона — 10, агар-агара — 15—18. Стерилизация при 110—112 °С при 0,5 атм в течение 15 мин, рН после стерилизации 5,6—6,8. Для придания селективных свойств в среду вводят хлорамфеникол (50 мкг/мл) или другие антимикробные средства. Применяют для первичного посева исследуемого материала.

Бульон Сабуро (не содержит агар-агара). Применяется для выращивания грибов при изготовлении антигенных препаратов.

Сусло-агар. К 100 мл пивного сусла (с 7—8 % углеводов по Баллингу) добавляют 15—18 г агар-агара. Стерилизация при 110—112 °С в течение 10 мин, рН после стерилизации 6,5—7,0. Применяют, как и агар Сабуро, для первичного посева исследуемого материала.

Агар для дерматофитов, DTM agar (г/л): глюкозы — 10, пептона — 10, фенолового красного — 0,2, агар-агара — 20. Стерилизация при 121 °С (1 атм) в течение 15 мин, рН после стерилизации 5,3—5,7. Для придания селективных свойств в среду вводят: циклогексимид (0,05 %) для подавления роста большинства сапрофитных грибов, хлортетрациклин и гентамицин (по 50 мкг/мл) для подавления роста грамположительных и грамотрицательных бактерий, включая синегнойную палочку. Применяют для первичного посева исследуемого материала.

Среды для выращивания плесневых и дрожжевых грибов. Агар Чанека—Докса (г/л): сахарозы — 30, натрия нитрата — 3, калия гидрофосфата — 1, магния сульфата — 0,5, калия хлорида — 0,5, железа сульфата — 0,01, агар-агара — 15. Стерилизация при 112—120 °С в течение 15 мин, рН после стерилизации 7,1—7,4. Эта синтетическая среда применяется для культивирования грибов, изучения хламидоспор у грибов *Candida* и морфологии аспергилл.

Дифференциальные среды. *Кукурузный агар* (г/л): кукурузной муки — 43, глюкозы — 20, агар-агара — 15. Стерилизация при температуре 110—112 °С в течение 15 мин. Применяется для выявления красного пигмента у *Trichophyton rubrum* и хламидоспор у *Candida albicans*.

Среда Городковой (г/л): мясной воды — 10 мл, пептона — 10, натрия хлорида — 5, глюкозы — 2,5, агар-агара — 15. Стерилизация при 110—112 °С в течение 30 мин. Применяют для выявления аскоспор у дрожжей.

Рисовая среда (г/л): риса очищенного — 20, маннита — 20, *L*-серина — 10, натрия сульфата — 5, агар-агара — 20. Стерилизация при 110—112 °С в течение 20 мин, рН после стерилизации 6,8. Используется для выявления хламидоспор у дрожжеподобных организмов.

Рисовый отвар по Елинову. 20 г очищенного риса кипятят в 1 л дистиллированной воды в течение 30 мин, пропускают через бумажный фильтр и доводят фильтрат до 1000 мл дистиллированной водой, добавляют 20 г маннита, 10 г серина, 5 г натрия сульфата, 20 г агар-агара. Готовую среду осветляют лошадиной сывороткой (70 мл на 1000 мл среды). Стерилизуют при 110—112 °С в течение 20 мин.

Картофельный агар. 20 г тертого картофеля настаивают в 1 л водопроводной воды в течение 4 ч при комнатной температуре, добавляют 20 г агар-агара, кипятят 10—15 мин, фильтруют, разливают в пробирки по 4—5 мл и стерилизуют при 120 °С в течение 30 мин.

Картофельный агар с глюкозой отличается тем, что берут 100 г тертого картофеля и после фильтрования среды добавляют 10 г глюкозы. Стерилизуют, как среду Сабуро.

Солодово-дрожжевой агар с глюкозой (г/л): пептона — 5, дрожжевого экстракта — 3, экстракта солода — 3, глюкозы — 10, агар-агара — 20. Стерилизуют при 120 °С 15 мин, рН после стерилизации 6,2. Для придания селективных свойств после стерилизации среды доводят рН до 4 или добавляют антибиотики.

Культивирование грибов осуществляют, как правило, при 22—28 °С в течение 2—4 нед. Если грибы оказываются в смешанных культурах, их чистые культуры получают после рассевов до изолированных колоний на кровяном агаре или после обработки соляной кислотой (для уничтожения бактерий). В последнем случае культуру гриба засевают в 3 пробирки с 5 мл бульона Сабуро с глюкозой, в которые добавляют 4, 2 и 1 каплю 1 N раствора HCl соответственно. Через 24—48 ч инкубирования при 25 °С по 0,1 мл бульона засевают на агаре Сабуро с глюкозой.

Выделенные культуры гриба идентифицируют по внешнему виду и форме колоний, их консистенции, цвету, способности к росту при 37 °С, микроскопическому строению — характеру ветвления мицелия и наличию в нем септ, расположению конидиеносцев, спор, а также биохимическим и другим признакам. Размеры грибов определяют с помощью окуляра-микрометра. У некоторых грибов изучают способность ферментировать и ассимилировать органические вещества. Для изучения развития мицелия в динамике используют метод микрокультур.

5.3. Серологическое, аллергологическое, биологическое, гистологическое исследование

Серологическое исследование. Реакции агглютинации, преципитации, связывания комплемента, непрямой гемагглютинации, ИФА, иммуноблотинг или иммунофлюоресценции проводят с антигенами из грибов по обычным методикам, используемым для диагностики других инфекций.

Аллергологическое исследование. Аллергические пробы ставят путем внутрикожного введения соответствующих аллергенов (взвеси из убитых грибов, фильтратов культур, полисахаридных и белковых фракций из клеток или клеточных оболочек возбудителей). Результаты учитывают по пятибалльной системе через 20 мин (немедленные) и через 24—48 ч (замедленные реакции).

Кроме того, для выявления микотической сенсибилизации организма применяют иммунологические тесты *in vitro*: дегрануляции базофилов (крови и тканевых), другие тесты гиперчувствительности немедленного типа (см. подразд. 1.5.2), а при гиперчувствительности замедленного типа — реакцию торможения миграции фагоцитов, бластной трансформации лимфоцитов и др. (см. подразд. 1.6).

Биологическое исследование. Заражение экспериментальных животных (мыши, крысы, хомяки, кролики, морские свинки, собаки, кошки) проводят для выделения чистой культуры гриба, изучения патогенных свойств возбудителя, испытания новых лекарственных препаратов. Материал вводят животным различными методами: накожно, внутрикожно, подкожно, внутримышечно, внутрибрюшинно, внутривенно, внутрисердечно, интрацеребрально, в коготь, перорально, интратрахеально. Результаты учитывают по характеру выделенной культуры, данным вскрытия, гистологического исследования на наличие гриба и реакции макроорганизма.

Гистологическое исследование. Этот метод позволяет обнаружить гриб в тканях, изучить его морфологию и особенности патологического процесса, вызванного им в организме.

Материалом для исследования служат ткани, полученные при биопсии и аутопсии. Для диагностики микозов применяются обычные методы гистологического исследования, описанные в специальных руководствах.

Последовательность этапов исследования изложена в разделе лабораторной диагностики отдельных микозов.

ПЦР. Разработаны тест-системы для ПЦР, позволяющие выявлять до 40 видов грибов, включая все клинически важные виды. Например, тест-системы для выявления ДНК *Candida albicans* позволяют обнаружить 10—100 клеток возбудителя на 100 мкл биологического материала. С помощью геномной дактилоскопии ДНК в ПЦР проводят также типирование штаммов *C. albicans*.

Для выявления в клиническом материале *T. rubrum* и *C. neoformans* предложены прямые ПЦР-зонды. Определенные сложности при использовании ПЦР в клинике связаны с ложно-положительными реакциями, обусловленными временным присутствием плесневых грибов (чаще аспергиллов) в респираторном тракте. Значительно более надежные результаты при аспергиллезной инфекции получены в ПЦР с сывороткой или плазмой крови. Для быстрого выявления различных видов *Aspergillus* в крови и бронхиальном секрете предложен новый высокочувствительный вариант двухступенчатой ПЦР с двумя парами «гнездовых» праймеров. Его также применяют для идентификации и дифференциации штаммов возбудителей паракокцидиоидомикоза (*Paracoccidioides brasiliensis*) и гистоплазмоза (*Histoplasma capsulatum*).

ГЛАВА 6

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ОТДЕЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ

6.1. Кандидоз

Возбудителями кандидоза являются дрожжеподобные грибы *Candida albicans* и некоторые другие условно-патогенные представители рода *Candida*. Они отличаются от других грибов наличием псевдомицелия, который формируется за счет удлинения зрелых клеток (бластоспор). Кандиды чаще поражают ослабленных детей и предрасположенных лиц (страдающих дисфункциями иммунной системы, на фоне эндокринной патологии, иммуносупрессивной и гормонотерапии, СПИДа, при мацерации кожных покровов и длительном контакте с сахарами, отмечается также экзогенная, в том числе внутрибольничная инфекция); они могут активизироваться при дисбактериозе, наступающем вследствие нерационального применения антибиотиков. Наиболее частый возбудитель кандидоза — *Candida albicans* — обуславливает около 90 % случаев заболевания и встречается практически при всех локальных формах, а также является основным возбудителем системного кандидоза. Реже кандидоз вызывают другие представители рода — *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* и *Candida glabrata*. В этой связи при диагностике важно вести целенаправленное обнаружение грибов *Candida albicans*.

Лабораторная диагностика кандидоза заключается в выявлении возбудителя методами микроскопии, выделения и идентификации чистой культуры гриба, обнаружения в материале его АГ или НК, а также методами иммунодиагностики (серологичес-

Для выявления в клиническом материале *T. rubrum* и *C. neoformans* предложены прямые ПЦР-зонды. Определенные сложности при использовании ПЦР в клинике связаны с ложно-положительными реакциями, обусловленными временным присутствием плесневых грибов (чаще аспергиллов) в респираторном тракте. Значительно более надежные результаты при аспергиллезной инфекции получены в ПЦР с сывороткой или плазмой крови. Для быстрого выявления различных видов *Aspergillus* в крови и бронхиальном секрете предложен новый высокочувствительный вариант двухступенчатой ПЦР с двумя парами «гнездовых» праймеров. Его также применяют для идентификации и дифференциации штаммов возбудителей паракокцидиоидомикоза (*Paracoccidioides brasiliensis*) и гистоплазмоза (*Histoplasma capsulatum*).

ГЛАВА 6

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ОТДЕЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ

6.1. Кандидоз

Возбудителями кандидоза являются дрожжеподобные грибы *Candida albicans* и некоторые другие условно-патогенные представители рода *Candida*. Они отличаются от других грибов наличием псевдомицелия, который формируется за счет удлинения зрелых клеток (бластоспор). Кандиды чаще поражают ослабленных детей и предрасположенных лиц (страдающих дисфункциями иммунной системы, на фоне эндокринной патологии, иммуносупрессивной и гормонотерапии, СПИДа, при мацерации кожных покровов и длительном контакте с сахарами, отмечается также экзогенная, в том числе внутрибольничная инфекция); они могут активизироваться при дисбактериозе, наступающем вследствие нерационального применения антибиотиков. Наиболее частый возбудитель кандидоза — *Candida albicans* — обуславливает около 90 % случаев заболевания и встречается практически при всех локальных формах, а также является основным возбудителем системного кандидоза. Реже кандидоз вызывают другие представители рода — *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* и *Candida glabrata*. В этой связи при диагностике важно вести целенаправленное обнаружение грибов *Candida albicans*.

Лабораторная диагностика кандидоза заключается в выявлении возбудителя методами микроскопии, выделения и идентификации чистой культуры гриба, обнаружения в материале его АГ или НК, а также методами иммунодиагностики (серологичес-

кие реакции, аллергические пробы). При поражении кожи материалом для исследования являются ее чешуйки и соскоб с ногтей, гнойное отделяемое и пленки со слизистой оболочки губ и полости рта, влагалища, мочеиспускательного канала, наружного слухового прохода, а также с конъюнктивы. При висцеральной форме болезни исследованию подлежат кровь, спинномозговая жидкость, мокрота, испражнения, моча, желчь, мазки со слизистых оболочек, кусочки ткани (биоптаты), пунктаты абсцессов. От трупов для исследования берут кровь из сердца и кусочки внутренних органов.

Микроскопия. Микроскопическое исследование включает изучение неокрашенных и окрашенных препаратов. Чешуйки кожи, соскоб ногтей, некротизированные ткани помещают в каплю КОН, осторожно подогревают над пламенем горелки в течение 1 мин, перемешивают и накрывают покровным стеклом (см. гл. 5). Материал жидкой консистенции можно вносить в глицериново-спиртовую смесь или смесь глицерина с раствором Люголя (для контрастирования оболочек и глыбок гликогена). Микроскопируют вначале с объективом 8×, а затем 40×. В препаратах обнаруживают круглые или овальные почкующиеся дрожжеподобные клетки размером от 3 до 6 мкм и псевдомицелий длиной 20—30 мкм или более (рис. 6.1).

Для исследования окрашенных препаратов на предметном стекле готовят тонкий мазок, подсушивают его на воздухе и фиксируют метиловым спиртом или смесью Никифорова. По Граму *Candida*

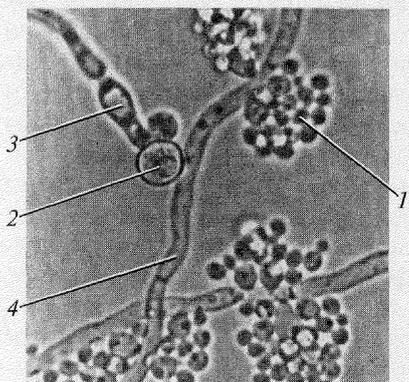


Рис. 6.1. Дрожжеподобные грибы *Candida albicans* в нативном препарате после выращивания на кукурузном агаре:

1 — истинный мицелий; 2 — хламидоспора; 3 — псевдомицелий; 4 — бластоспоры

окрашиваются в темно-фиолетовый цвет, иногда с розовой центральной частью клетки, по Цилю—Нильсену — в синий с розовато-желтыми включениями липидов, по Романовскому—Гимзе — в розовато-желтый цвет с темно-фиолетовыми включениями волютина и красным хроматиновым веществом. При исследовании тканей диагностически важным признаком является обнаружение так называемого инвазивного роста (наличие в ткани ветвящихся нитей псевдомицелия грибов, окруженных лейкоцитами).

Дифференциацию с патогенными грибами в исследуемом материале осуществляют также с помощью РИФ.

Микологическое исследование. Выделение чистой культуры производят на плотных средах — Сабуро, сусло-агаре, Кандида-агаре или др. Для подавления роста сопутствующих бактерий к этим средам добавляют пенициллин, стрептомицин или другие антибактериальные препараты. Посевы культивируют при 30 °С. Колонии *Candida* через 2—3 сут имеют средние размеры, беловато-желтый цвет и матовую поверхность, по мере роста они приобретают перламутровый оттенок и у них появляется куполообразное возвышение (напоминают капли сметаны или майонеза). Выделенную чистую культуру для выявления псевдомицелия сеют в жидкие среды — картофельную, морковно-картофельный отвар и др. В жидких питательных средах *Candida* образуют равномерную муть или осадок, нередко — пленку на поверхности среды. При положительных результатах псевдомицелий можно обнаружить на 3—5-й день, иногда на 10—15-й день культивирования и позже (пользуются объективом с малым увеличением). Наряду с псевдомицелием у этих грибов встречается истинный мицелий (например, при росте на кукурузном агаре). Основные морфологические особенности возбудителя кандидоза представлены на рис. 6.1.

Для идентификации вида грибов рода *Candida* определяют тип филаментации, наличие хламидоспор, изучают ферментативную активность.

Важным отличительным и в то же время просто определяемым признаком грибов *C. albicans* является способность образовывать ростовые трубки — трубкообразные выросты бластоспор (признак РТ).

Тест на ростовые трубки C. albicans. Материал из колонии грибов деревянной палочкой-аппликатором переносят в 0,5 мл стерильной сыворотки телянка (сыворотку можно хранить до 6 мес в замороженном состоянии). После приготовления суспензии клеток в сыворотке пробирки помещают в термостат при 37 ± 1 °С на 2,5—3,0 ч. Затем из смеси готовят препарат раздавленной капли и микроскопируют с объективом 40х. В качестве положительного

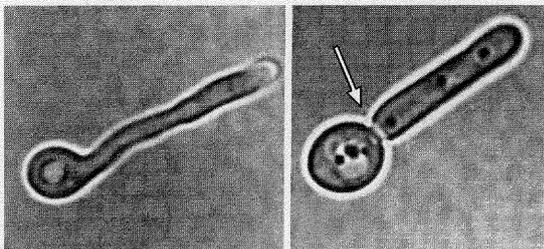


Рис. 6.2. Ростовая трубка *Candida albicans* (слева) и вытянутая бластоспора *Candida tropicalis* (справа)

контроля (РТ+) используют штамм *Candida albicans* ATCC 60193, а качестве отрицательного (РТ-) контроля — *Candida tropicalis* ATCC 66029. Ростовые трубки отличаются тем, что у них нет перемычки или сужения на месте соединения с бластоспорой, они тоньше, чем удлиненная бластоспора или псевдомицелий у *C. tropicalis* (рис. 6.2). Этот тест используется для быстрой ориентировочной идентификации *C. albicans*. Культуры *C. albicans*, не образующие ростовые трубки (РТ-), как правило, авирулентны.

Для определения хламидоспор культуры засевают на «голодные» среды (рисовый, Хламидоспор-агар или др.) и инкубируют в условиях пониженной температуры и/или сниженной концентрации кислорода. Например, расплавленный Хламидоспор-агар наливают тонким слоем на предметное стекло; после застывания на его поверхность наносят испытываемую культуру в виде нескольких параллельных штрихов. Затем часть штрихов накрывают покровным стеклом и инкубируют при 22—25 °С в течение 4—7 сут. Посевы изучают под микроскопом, отмечая недалеко от края покровного стекла появление на концах мицелия хламидоспор — крупных двуконтурных образований с зернистым содержимым.

Для дифференциации с другими грибами у культур проверяют наличие капсулы и уреазную активность (у кандид отсутствуют), определяют способность ассимилировать и ферментировать углеводы (глюкозу, мальтозу, сахарозу, галактозу и др.).

За рубежом для *скрининговых исследований* на *C. albicans* применяют специальные диски с хромогенными субстратами, позволяющие выявлять специфичные для этого вида грибов ферменты: *L*-пролинаминопептидазу и β-галактозамидазу. Диск вносят в пробирку для тестирования и смачивают 1 каплей деминерализованной воды, затем на него наносят суточную культуру гриба, выращенную на агаре Сабуро с глюкозой, и инкубируют 30 мин при 35 °С. Затем в пробирку добавляют 1 каплю 0,3%-го раствора гидроксида натрия и наблюдают развитие желтого окрашивания (свидетельствует об активности *L*-пролинаминопептидазы). Далее, если добавить 1 каплю реактива с коричным альдегидом, то в течение 1 мин развивается розово-красное окрашивание, свидетельствующее об активности β-галактозамидазы. Положительный скрининговый тест на оба фермента в сочетании с наличием ростовых трубок считаются достаточными для идентификации *C. albicans*.

Серологическое исследование. Серодиагностику обычно проводят при висцеральных формах кандидоза. Она включает РСК, РА, ИФА и другие реакции, которые проводят с парными сыворотками по общепринятым методикам. Результаты исследования считают положительными при нарастании титра антител в динамике заболевания. Антигены для этих реакций готовят из культуры *Candida*, предпочтительно — из аутоштамма. Для РСК берут 2—3 разных антигена (полисахаридную фракцию культуры гриба, антигены типа лизатов или ультразвуковых дезинтегратов). При про-

ведении РА лучше использовать взвесь живой культуры гриба в концентрации 2 млрд клеток в 1 мл. Высокой чувствительностью обладают РНГА и ВИЭФ. Для серодиагностики кандидоза, как правило, используют не одну, а две—три реакции, что повышает достоверность диагноза.

Аллергологическое исследование. При проведении аллергической пробы используют стандартный кандидозный аллерген — взвесь клеток грибов (200 млн в 1 мл), прогретую при 80 °С в течение 2 ч. Аллерген в объеме 0,1 мл вводят внутрикожно, для ослабленных детей ее разводят в 10 раз. Результаты реакции (гиперемия, папула) учитывают через 24—48 ч. Ввиду широкого распространения сенсибилизации к антигенам грибов аллергопроба имеет ограниченное диагностическое значение, но может служить показателем эффективности индивидуальных иммунных реакций на АГ грибов *Candida*.

ПЦР. С помощью амплификации видоспецифического фрагмента ДНК *S. albicans* этот микроорганизм обнаруживают в ПЦР через 6 ч от начала анализа клинического образца.

6.2. Другие оппортунистические микозы

К возбудителям этих заболеваний относят условно-патогенные грибы родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Pneumocystis* и др. Они вызывают у предрасположенных лиц широкий спектр заболеваний, которые могут варьировать по остроте, локализации процесса и тяжести в зависимости от характера и степени иммунодефицита вплоть до системных жизнеугрожающих инфекций.

Основной возбудитель аспергиллеза — *Aspergillus fumigatus*, другие виды (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*) встречаются реже. Некоторые виды аспергилл (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*) продуцируют афлатоксины, обладающие высокой токсичностью и канцерогенностью, которые могут быть причиной афлатоксикоза. К возбудителям пенициллеза относят *Penicillium marneffeii*, реже — другие виды *Penicillium*. Возбудителями зигомикоза (мукороза, мукоморомикоза) являются *Absidia corymbifera*, *Rhizomucor pusillus*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus microsporus* и другие грибы. Возбудителем пневмоцистоза является *Pneumocystis carinii*.

Плесневые микозы наиболее часто встречаются у работников пивоваренных заводов, имеющих контакт с заплесневелым зерном, у грузчиков зерновых культур, мукомолов, рабочих силикатной промышленности, ткацких, шпагатно-веревочных фабрик, откормщиков голубей и др., а также у лиц, постоянно вдыхающих растительную пыль, содержащую споры плесневых грибов. Афлатоксикоз возникает в результате употребления в пищу зер-

на, орехов и других пищевых материалов с афлатоксинами, накопившимися в них при вегетации указанных выше грибов рода *Aspergillus*.

Материалом для исследования при оппортунистических микозах являются мокрота, гной, кусочки тканей из пораженных органов и др.

Микроскопия. Для выявления структуры гриба (головка, мицелий, стеригмы со спорами) микроскопическое исследование нативных и окрашенных препаратов производят с сухой системой (см. цв. вклейку, рис. 28).

Микологическое исследование. Для выделения чистой культуры гриба делают посевы на среду Сабуро и другие микологические среды. Полученные колонии идентифицируют по морфологическим, культуральным и биологическим свойствам (см. цв. вклейку, рис. 29).

Иммунологические исследования. Для выявления антител в сыворотке крови применяют *серологические реакции* — РП, РСК, ИФА и др. В качестве вспомогательных методов диагностики используют *аллергические пробы* с соответствующими антигенами.

Наиболее достоверным в лабораторной диагностике этих микозов следует считать получение культуры возбудителя при исследовании биоптатов или пунктатов из закрытых очагов поражения (абсцессы, воспалительные участки тканей), повторное обнаружение в значительных концентрациях гриба одного и того же вида в сочетании с клинико-эпидемиологическими, патоморфологическими и иммунологическими данными. Аспергиллы можно проверять на токсигенность путем заражения морских свинок или кроликов, но чаще афлатоксины идентифицируют в экстрактах хроматографическими методами.

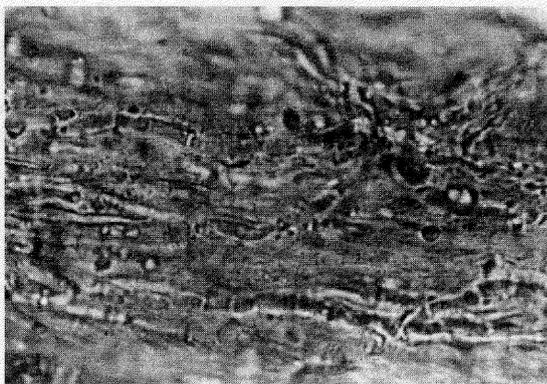
Разработаны методы ПЦР-диагностики оппортунистических микозов (аспергиллеза и др.).

6.3. Дерматомикозы

Возбудителями дерматомикозов являются условно-патогенные грибы из родов *Microsporum* (микроспория), *Trichophyton* (трихофития, фавус), *Epidermophyton* (эпидермофития) и др. При соответствующих условиях они могут поражать волосистую часть головы, кожу, ногти. В зависимости от локализации процесса исследуют волосы, чешуйки кожи, соскобы из глубоких слоев ногтя, фавозные щитки.

Микроскопия. Для микроскопического исследования берут волосы, чешуйки эпидермиса, измельчают их и вносят в каплю 10—20 %-го раствора гидроксида калия на предметном стекле. Препарат подогревают до появления паров или оставляют на 15—20 мин

Рис. 6.3. *Trichophyton schonleinii* внутри волоса больного фавусом



(соскобы с ногтей — на 1—2 ч), затем накрывают покровным стеклом и микроскопируют при малом увеличении. В случае *Microsporum canis* волос как бы окутан чехлом из мозаично расположенных очень мелких клеток. При надавливании чехол разрушается и внутри волоса видны мицелий и беспорядочно (мозаично) расположенные группы спор. При поверхностной форме трихофитии внутри волоса видны споры *Trichophyton violaceum*, располагающиеся по его длине в виде рядов или цепочек (тип *endothrix*). При глубокой трихофитии споры обнаруживаются как внутри, так и снаружи волоса (тип *ectothrix*).

Волос, пораженный возбудителем фавуса (*Trichophyton schonleinii*), содержит, помимо септированного и несептированного мицелия и пузырьков воздуха, разнообразные элементы: ветвящиеся гифы, напоминающие рога оленя или канделябры, круглые и четырехугольные гифы и др. (рис. 6.3). При эпидермофитии в обрывках эпидермиса среди клеток обнаруживают толстые нити гриба.

Микологическое исследование. Посев материала дает возможность на основании изучения культуральных свойств определить род грибов — возбудителей дерматомикозов. Исследуемый материал сеют на плотную среду (например, агар Сабуро с глюкозой, гентамицином и пенициллином или агар Сабуро с 2% дрожжевого лизата, метиленовым синим и стрептомицином). Для этого волосы или чешуйки измельчают и 4—5 кусочков переносят на поверхность среды в пробирке, которую инкубируют при 27 °С или при комнатной температуре. Через 3—4 нед после посева образуются колонии, типичные по морфологии, консистенции и цвету. На основании изучения структуры колоний и данных их микроскопии определяют вид гриба.

При диагностике микроспории используют люминесцентную лампу Вуда, в ультрафиолетовых лучах которой пораженные волосы светятся голубовато-зеленым цветом.

Серологическое исследование. Для серологической диагностики висцеральных (генерализованных) форм дерматомикозов в качестве вспомогательных методов применяют РА, РП, РСК с сыороткой больных и соответствующими антигенами.

Аллергологическое исследование. Аллергические пробы ставят путем внутрикожного введения 0,1 мл стандартных аллергенов (трихофитина, микроспорина, фавина). Положительная реакция характеризуется появлением красноты и инфильтрата. Результат учитывают через 24—48 ч.

Разработаны методы ПЦР-диагностики дерматомикозов (трихофития).

6.4. Глубокие (висцеральные) микозы

6.4.1. Криптококкоз

Возбудителем криптококкоза (европейского бластомикоза) является *Cryptococcus neoformans* — микроорганизмы 3-й группы патогенности. Поражаются мозг, реже легкие, кожа, подкожная клетчатка и слизистые оболочки. Диссеминированный криптококкоз характерен для лиц с выраженным иммунодефицитом. До 80 % криптококковых менингитов приходится на больных СПИДом. Возбудитель проникает в организм человека из почвы, растений, пищевых продуктов, а также из мест гнездования голубей и других птиц.

Микроскопия. Материалом для исследования служат мокрота, гной, осадок центрифугированной спинномозговой жидкости, кости, кусочки биоптаты тканей из очагов поражения и аутопсийный материал. В неокрашенных препаратах возбудитель, окруженный слизистой желтоватой капсулой, имеет вид округлых или яй-

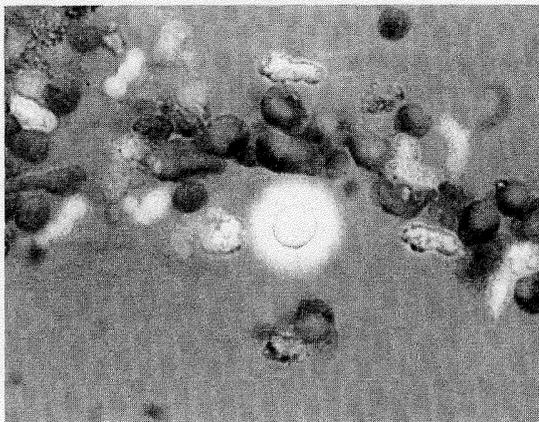


Рис. 6.4. *Cryptococcus neoformans* в тушевом препарате из ликвора: видна выраженная капсула вокруг сферической дрожжевой клетки

цевидных клеток размером $2 \times 5 - 10 \times 20$ мкм, иногда с одной удлиненной почкой. Капсулу выявляют также в тушевых препаратах (рис. 6.4). Иногда исследуют гистологические препараты, окрашенные гематоксилином или муцикармином. Обнаружение в патологическом материале дрожжевых грибов, окруженных большой капсулой, позволяет поставить предварительный диагноз. Следует отметить, что капсулу могут образовывать и некоторые другие дрожжевые грибы (*Rhodotorula* spp., иногда некоторые виды *Candida*).

Микологическое исследование. Исследуемый материал засевают на среду Сабуро, пивное сусло или другие микологические среды с добавлением антибиотиков (без циклогексимида) и выращивают при $25 - 30$ °С. На плотных средах через 1 — 5 сут образуются гладкие колонии от беловато-желтого до темно-коричневого цвета, сметанообразной консистенции. Идентификацию *S. neoformans* проводят по морфологическим, культуральным свойствам, способности расти при 37 °С, образованию уреазы, фенолосидазы, а также неспособности к росту в присутствии циклогексимида, ассимилировать лактозу и неорганический азот (углеводы не ферментируют все криптококки).

Серологическое исследование. В сыворотках больных агглютинины, преципитины, комплементсвязывающие антитела обнаруживаются в невысоких титрах и непостоянно. В этой связи серодиагностика имеет вспомогательное значение и используется в основном при отрицательных результатах обнаружения возбудителя в патологическом материале. Обычно с сывороткой больного ставят реакцию латекс-агглютинации. Чувствительным методом диагностики является также РИФ.

Биологическое исследование. Исследование включает внутрибрюшинное или интрацеребральное введение мышам крови, осадка мочи и экссудата от больных людей. Через 2 и 4 недели животных забивают, асептически удаленные печень, селезенку, мозг измельчают и засевают на среды с антибиотиками. Выделенные культуры грибов идентифицируют по морфологическим, культуральным и биохимическим свойствам.

Разработаны методы ПЦР-диагностики криптококкоза.

6.4.2. Североамериканский бластомикоз (болезнь Джилкрайста — Стокса)

Североамериканский бластомикоз вызывают *Blastomyces dermatitidis* — диморфные грибы 2-й группы патогенности. Этот микоз представляет собой локальное или системное хронически протекающее заболевание с гнойным поражением органов дыхания, кожи, подкожной клетчатки, костей, внутренних органов.

Микроскопия. Для диагностики чаще всего используют микроскопическое исследование гноя из свищей и абсцессов, спинно-

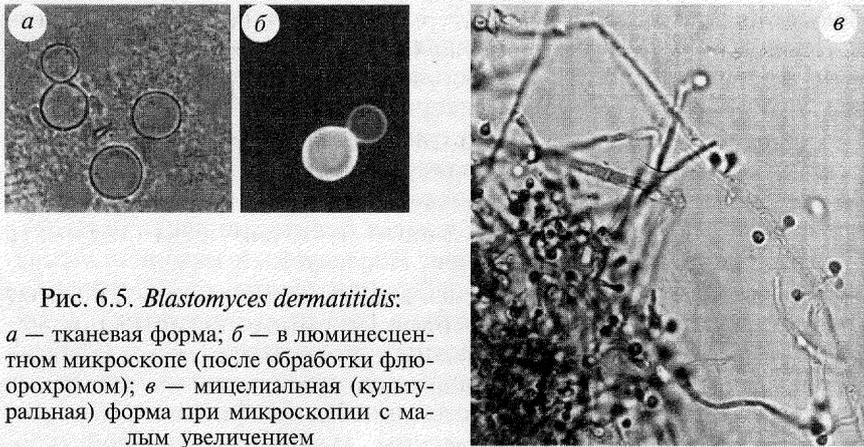


Рис. 6.5. *Blastomyces dermatitidis*.

a — тканевая форма; *б* — в люминесцентном микроскопе (после обработки флюорохромом); *в* — мицелиальная (культуральная) форма при микроскопии с малым увеличением

мозговой жидкости, мокроты, мочи, пунктата лимфатических узлов и другого патологического материала. В нативном препарате из материала, обработанного щелочью, обнаруживают круглые или овальные клетки размером 8—15 мкм с двуконтурной оболочкой; для почкующихся клеток характерны широкие перетяжки (рис. 6.5). В гистологических препаратах возбудитель обнаруживают после окраски по Романовскому—Гимзе или по Райту. Окончательный диагноз устанавливают после выделения грибов в ходе микологического исследования.

Микологическое исследование. Для выделения чистой культуры исследуемый материал сеют на среду Сабуро, сахарный или сусло-агар и выращивают в течение 4—6 нед при 20—25 °С. Бластомицеты образуют складчатые или воскоподобные белые колонии, которые в дальнейшем по мере роста воздушного мицелия становятся серыми или коричневыми. В мазках из культуры гриба обнаруживают капсулу, широкий септированный мицелий с толстыми стенками. Конидии круглые, овальные или грушевидные, имеют размер 2—10 мкм. В старых культурах можно наблюдать хламидоспоры размером 7—18 мкм. Выделить чистую культуру можно путем заражения белых мышей с последующим посевом пораженной ткани на питательные среды. Идентификацию подтверждают способностью гриба трансформироваться в дрожжевую форму при температуре культивирования 37 °С, выявлением экзоантигена А гифов гриба и методами генодиагностики. Для выявления диморфного роста плесневую форму засевают на кровяной агар с настоем мозга и сердца и культивируют при 37 °С. Через 7—10 дней в мазках образованных колоний обнаруживают дрожжеподобные клетки возбудителя. Экзоантиген мицелиальной формы гриба идентифицируют в реакции иммунодиффузии с диагностической сывороткой и концентрированным экстрактом

бульонной или агаровой культуры возбудителя. Метод идентификации нуклеиновых кислот возбудителя бластомикоза используется для быстрого обнаружения возбудителя в исследуемом материале.

Серологическое исследование. Для серодиагностики применяют РСК. Комплексы связывающие антитела в достаточных титрах выявляются лишь на поздних стадиях заболевания. Через 2—3 нед заболевания антитела можно выявить у большинства больных в реакции иммунодиффузии.

Аллергологическое исследование. Аллергические внутрикожные пробы проводят аллергеном — бластомицином, который получают из экстракта клеток возбудителя. Ввиду перекрестных реакций диагностическая ценность пробы невысока.

6.4.3. Южноамериканский бластомикоз (паракокцидиоидоз)

Возбудитель *Paracoccidioides brasiliensis* поражает кожу, слизистую оболочку полости рта и носовой части глотки, внутренние органы, лимфатические узлы. Эти грибы относят к микроорганизмам 2-й группы патогенности, а заболевание характеризуется эндемичным распространением (Южная и Центральная Америка).

Микроскопия. Изучают нативные или окрашенные по Граму, Романовскому—Гимзе, реактивом Шиффа, по Гридди и другими методами мазки гноя, мокроты, отделяемого свищей, биоптаты и т.д. Клетки гриба крупные (30—60 мкм), имеют круглую или эллипсоидную форму и толстые стенки. Материнская клетка окружена мелкими (2—10 мкм) дочерними бластоконидиями и иногда имеет вид короны или корабельного штурвала (рис. 6.6). В отличие от возбудителя бластомикоза место соединения дочерних клеток с материнской узкое. Окончательный диагноз устанавливают после выделения и идентификации возбудителя.

Микологическое исследование. Для выделения чистой культуры материал сеют на среду Сабуро, питательные среды с углево-

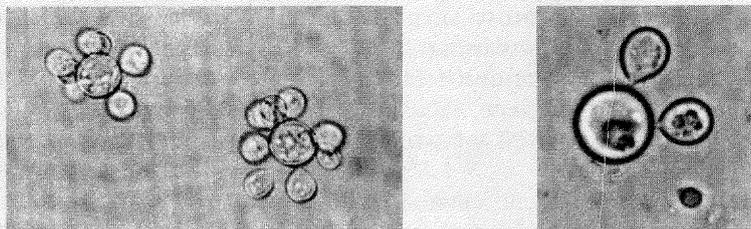


Рис. 6.6. *Paracoccidioides brasiliensis* в нативном микропрепарате: множество почкующихся дрожжевых клеток, по виду напоминающих корабельный штурвал

дами и дрожжевым экстрактом, кровяной или сывороточный агар. *P. brasiliensis* растет медленно, образуя через 3—4 нед при 37 °С белые или кремовые колонии, состоящие дрожжевых клеток размером 40—50 мкм, окруженных множеством бластоконоидий на узком основании («корабельный штурвал»). При более длительном культивировании появляются признаки мицелиального роста. Поскольку морфологические признаки мало специфичны, для подтверждения идентификации в реакции иммунодиффузии с помощью диагностической сыворотки определяют тип экстрагируемого экзоантигена гриба (1, 2, 3).

Другие исследования. Проводится также биологическое исследование — внутрибрюшинное заражение мышей и морских свинок с последующим обнаружением гриба во внутренних органах. При серологическом исследовании сывороток больных наиболее специфична реакция иммунодиффузии. Специфические антитела обнаруживают также в РСК, особенно на поздних сроках заболевания. Аллергическая проба специфична с аллергеном из тканевой формы гриба.

Разработаны методы ПЦР-диагностики паракокцидиоидоза.

6.4.4. Гистоплазмоз

Гистоплазмоз — широко распространенный природно-очаговый микоз. Возбудитель — *Histoplasma capsulatum* — относят к микроорганизмам 2-й группы патогенности. Заражение происходит чаще при вдыхании пыли с высоким содержанием частиц помета птиц и летучих мышей в регионах с теплым климатом. Клинические проявления варьируют: острая или хроническая пневмония, поражение кожи, подкожной клетчатки, слизистых оболочек, генерализованные поражения ретикуло-эндотелиальной системы, внутренних органов, развитие анемии, перитонита, менингоэнцефалита и др. Работать с культурой следует в условиях режима, принятого для особо опасных инфекций. Материалом для исследования служат гнойное отделяемое язвенных поражений кожи и слизистой оболочки, мокрота, кровь, моча, спинномозговая жидкость, пунктаты костного мозга, подкожной клетчатки. Различают гистоплазмоз американский (возбудитель *H. capsulatum* вариант *capsulatum*) и африканский (возбудитель *H. capsulatum* вариант *duboisii*). Для последнего характерны поражения кожи, подкожной клетчатки и костей у жителей сельской местности в Габоне, Уганде и Кении.

Микроскопия. Исследование гноя, мокроты и экссудата позволяет выявлять клетки возбудителя в цитоплазме гиперплазированных фагоцитов в виде овальных дрожжеподобных особей размером 10—15 мкм, микроконидии имеют размер 3—5 мкм. *H. capsulatum* вариант *duboisii* могут обнаруживаться внеклеточно

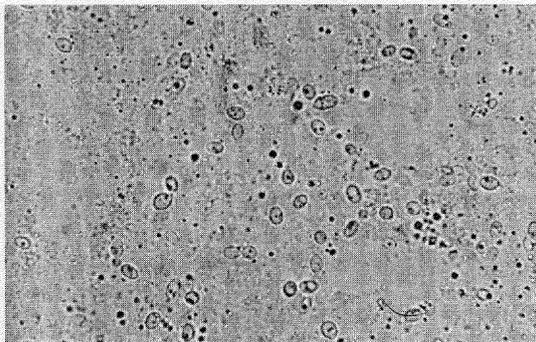


Рис. 6.7. *Histoplasma capsulatum* в нативном микропрепарате из мокроты: видно множество овальных дрожжевых клеток

(рис. 6.7). Мазки окрашивают по Романовскому — Гимзе, Райту, Лейшману и другими методами.

Гистологическое исследование. Для этого исследования препараты-срезы окрашивают реактивом Шиффа, гематоксилин-эозином, по Граму — Вейгерту — Боголепову и другими методами. Возбудитель расположен в цитоплазме лимфоцитов и гистиоцитов в виде небольших округлых одиночных или почкующихся клеток. В зависимости от выраженности инфекционного процесса наблюдают различные варианты воспалительной реакции тканей хозяина. Наиболее часто гистоплазмы обнаруживают в биоптатах кожи, слизистых оболочек и органов ретикуло-эндотелиальной системы. В неокрашенных и окрашенных препаратах гистоплазмы дифференцируют с лейшманиями, токсоплазмами, бластомицетами, кокцидиями, криптококками и другими микроорганизмами. Два биовара гистоплазм различают по морфологии лишь по их тканевым фазам. Ввиду морфологического сходства с возбудителями других системных микозов для подтверждения диагноза необходимо проводить выделение и идентификацию культуры гистоплазм.

Микологическое исследование. Для выделения культуры гриба исследуемый материал сеют на среду Сабуро, сывороточный, кровяной агар или другие микологические среды. Можно заражать куриные эмбрионы. Для стимуляции роста гистоплазм к средам добавляют тиамин, а с целью подавления бактериальной микрофлоры вводят пенициллин и стрептомицин. Посевы выдерживают при 25—30 °С и 37 °С в течение 3—6 нед. Гистоплазмы образуют блестящие беловатые или коричневатые дрожжеподобные колонии мягкой консистенции, которые состоят из округлых клеток диаметром 4—5 мкм с мелкими почками на тонких ножках. При более низкой температуре инкубирования возбудитель образует

белый волокнистый мицелий, образованный в зрелых колониях бугорчатыми макроконидиями и/или мелкими каплевидными конидиями. Выделенную культуру идентифицируют, как и другие диморфные грибы, не только по морфологическим и культуральным признакам, но и по антигенной структуре (реакция иммунодиффузии с диагностической сывороткой к экзоантигену *h* или *m*, получаемым методом экстракции из бугорчатых макроконидий).

Биологическое исследование. Хорошие результаты дает внутрибрюшинное заражение исследуемым материалом белых мышей или золотистых хомячков. Через 1 мес после заражения животных забивают, измельченные печень и селезенку засевают в три пробирки с глюкозной средой Сабуро и выдерживают 4 нед в термостате при 25, 30 и 37 °С, затем в посевах определяют наличие гистоплазм.

Другие исследования. Для *экспресс-диагностики* гистоплазмоза в материале определяют присутствие нуклеиновых кислот возбудителя. Разработаны методы ПЦР-диагностики гистоплазмоза.

Для *серологической диагностики* ставят РИФ, реакцию агглютинации латексных частиц, РИД и РСК с гистоплазмином (получают из гифов) или АГ дрожжевой формы гриба.

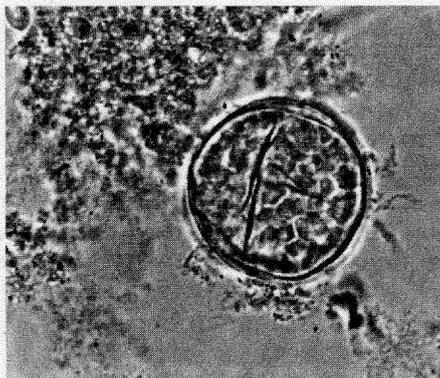
С целью выявления сенсibilизации к *H. capsulatum* больным проводят *внутрикожную пробу* с гистоплазмином. Ввиду перекрестных реакций и позднего появления положительного результата (через несколько месяцев после начала заболевания) методы иммунодиагностики имеют второстепенное значение.

6.4.5. Кокцидиоидоз

Возбудитель кокцидиоидоза — *Coccidioides immitis* обитает в почве и также относится к диморфным грибам 2-й группы патогенности, вызывающим системные микозы. У людей заболевание характеризуется поражением легких, кожи, подкожной клетчатки, мозговых оболочек и других тканей организма. Исследуемым материалом служат гной, мокрота, кровь, спинномозговая жидкость, биопсийный (операционный) материал.

Микроскопия. Исследование нативных препаратов после обработки КОН и окрашенных препаратов методами Романовского—Гимзы, Райта и Мак-Мануса позволяет обнаружить шаровидные, с двухконтурной оболочкой образования размером 20—60 мкм (сферулы), наполненные мелкими (2—4 мкм) округлыми эндоспорами, встречаются разрушенные сферулы (рис. 6.8). В биоптатах отмечается гнойная гранулематозная реакция с полиморфноядерной инфильтрацией, скоплением лимфоцитов, эпителиоидных и гигантских клеток (в зависимости от стадии созревания сферул). В плевральном выпоте и ликворе при гранулематозных поражениях иногда обнаруживают нитевидные формы гриба.

Рис. 6.8. *Coccidioides immitis* в нативном микропрепарате из мокроты после обработки КОН: видна заполненная эндоспорами округлая сферула возбудителя



Микологическое исследование. Это исследование проводят в специализированных лабораториях при соблюдении особого режима безопасности. Посевы делают на скошенные микологические среды в пробирках. На плотных средах через 1 нед при 37 °С *C. immitis* образует колонии кожистой консистенции, врастающие в субстрат; при 25 °С развивается мицелиальная форма гриба. Цвет колоний варьирует от желтоватого до коричневого. Мицелий септирован, артроконидии крупные толстостенные, размером 2—3 × 4—6 мкм, чередуются в гифах с тонкостенными клетками.

Для идентификации грибов применяют реакцию иммунодиффузии или прямую РИФ с сыворотками к экзоантигенам *HS*, *F* или *HL* кокцидий. Применяют также методы геноидентификации.

Биологическое исследование. Высоко чувствительны к возбудителю мыши, у которых после ингалирования единичных артроконидий развивается летальная инфекция. Заражение хомяков и самцов морских свинок (интратестикулярно или интраперитонеально) приводит к развитию тканевых форм гриба — сферул. Ввиду высокой опасности и продолжительности биологическое исследование проводится редко.

Аллергологическое исследование. Для подтверждения диагноза используют аллергические пробы с кокцидиоидином (аллергеном мицелиальной формы) и сферулином (аллергеном тканевой формы), которые при легочном кокцидиоидозе обычно бывают положительными через 1—4 нед после начала заболевания.

Серологическое исследование. Для сероэпидемиологических исследований в очагах применяют реакцию латекс-агглютинации или иммунодиффузии. Для диагностики и оценки состояния больных ставят РП, РСК, РИФ, ИФА, позволяющие выявлять титры специфических *IgM* и *IgG*. Для подтверждения кокцидиоидного менингита важным является обнаружение антител в ликворе больных, так как другие методы исследования при этой форме заболевания часто оказываются безрезультатными.

6.4.6. Споротрихоз

Споротрихоз, вызываемый *Sporothrix schenckii* — грибами 3-й группы патогенности, относится к глубоким микозам, возникающим в результате попадания гриба в рану. Заболевание характеризуется поражением подкожной клетчатки и лимфатических узлов, образованием мелких гумм в глотке, гортани, мышцах, синовиальных оболочках, костях, суставах, возникновением абсцессов в мышцах и внутренних органах, развитием пневмонии, пиелонефрита. Чаще всего заболевают лица, контактирующие с растениями, древесиной и ее производными.

Материалом для исследования служат гной из свищей и язвенных поражений, соскобы с краев язв, пунктаты закрытых воспалительных очагов, биоптаты пораженных тканей.

Микроскопия. При микроскопическом исследовании обнаруживают септированный мицелий размером 10—50 мкм с характерными конидиями споротриксов в виде гроздей (цветков маргаритки). В окрашенных и неокрашенных препаратах находят небольшие (2—5 мкм), слегка заостренные на концах овоидные или сигароподобные конидии, расположенные попарно или в виде розеток на концах мицелия (рис. 6.9).



Рис. 6.9. *Sporothrix schenckii*: видна характерная конидия со спорами

Обнаружение споротриксов возможно и с помощью иммунных флюоресцирующих сывороток (прямая РИФ).

Микологическое исследование. Для выделения чистой культуры посева производят на плотные и жидкие микологические среды, которые инкубируют при 25 °С или комнатной температуре. На 20—25-е сут вырастают колонии, вначале дрожжеподобные кремовые, затем, по мере роста мицелия, становятся вельветоподобными, коричневыми или черными. При бактериоскопии обнаруживают ветвистый, септированный мицелий шириной 2—6 мкм коричневого цвета и овальные споры, расположенные на стеригмах размером 2—5 мкм. При 37 °С растут в дрожжевой форме — в виде единичных овальных толстостенных клеток.

Биологическое исследование. Для дифференциации от сапрофитных грибов проводят биопробу на белых мышцах, которым культуру вводят интратрастектурно. При микроскопии пораженных

тканей отмечают трансформацию мицелиальной формы гриба в дрожжевую. Мышей, крыс, морских свинок используют также для внутрикожного заражения, в результате чего у животных развиваются гранулематозные поражения внутренних органов.

Серологическое исследование. Для выявления антител в сыворотке крови больных проводят РА, РСК и ИФА со споротрихозными антигенами, а также реакцию агглютинации латекса. Хороший результат дают аллергические пробы со споротрихином.

6.4.7. Хромомикоз

Возбудителями хромомикоза являются *Phialophora verrucosa*, *Fonsecaea compacta*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Exophiala jeanselmei* и другие условно-патогенные дематиевые грибы. При этом заболевании, имеющем хроническое течение (10—30 лет), у человека на конечностях возникают бородавчатые, папилломатозные разрастания, покрытые корками, мелкие и крупные абсцессы и гранулематозные очаги.

Микроскопия. Исследование включает микроскопию гноя, соскоба пораженной ткани, биоптатов в капле 10%-м раствором КОН или в растворе спирта с глицерином. При микроскопии обнаруживают золотисто-коричневые округлые клетки гриба размером 4—15 мкм, часто в окружении гигантских склероциев — клеток с продольными и поперечными перегородками (рис. 6.10). По Романовскому—Гимзе стенки клеток окрашиваются в зеленый цвет, по Цилю—Нильсену — в красный.

Микологическое исследование.

Выделение культур производится на среде Сабуро или других микологических средах при 25—28 °С (рост появляется на 3—12-е сут). В жидкой среде грибы дают складчатую пленку и рыхлый войлокоподобный осадок в виде комка на дне пробирки. Культуры идентифицируют по морфологическим признакам и характеру спороношения. Фиалоспоры имеют темно-зеленый или черный цвет, септированный мицелий; характерным признаком является расположение 1—2 конидий в бокаловидных конидиеносцах. Колонии выпуклые, пушистые или бархатистые, мышиного цвета. При исследовании тканевых форм гриба,

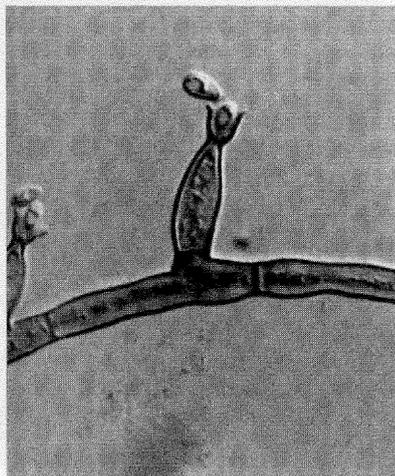


Рис. 6.10. *Phialophora verrucosa*: видны характерные конидиеносцы, напоминающие кубок или бокал

окрашенных по Романовскому — Гимзе или Цилю — Нильсену, обнаруживают крупные (6—8 мкм), округлые образования буроватого или янтарно-желтого цвета. Культивирование при 37 °С способствует формированию на 5—6 сут желтоватых колоний, образованных дрожжеподобными клетками гриба размером 2—7 мкм. Этот метод исследования дает более достоверные результаты по сравнению с микроскопией нативного материала.

Другие исследования. Комплексная микробиологическая диагностика хромомикоза, помимо микроскопического и культурального исследований, включает *серодиагностику* (с сыворотками больных ставят РП и РСК, используя специфические антигены); применяют также *аллергические пробы*. В ряде случаев используют *биологический метод* — интратестикулярное заражение самцов морских свинок.

6.4.8. Феогифомикоз (кладоспориоз)

Возбудитель — *Cladophialophora bantiana* (ранее *Cladosporium trichoides*) — нейротропные плесневые грибы, относимые к 2-й группе патогенности. Заболевание представляет собой глубокий микоз с преимущественным поражением ткани головного мозга, в которой образуется инкапсулированный, чаще одиночный абсцесс; поражаются и другие ткани, с образованием воспалитель-

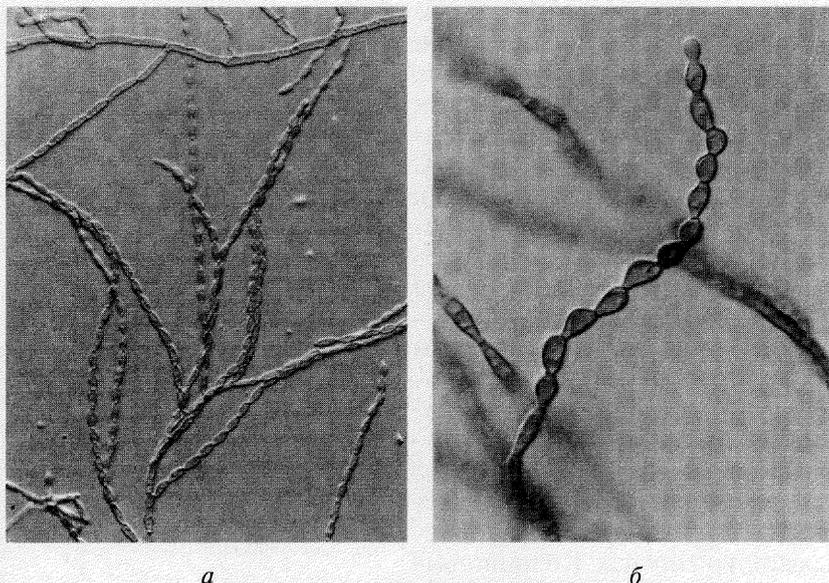


Рис. 6.11. *Cladophialophora bantiana* (*Cladosporium trichoides*):
видны длинные редко ветвящиеся цепочки бластоконий

ных инфильтратов и гранулем. Кладоспориоз встречается преимущественно в странах с жарким климатом. Болеют в основном сельскохозяйственные рабочие, а также лица, подвергавшиеся травмам головы.

Ввиду опасности заражения при вдыхании клеток гриба исследования проводят в специализированных лабораториях с ламинарными боксами и другими мерами предосторожности. Материалом для исследования являются гной абсцессов, биоптаты пораженных тканей.

Микроскопия. При этом исследовании в серовато-зеленоватом гное из очагов поражения и в тканях обнаруживают нити септированного мицелия 1,5—2,0 мкм шириной, 7—9 мкм длиной и цепочки коротких, округлых почкующихся клеток. В пораженной ткани мозга *S. bantiana* выглядит в виде септированных, бледно-коричневых нитей шириной 1,5—3,0 мкм и конидиофор с длинными, редко ветвящимися цепочками округлых бластоконидий (рис. 6.11).

Микологическое исследование. Выделение чистой культуры ведут путем посева, например, на среду Сабуро. На среде Сабуро образуются колонии диаметром 3—4 см серовато-коричневого или оливкового цвета, бархатистые, складчатые, кратерообразные. При бактериоскопии находят септированный мицелий и конидиофоры коричневого цвета. Только обнаружение тканевых форм гриба и получение чистой культуры позволяет установить диагноз болезни.

Серологические и аллергические реакции для диагностики кладоспориоза не применяются из-за низкой специфичности.

РАЗДЕЛ IV

ИНФЕКЦИИ, ВЫЗЫВАЕМЫЕ ПРОСТЕЙШИМИ

ГЛАВА 7

МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

Лабораторная диагностика заболеваний, вызываемых простейшими, включает микроскопическое (протозоологическое), культуральное, иммунологическое, аллергическое и биологическое исследования (табл. 7.1).

Таблица 7.1

Лабораторные методы диагностики протозойной инфекции

Инфекция	Материал для микроскопического исследования	Культуральное и биологическое исследования	Иммунологическое исследование
Амебиаз	Кал в нативных или окрашенных мазках (раствором Люголя, кислых или основных красителей, консервантами Барроу, Сафарлиева, гематоксилином по Гайденгайну)	Выделение амеб на средах Павловой, Рейса, с печеночным экстрактом. Заражение 2—3-недельных крысят, котят, щенков, морских свинок	РП, ИФА
Малярия	Кровь — мазок и толстая капля, окрашенные по Романовскому—Гимзе		РИФ, ИФА (при тропической малярии)
Токсоплазмоз	Кровь, пунктат лимфатических узлов, ликвор — мазки, окрашенные по Романовскому—Гимзе. Гистологические препараты лимфатических узлов, головного мозга и пр.	Заражение белых мышей	РСК, РИФ, РНГА, ИФА, внутрикожная проба с токсоплазмином

Инфекция	Материал для микроскопического исследования	Культуральное и биологическое исследования	Иммунологическое исследование
Трипаносомоз	Кровь — мазок и толстая капля, окрашенные по Романовскому—Гимзе (в острой стадии болезни). Пунктаты лимфатических узлов, ликвор — мазки, окрашенные по Романовскому—Гимзе. Гистологические препараты из пораженных тканей (американский трипаносомоз)	Выделение культур из крови, пунтатов лимфатических узлов, спинномозговой жидкости на средах <i>NNN</i> , Рашке и Райханова, Вейнмана, <i>LIT</i> . Заражение мартышек (гамбийский трипаносомоз), белых мышей или крыс (родезийский трипаносомоз), морских свинок (американский трипаносомоз). Ксенодиагностика	РА, РП, РСК, РИФ, ИФА (только при американском трипаносомозе)
Лейшманиоз висцеральный	Пунктаты костного мозга, лимфатических, узлов, селезенки, мазки, окрашенные по Романовскому—Гимзе. Гистологические препараты костного мозга, селезенки, печени	Выделение культур лейшмании из крови, пунктата костного мозга, селезенки на средах <i>NNN</i> , Роджерса. Заражение белых мышей, хомяков	РСК, РИФ, РПГ, ИФА, ИПП
Лейшманиоз кожный	Соскобы кожных элементов — мазки, окрашенные по Романовскому—Гимзе. Гистологические препараты (биопсийный материал из пораженной области)	Выделение культур из соскобов кожных элементов на средах <i>NNN</i> , Роджерса. Заражение белых мышей, хомяков	ИФА, внутрикожная проба с лейшманином
Лямблиоз	Кал, осадок дуоденального содержимого — нативные мазки	Заражение белых мышей	—

Инфекция	Материал для микроскопического исследования	Культуральное и биологическое исследования	Иммунологическое исследование
Трихомо- ниаз моче- половой	Отделяемое слизи- стой оболочки поло- вых органов, моче- испускательного ка- нала, секрет пред- стательной железы — мазки (нативные или окрашенные метиле- новым синим)	Выделение культур на средах Павловой, МПБ, Джонсона — Гросселя	—
Трихомо- ниаз ки- шечный	Кал — мазки (на- тивные или окра- шенные по Романов- скому — Гимзе)	—	—
Баланти- диаз	Кал — нативные мазки	Выделение культур на средах Павловой, Рейса. Заражение 2—3-недельных крысят, котят, щенят, морских свинок и пр.	—

7.1. Микроскопическое исследование

Микроскопическое исследование направлено на выявление паразитов в нативных и окрашенных препаратах. Материалом для исследования могут быть кровь — мазок и толстая капля (плазмодии малярии, трипаносомы, бамбезии, реже — лейшмании), пунктаты грудины или лимфатических узлов (трипаносомы, лейшмании), спинномозговая жидкость (трипаносомы), соскоб с кожных элементов (лейшмании), фекалии (амебы, балантидии, лямблии, криптоспоридии, изоспоры, циклоспоры, балантидии, трихомонады), дуоденальное содержимое (лямблии), отделяемое слизистой оболочки наружных половых органов или мочеиспускательного канала (трихомонады). Кроме того, простейшие можно обнаружить в гистологических препаратах, изготовленных из пораженных тканей (висцеральный лейшманиоз, трипаносомоз, токсоплазмоз, микроспоридиоз, злокачественная форма малярии и др.).

Для окрашивания препаратов простейших необходимы следующие компоненты: азур-зозин по Романовскому — Гимзе, раствор

Люголя, консервант Барроу, консервант Сафарлиева, фосфатный буфер и некоторые другие реактивы — спирт, формалин и т. д.

Консервант Барроу. Он состоит из двух компонентов: а) консервирующего раствора, в состав которого входят: натрия хлорида — 0,7 г, формалина — 5 мл, этанола (96 %) — 12,5 мл, фенола — 2,0 г, дистиллированная вода — до 100 мл; б) красящего раствора — 0,01%-й раствор азура или тионина. Смесь Барроу используется для обнаружения кишечных простейших при длительном хранении материала (в течение 1 мес с момента получения).

Консервант Сафарлиева. Консервант состоит из цинка сульфат — 1,65 г, формалина — 10,0 мл, фенола — 2,5 г, уксусной кислоты (конц.) — 5,0 мл, метиленового синего — 0,2 г, дистиллированной воды — до 100 мл. Применяется для выявления кишечных простейших в тех случаях, когда консервированный материал исследуют более чем через 1 мес после получения.

Широко применяется окраска по Романовскому—Гимзе. Фиксированные мазки заливают свежим красителем Романовского—Гимзы на 25—45 мин (в зависимости от температуры воздуха в помещении). Для ускорения окраски можно подогреть краситель до 60—70 °С, не допуская закипания(!). Мазки промывают струей воды и сушат в вертикальном положении.

Окраска по Романовскому—Гимзе в модификации Филиппсона. Смешивают 1 часть красителя Романовского—Гимзы и 3 части 95%-го этилового спирта. Нефиксированные мазки заливают этой смесью на 1,0—1,5 мин, затем, не сливая краски, осторожно по каплям добавляют такое же количество дистиллированной воды, не допуская, чтобы жидкость сливалась со стекла. Через 20—30 мин мазки промывают водой и высушивают.

Окраска по Лейшману. Краситель представляет собой смесь (1,0—0,2 г азура + 0,2 г метиленового синего + 0,2 г желтого водорастворимого зозина в 10 мл метилового спирта), которую наливают на мазки на 3—4 мин, после чего добавляют по каплям равное краске количество дистиллированной воды. Через 5—10 мин краситель смывают дистиллированной водой, препарат высушивают и микроскопируют.

Исследование крови. При диагностике протозойных заболеваний проводят микроскопию обычных мазков и препарата толстой капли, который готовят несколькими способами (рис. 7.1).



Рис. 7.1. Разные способы приготовления препарата толстой капли

Методика приготовления мазка. 1. Предметным стеклом касаются выступившей капли крови и, не отнимая его от капли, круговыми движениями доводят диаметр капли до 1,0—1,5 см.

2. Предметным стеклом касаются выступившей капли крови, затем углом другого предметного стекла размазывают каплю до нужного диаметра и толщины. Можно делать четырехугольную толстую каплю (способ *Walker*), при этом форменные элементы крови и паразиты распределяются более равномерно, чем в обычной толстой капле, где середина толще краев.

3. Готовят мазок несколько толще, чем обычно, не подсушивают и наносят на него каплю крови. Растекаясь, она образует правильный диск, диаметр которого определяется объемом капли, но толщина остается примерно одинаковой. В таком препарате форменные элементы и паразиты распределяются более равномерно, чем в обычной капле.

4. Способ получения двуслойной капли по Штанько: каплю готовят по п. 3, дают подсохнуть ее краям, а затем сверху наносят еще одну каплю крови. При этом объем исследуемой крови увеличивается и вероятность обнаружения паразитов возрастает в 2 раза.

5. Способ Мошковского предусматривает приготовление на одном предметном стекле комбинированного препарата, состоящем из тонкого мазка, и на небольшом расстоянии от него — толстой капли.

Толстую каплю независимо от способа приготовления высушивают постепенно (не на солнце и без подогрева) и не фиксируют. Окрашивают спустя несколько часов после взятия крови 4—5%-м водным раствором красителя Романовского—Гимзы в течение 20—25 мин.

Микроскопия спинномозговой жидкости, пунктата лимфатических узлов и костного мозга. Мазок готовят обычным способом (так же, как и мазок крови), фиксируют, окрашивают по Романовскому—Гимзе и микроскопируют с использованием иммерсионной системы.

Исследование соскоба с кожного инфильтрата. Препарат готовят следующим образом: нужный участок кожи протирают спиртом, обескровливают путем сдавливания двумя пальцами и, не ослабляя давления, концом острого скальпеля делают поверхностный надрез кожи. Со дна и краев надреза этим же скальпелем соскабливают пораженную ткань и быстро наносят полученный материал тонким слоем на предметное стекло. Мазки высушивают, фиксируют метиловым спиртом или смесью Никифорова и окрашивают по Романовскому—Гимзе.

Нативные мазки из фекалий, дуоденального содержимого, выделений из мочеполовых путей и др. Препараты изучают под микроскопом для обнаружения простейших, обитающих в пищевом канале, мочевых путях и половых органах. При исследовании свеже собранного материала (т.е. не позднее чем через 30 мин после взятия) сохраняется подвижность паразитов.

Для приготовления эмульсии фекалий на предметное стекло наносят 2 капли ИХН и рядом на расстоянии 2—3 мм такое же количество раствора Люголя. Концом деревянной палочки берут частицу фекалий и растирают в капле ИХН. Аналогично готовят эмульсию фекалий в капле раствора Люголя. Обе капли накрывают покровными стеклами и исследуют сначала при малом, а затем при большом увеличении микроскопа. Эмульсия фекалий должна быть не слишком густой, так как тогда ее будет трудно микроскопировать, и не слишком слабой, чтобы не затруднить обнаружение простейших. Если препарат приготовлен правильно, через него хорошо виден печатный текст. При невозможности исследования нативных испражнений их помещают в консерванты, что позволяет обнаруживать простейших в течение длительного времени.

Консерванты Барроу или Сафарлиева разливают в пенициллиновые флаконы (примерно до половины флакона), затем в них вносят свежие фекалии в объеме $\frac{1}{3}$ от внесенного консерванта. Смесь перемешивают стеклянной палочкой для приготовления эмульсии, флакон закрывают резиновой пробкой, которую закрепляют липкой лентой. На каждом флаконе должна быть этикетка с данными об обследуемом и с датой взятия материала. Перед исследованием консервированный материал не перемешивают. Для приготовления мазка каплю придонного осадка пипеткой переносят на предметное стекло и тщательно растирают стеклянной или деревянной палочкой до получения гомогенной эмульсии. При использовании консерванта Барроу в материал добавляют каплю красителя. Затем полученный мазок накрывают покровным стеклом и микроскопируют под большим увеличением микроскопа.

Внутренняя структура живых вегетативных форм простейших лучше выявляется при витальном окрашивании растворами кислых или основных красителей в ИХН. Применяют трипановый синий (1 : 5000—1 : 10 000), янусовый зеленый (1 : 10 000—1 : 500 000), нейтральный красный (1 : 200 000), метиленовый синий (1 : 1000—1 : 10 000). Препараты с этими красителями готовят и микроскопируют, как описано выше.

Мазки микроскопируют при малом увеличении, для выявления мелких простейших необходимо исследование при большом увеличении. Микроскопируя нативные мазки, нужно обращать внимание на форму, особенности движения простейших, наличие и характер включений и пр. В препаратах, окрашенных раствором Люголя, обращают внимание на форму, число и особенности строения ядер в цистах, наличие парабазальных тел, фибрилл, размеры, форму и интенсивность окраски гликогеновых вакуолей. Для изучения живых простейших используются методы фазово-контрастной микроскопии.

При исследовании дуоденального содержимого используют все три порции, получаемые при дуоденальном зондировании, но без примеси желудочного сока. Материал (порции *A*, *B* и *C*) отдельно выливают в чашки Петри, выбирают на предметные стекла слизистые комочки и готовят препараты для микроскопии. Затем желчь центрифугируют и из осадка делают мазки, которые микроскопируют под малым, а затем под большим увеличением. Для увеличения достоверности результатов следует просмотреть большое количество препаратов (10—20). В дуоденальном содержимом могут быть обнаружены вегетативные формы лямблий (*Giardia lamblia*).

Исследование выделений из половых органов проводят при подозрении на трихомоноз. Каплю отделяемого из влагалища наносят на предметное стекло, накрывают покровным и сразу же микроскопируют. В таком препарате обнаруживаются подвижные формы простейших. Высушенные и фиксированные мазки можно окрашивать метиленовым синим, по Граму или по Романовскому—Гимзе. Последний метод считается наиболее эффективным, так как позволяет легко идентифицировать трихомонады.

Методы концентрации (обогащения) цист. Эти методы применяются при скудном содержании цист в исследуемом материале. Они основаны на всплывании цист в растворах с высокой относительной плотностью (флотация) или на осаждении цист в жидкостях с низкой плотностью (седиментация).

Флотация сульфатом меди. Готовят суспензию фекалий в воде (1 : 10), процеживают через металлическое сито или один слой марли в центрифужную пробирку объемом до 10 мл и центрифугируют 3—4 раза по 1 мин при 1500—2000 об/мин, заменяя каждый раз по 2—3 мл надосадочной жидкости соответствующим объемом воды и смешивая с ней осадок энергичным встряхиванием. Затем к осадку добавляют 2—3 мл раствора сульфата меди, содержимое перемешивают, доливают водой до первоначального объема и центрифугируют 1 мин. При этом цисты всплывают, образуя поверхностную пленку, которую снимают гельминтологической петлей и исследуют в мазках с раствором Люголя, разведенным водой в 5 раз. Вместо сульфата меди можно использовать сульфат цинка (33%-й раствор).

В процессе обогащения вегетативные формы простейших погибают, а цисты частично подвергаются деструкции.

Формалин-эфирное обогащение. В пробирки наливают по 6 мл раствора, состоящего из формалина (10 мл), хлорида натрия (0,85 г) и дистиллированной воды (до 100 мл). Деревянной палочкой в пробирку вносят небольшое количество фекалий (величиной с горошину), тщательно перемешивают, добавляют 2 мл эфира, закрывают пробирки резиновыми пробками, энергично встряхивают 1 мин и центрифугируют 3 мин при 1500 об/мин. После центрифугирования между слоями эфира (верхний) и формалина (нижний) образуется слой фекалий. Его осторожно

отделяют от стенок пробирки деревянной палочкой и выливают все содержимое пробирки, кроме придонного осадка. Держа пробирку отверстием вниз, быстро протирают ватным тампоном ее внутренние стенки для удаления возможно большего количества жидкости. Перевернув пробирку отверстием вверх, пипеткой со дна собирают оставшуюся жидкость, переносят ее на предметное стекло, добавляют каплю раствора Люголя, накрывают покровным стеклом и микрокопируют.

Раствор Барбагалло. Он применяется для консервирования испражнений (3%-й раствор формалина в ИХН): 1 часть материала смешивают с 3—4 частями раствора, смесь хранят в плотно закрытой посуде. Цисты дизентерийной амебы сохраняются в этом растворе 2 нед, других простейших — многие годы, но при этом выщелачиваются гликогеновые вакуоли. Vegetативные формы простейших разрушаются раньше.

Консервирующая смесь РВА. Эта смесь содержит поливиниловый спирт, предназначена для фиксации фекалий перед окраской. Состав смеси РВА: глицерин — 1,5 мл, ледяная уксусная кислота — 5 мл, жидкость Шаудина — 93,5 мл и поливиниловый спирт (порошок) — 5,0 г (растворяют в приготовленной смеси на водяной бане при 75 °С). Исследуемый материал смешивают с консервантом 1:3—1:5 и хранят в плотно закрытой посуде. Готовят мазки, 3 ч сушат их в термостате при 37 °С, проводят через 70%-й этанол с иодом и промывают 70%-м спиртом, затем мазки протравливают в железоаммиачных квасцах, окрашивают гематоксилином по Гейденгайну и помещают в канадский бальзам.

Раствор мертиолат-иодформалина. Он применяется также для консервации, окраски и концентрации простейших (жидкость MIF): вода дистиллированная — 250 мл, раствор мертиолата № 99 1:1000 — 200 мл, формалин — 25 мл, глицерин — 5 мл. Раствор хранят в темной, плотно закрытой склянке. Отдельно готовят 5%-й раствор Люголя (пригоден для употребления не более трех недель).

Непосредственно перед применением к 1,35 мл жидкости MIF добавляют 0,15 мл раствора Люголя, в смеси тщательно размешивают 0,25 г фекалий и отстаивают ее. Каплю из верхнего слоя осадка микрокопируют. Для фиксации простейших используется смесь Шаудина, состоящая из насыщенного раствора сулемы (2 части) и 95%-го этанола (1 часть).

Окраска железным гематоксилином по Гейденгайну применяется для выявления тонких деталей строения ядра и цитоплазмы простейших.

Мазки фиксируют в смеси Шаудина в течение 15 мин, последовательно проводят через 70%-й, этанол, спирт с иодом и снова 70%-й спирт (по 3—5 мин) и протравливают в 3%-м растворе железо-аммиачных квасцов в течение 4—24 ч. Затем мазки промывают водой, окрашивают 1%-м раствором гематоксилина 4—24 ч и удаляют избыток краски, поместив препарат в 1%-й раствор железоаммиачных квасцов. При появлении структур протоплазмы и ядра (контроль под микроскопом) удаляют воду путем проведения через спирты (50, 70, 95 %) и карболксилол (по 3—5 мин в каждом). Затем проводят через чистый ксилол (2—3 мин), помещают в канадский бальзам и высушивают.

Предложена упрощенная и ускоренная модификация этого метода, для которой необходимы следующие компоненты: раствор А (1%-й раствор гематоксилина в 95%-м этиловом спирте); раствор Б (железоаммиачные квасцы — 4,0 г, ледяная уксусная кислота — 1 мл, концентрированная серная кислота — 0,12 мл, дистиллированная вода — 100 мл). Равные объемы растворов А и Б смешивают и оставляют на ночь в плотно закрытом флаконе. Мазки фиксируют в смеси Шаудина, удаляют фиксатор, окрашивают 3 мин смесью растворов А и Б, отмывают в проточной воде 5—30 мин, высушивают и помещают в канадский бальзам.

7.2. Культуральное исследование

Питательные среды для культивирования простейших должны содержать кровь или нативную сыворотку, яичный белок, углеводы, аминокислоты и другие вещества. Реакция среды, как правило, слабощелочная (рН 7,0—7,6). Большинство простейших культивируют при 37 °С, но лейшмании и трипаносомы лучше развиваются при 20—26 °С. Для длительного хранения засеянных сред пробирки герметизируют, заливая пробку расплавленным парафином.

При лейшманиозах и трипаносомозах материалом для исследования служит кровь больных, пунктат костного мозга, лимфатических узлов, селезенки, спинномозговая жидкость, а также соскоб с бугорков или краевых инфильтратов язвы.

Среды для культивирования трипаносом и лейшманий. *Среда NNN-агар.* Агар-агар — 14,0 г, натрия хлорид — 6,0 г, свежая дефибринированная кровь кролика — 150 мл, дистиллированная вода — 900 мл. В дистиллированную воду добавляют хлорид натрия и агар, смесь нагревают до полного расплавления агара и стерилизуют при 1,5 атм в течение 20—30 мин, охлаждают до 56 °С и асептически добавляют кровь, перемешивают, разливают в пробирки по 4 мл и охлаждают в наклонном положении.

После застывания агара пробирки помещают на одни сутки в термостат для проверки на стерильность и получения конденсационной жидкости. При недостатке конденсата можно асептически добавить около 1 мл одного из растворов (ИХН, 1%-й пептон, раствор Хенкса, гидролизат лактальбумина). Хранят среду в холодильнике. Материал засевают в конденсационную жидкость.

Перед посевом 8—10 мл крови разводят в 5—6 раз ИХН с цитратом натрия (1 мл 4%-го цитрата натрия на 10 мл крови) и центрифугируют 5 мин при 1000 об/мин. Стерильной пипеткой отсасывают жидкую часть и поверхностный белесоватый слой осадка (в нем содержатся лейкоциты и паразиты) и центрифугируют еще 10 мин при 1500—2000 об/мин. Для исследования используют осадок и нижний слой надосадочной жидкости. Пунктаты перед посевом разводят в 1—2 мл ИХН. Лептомонадные формы лейшмании можно обнаружить на 2—10-й день после посева.

Среда Роджерса представляет собой ИХН с добавлением 8 % цитрата натрия. Среду разливают в маленькие пробирки по 1 мл и стерилизуют. В каждую пробирку засевают по 0,5—1,0 мл исследуемой крови. Лептомонадные формы лейшмании появляются на 3—4-й день инкубации при 22—25 °С.

Среда Рашке—Райхенова используется для культивирования *Trypanosoma gambiense*. В центрифужные пробирки наливают по 1 мл раствора Рингера, стерилизуют и добавляют в них по 1 мл цитратной крови человека (1 часть крови + 1 часть 3%-го цитрата натрия в ИХН). После проверки на стерильность в каждую пробирку засевают по 1 капле исследуемой крови. Для подавления роста микроорганизмов в среду добавляют по 500 ЕД пенициллина и 500 ЕД стрептомицина на 1 мл среды. Культивируют при 24—26 °С. Трипаносомы можно обнаружить на 3—4-й день после посева. Добавление к этой среде 0,4 % глюкозы делает ее пригодной для культивирования *Trypanosoma cruzi*.

Среда Веймана — плотный кровяной агар с цитратной плазмой крови человека. К 1000 мл дистиллированной воды добавляют 31 г сухого МПА (или агара Дифко), рН 7,3, размешивают, стерилизуют и остужают. В 150 мл среды вносят по 25 мл эритроцитов и цитратной плазмы крови, инактивированной в течение 30 мин при 56 °С, перемешивают, разливают по флаконам или скашивают в пробирках. Среда используется для культивирования *Trypanosoma rhodesiense* и *T. gambiense*, заметные колонии которых появляются на поверхности агара на 5—10-й день.

Среда LIT для культивирования *Trypanosoma cruzi* имеет следующий состав (г/л): печеночного экстракта, хлоридов натрия и калия — по 4,0, фосфата натрия — 8,0, триптозы (триптона) — 5,0, глюкозы — 2,0 г, бычьей крови — 200 мл. Среду инактивируют в течение 1 ч при 62 °С. После охлаждения добавляют 20 мл гемоглобина (10 мл осажденных эритроцитов быка + 90 мл дистиллированной воды), доводят рН среды до 7,2 и стерилизуют фильтрацией через фильтр Зейца под давлением. Готовую среду разливают в пробирки или колбы Эрленмейера по 10 мл, куда засевают по одной капле исследуемого материала и инкубируют при 26—28 °С, оберегая посевы от высыхания.

Дизентерийные амёбы, балантидии, кишечные трихомонады, хиломастиксы легче выявить микроскопическими методами, чем при культивировании, однако при необходимости можно использовать и посев на питательные среды.

Среда Павловой (г/л): натрия хлорид — 8,5, натрия фосфат — 0,6, калия гидрофосфат — 0,46. Соли растворяют в дистиллированной воде, стерилизуют, разливают в пробирки по 9,5 мл, охлаждают и в каждую пробирку вносят по 0,5 мл лошадиной сыворотки.

Среда с печеночным экстрактом: ИХН — 1000 мл, МПБ — 20 мл, печеночный экстракт — 20 мл, глюкоза — 2,5 г, натрия фосфат и калия гидрофосфат — по 0,45 г. Смесь стерилизуют, охлаждают и добавляют нативную сыворотку крови крупного рогатого скота (1 часть на 7—9 частей смеси). Полученную среду разливают в стерильные пробирки по 8—10 мл. На этой среде обильно растут дизентерийные амёбы.

Среда Рейса: МПБ (1 часть) смешивают с ИХН (4 части), стерилизуют, обогащают стерильной лошадиной или бычьей сывороткой (1 часть сыворотки на 10—15 частей среды) и разливают в пробирки по 8—10 мл. На этой среде хорошо растут балантидии, дизентерийные амёбы, кишечные трихомонады.

Для успешного культивирования простейших, обитающих в пищевом канале, в пробирки со средой вносят исследуемый материал (оформленного кала — комочек диаметром около 0,5 см, жидкого — несколько капель), причем одновременно делают посев в 5—6 пробирок. Перед посевом пробирку со средой подогревают до 37 °С и в каждую добавляют по 1—2 петли стерильного рисового крахмала для торможения роста грибов.

Крахмал (по 5—10 г) стерилизуют сухим жаром при 90 °С в течение 1 ч 4 дня подряд в пробирках, закрытых ватными тампонами. Нельзя допускать пригорания крахмала, так как при этом он буреет и становится непригодным.

Учитывают результаты первичных посевов и пересевают материал каждые 24, 48, 72 и даже 120 ч. Осадок со дна пробирки с посевом набирают пастеровской пипеткой и вносят 3—5 капель его в новую пробирку. Одновременно каплю осадка помещают на предметное стекло, накрывают покровным и микроскопируют.

7.3. Серологическое, аллергологическое и биологическое исследования

Серологическое исследование. При протозоозах серодиагностика имеет вспомогательное значение, но позволяет изучать динамику инфекционного процесса.

Серологические реакции с антигенными диагностикумами позволяют выявить наличие в организме больных АТ, а с антителными диагностикумами — АГ. Для диагностики протозоозов используют следующие серологические реакции; РА (американский трипаносомоз), РП (американский трипаносомоз, амёбиаз), РСК (американский трипаносомоз, токсоплазмоз, висцеральный лейшманиоз, амёбиаз), РИФ (американский трипаносомоз, малярия, токсоплазмоз, висцеральный лейшманиоз, амёбиаз), РНГА (токсоплазмоз), ИФА (токсоплазмоз, тропическая малярия, амёбиаз, кожный и висцеральный лейшманиозы, американский трипаносомоз).

Методика серологических реакций при протозоозах не отличается от таковой при других инфекционных болезнях.

С помощью серологического исследования можно уточнить распространённость того или иного протозооза в данной местности, проверить достоверность ликвидации его или эффективность проводимых мероприятий, изучить роль миграции населения в переносе возбудителей. Особо важную роль играет серологическое ис-

следование при выявлении инфицированных доноров с целью предупреждения посттрансфузионной малярии, американского трипаносомоза и пр.

Аллергологическое исследование. Аллергические пробы для диагностики протозоозов применяются ограниченно — лишь для подтверждения диагноза кожного лейшманиоза (кожная проба с лейшманином, реакция Монтенегро) и токсоплазмоза (проба с токсоплазмином). Технически эти пробы выполняются подобно пробам с другими микробными аллергенами.

Биологическое исследование. Заражение экспериментальных животных применяется для подтверждения диагноза ряда протозоозов, а также для научных целей, в частности для изучения патогенности простейших, определения вирулентности различных штаммов, патогенеза и патологической анатомии протозоозов, эффективности лекарственных средств и пр.

Для заражения дизентерийными амебами и балантидиями используют 2—3-недельных крысят, морских свинок, котят, щенков, золотистых хомячков, для заражения лямблиями — мышей. При лейшманиозах заражают белых мышей и хомячков, при американском трипаносомозе — морских свинок, при африканском трипаносомозе — мартышек, при токсоплазмозе — белых мышей.

При заражении животных исследуемый материал вводят парентерально, в слепую кишку при лапаротомии, проведенной под наркозом, или через длинный пластмассовый зонд. Наиболее простой метод заражения — скармливание животным исследуемого материала.

На протяжении 1 мес после заражения микроскопируют кровь животных либо умерщвляют животных, готовят мазки-отпечатки из их органов, исследуют гистологические препараты из пораженных тканей и пр.

ГЛАВА 8 МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ОТДЕЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ

8.1. Малярия

Заболевания у человека вызывают четыре вида малярийных плазмодиев, относимых к микроорганизмам 3-й группы патогенности: *Plasmodium falciparum* (тропическая малярия), *Plasmodium vivax* (трехдневная малярия), *Plasmodium malariae* (четырёхдневная малярия) и *Plasmodium ovale* (трехдневная, овале-малярия). Возбудители малярии имеют сложный цикл развития со сменой хозяев.

Половой цикл развития, или спорогония, происходит в теле самки комара рода *Anopheles*, бесполой цикл (шизогония) — в организме человека, причем вначале паразиты размножаются в клетках печени (тканевая шизогония), а затем поражают эритроциты (эритроцитарная шизогония). Протозоологическая диагностика возможна на стадии эритроцитарной шизогонии.

Микроскопия. Кровь на наличие плазмодиев малярии исследуют как во время лихорадки, так и при нормальной температуре тела. Микроскопируют мазок и толстую каплю крови, окрашенные методом Романовского — Гимзы. Для исследования крови каждого больного готовят 4—8 препаратов. При микроскопии мазка крови обнаруживают находящиеся в эритроцитах плазмодии. Цитоплазма паразитов окрашена в голубой цвет разной интенсивности, ядро — в вишнево-красный. В цитоплазме плазмодиев на стадии собственно шизонта можно обнаружить пигмент (мелкие зернышки коричневого или темно-коричневого цвета). Интенсивность окраски обусловлена качеством красителя и реакцией воды, на которой приготовлен раствор, а также длительностью обработки.

В экстренных случаях микроскопируют свежую неокрашенную кровь. Препарат помещают на подогреваемый столик. В капле крови, заключенной между предметным и покровным стеклами, пораженные эритроциты имеют «просветления» за счет расположенных в них паразитов, которые производят амебовидные движения.

При исследовании крови больного нужно учитывать последовательные стадии развития бесполой (эритроцитарных) форм паразитов, которые характеризуются следующими особенностями: *мерозоит* — форма круглая или овальная, около ядра расположен небольшой комочек цитоплазмы; *кольцевидный трофозоит* — узкий ободок цитоплазмы окружает небольшую вакуоль, имеется одно ядро; *амебовидный трофозоит* — форма различна в зависимости от количества и величины псевдоподий, размеры по мере развития увеличиваются, имеется одно ядро; *шизонт* — содержит два ядра и более; *морула* — полное разделение ядра и цитоплазмы на мерозоиты.

Половые формы плазмодиев — *гаметоциты* (гамонты) не имеют вакуолей и псевдоподий, мужские (*микрогоматоциты*) и женские (*макрогаметоциты*) отличаются по величине и структуре ядра, интенсивности окраски цитоплазмы и размерам.

Морфология одного из возбудителей малярии в тонком мазке и толстой капле крови показана ([см. цв. вклейку рис. 30, 31](#)).

Морфология возбудителей малярии в тонком мазке. Морфологические особенности плазмодиев малярии представлены в табл. 8.1. Кольцевидные трофозоиты *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* (размеры 2—4 мкм) сходны между собой, занимают около $\frac{1}{3}$ диаметра

Таблица 8.1

**Дифференциальная диагностика малярийных плазмодиев в мазке крови, окрашенном по Романовскому—Гимзе
(по Ш. Д. Мошковскому, Н. Д. Деминой)**

Вид плазмодия	Шизогония, ч	Стадия развития	Кольцевидные трофозоиты	Полувзрослые трофозоиты	Зрелые шизонты	Гамонты	Пораженные эритроциты
<i>P. vivax</i>	48	Трофозоиты, шизонты, гамонты	Кольца неправильной формы, занимающие $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{4}$ диаметра эритроцита	Псевдоподии хорошо выражены. Паразиты в зависимости от возраста занимают менее, половину и более половины пораженного эритроцита. В начале развития пигмент расположен равномерно, по мере созревания образуются глыбки	12—18 мерозоитов расположены беспорядочно вокруг компактной глыбки пигмента	Женские гамонты крупные, округлой формы, ядро небольшое, цитоплазма интенсивно окрашена; мужские гамонты с большим ядром и бледной цитоплазмой, диаметр их превышает размеры нормального эритроцита	Увеличены, обесцвечены, выявляется зернистость Шюффнера
<i>P. malariae</i>	72	Трофозоиты, шизонты, гамонты	Такие же, как у <i>P. vivax</i>	Псевдоподии нерезко выражены, широкие. Часть паразитов принимает лентовидную форму: паразит вытянут поперек эритроцита в виде более или менее широкой ленты, вдоль одного	6—12, чаще 8 мерозоитов расположены правильной розеткой по периферии собранного в глыбку пигмента	Такие же как у <i>P. vivax</i> , но диаметр их не превышает размеры нормального эритроцита	Величина не изменяется, выявляется зернистость Циманна

Вид плазмодия	Шизогония, ч	Стадия развития	Кольцевидные трофозоиты	Полувзрослые трофозоиты	Зрелые шизонты	Гамонты	Пораженные эритроциты
<i>P. falciparum</i>	48	Кольцевидные трофозоиты, гамонты; полувзрослые трофозоиты и шизонты (при коме)	Мелкие, занимают $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{8}$ диаметра эритроцита, часто в одном эритроците обнаруживаются 2—3 паразита	Сходны с полувзрослыми трофозоитами <i>P. malariae</i> , но в отличие от них содержат темнокоричневый, почти черный пигмент, собранный в глыбку	12—24, обычно 16 мелких мерозоитов расположены беспорядочно вокруг собранного в глыбку пигмента	Полулунной формы: женские — длинные с синевато-серой цитоплазмой и компактным ядром; мужские — короткие с розовато-сиреновой цитоплазмой и менее компактным ядром	Величина не изменяется, выявляется зернистость Маурера
<i>P. ovale</i>	48	Трофозоиты, шизонты, гамонты	Такой же величины, как у <i>P. vivax</i> , но с более крупным ядром	Сходны с амeboвидными трофозоитами <i>P. malariae</i> , но имеют большую величину и более крупное ядро	6—12 крупных мерозоитов, расположенных беспорядочно вокруг пигмента, ядра более крупные, чем у мерозоитов других видов	Такие же, как у <i>P. vivax</i>	Заметно увеличены, овальной формы с фестончатыми краями, выявляется зернистость Джеймса

эритроцита. Ядра у кольцевидных трофозоитов *P. vivax* и *P. malariae* круглые, у *P. ovale* — крупнее, неправильной формы. Ободок цитоплазмы неширокий, суживается к ядру, контуры цитоплазмы ровные. Молодые кольцевидные трофозоиты *P. falciparum* (см. цв. вклейку, рис. 30, 2—4) мелкие (1,25—1,50 мкм), занимают примерно $\frac{1}{6}$ часть диаметра эритроцита, ядро маленькое круглое, вокруг него имеется очень тонкий нежный ободок цитоплазмы. Иногда рядом с ядром обнаруживают округлое образование, похожее на ядро, но меньшее по размеру (это центральная плотная часть ядра, выделившаяся из него в процессе приготовления мазка). Более взрослые кольцевидные трофозоиты крупнее — величиной до $\frac{1}{3}$ диаметра эритроцита, имеют толстый ободок цитоплазмы, резко суживающийся к ядру. В толстом участке цитоплазмы можно обнаружить мелкие единичные зерна пигмента. При неосложненной тропической малярии из форм бесполого цикла в периферической крови обнаруживают, как правило, только кольцевидные трофозоиты, причем в одном эритроците могут находиться 2—3 кольца.

Амебовидные трофозоиты *P. vivax* разнообразны по форме: имеется одна или несколько псевдоподий, а также одна или несколько вакуолей. Ядро круглое или овальное. В цитоплазме «разбросан» пигмент в виде темно-коричневых зерен различной величины и формы. В зависимости от возраста паразит занимает большую или меньшую часть эритроцита. Амебовидные трофозоиты *P. malariae* округлые и овальные, псевдоподии короткие и широкие, цитоплазма темнее, чем у *P. vivax*, пигмент более грубый. Ядро неправильной формы, часто угловатое. Нередко трофозоиты *P. malariae* имеют вид ленты, расположенной поперек эритроцита. Ядро лентовидных форм продолговатое, вытянутое вдоль края ленты. Амебовидные трофозоиты *P. falciparum* имеют круглую или овальную форму, лишены вакуоли, ядро круглое, неправильной формы, пигмент черного цвета, расположен компактно. Эта и последующие формы *P. falciparum*, как правило, в периферической крови не обнаруживаются, так как содержащие их эритроциты задерживаются в капиллярах внутренних органов и глубоких тканей. Молодые трофозоиты *P. ovale* нередко сохраняют форму кольца, более взрослые сходны с *P. malariae*.

Размеры шизонтов у возбудителей малярии возрастают в ряду: *P. vivax*, *P. ovale*, *P. falciparum*.

Морула *P. vivax* содержит 10—22 мерозоида (обычно 14—16), расположенных беспорядочно. Между ними лежит кучка пигмента. В моруле *P. malariae* 6—12 (чаще 8) крупных мерозоитов, которые расположены в виде розетки. Морула *P. falciparum* состоит из 8—24 очень мелких мерозоитов, занимая часть эритроцита. Число мерозоитов в моруле *P. ovale* — 4—24 (чаще 8), они крупные, имеют ядро неправильной формы.

Гаметоциты *P. vivax*, *P. malariae* и *P. ovale* имеют округлую или овальную форму, наиболее крупные гаметоциты — у *P. vivax*, наиболее мелкие — у *P. malariae*. Зерна пигмента крупнее, чем в шизонтах, они равномерно расположены в цитоплазме гаметоцитов. Женские гаметоциты имеют небольшое компактное ядро, которое расположено ближе к краю цитоплазмы и окрашено в темно-голубой цвет. Ядро мужских гаметоцитов крупное, рыхлое, расположено в центре, окрашивается в розовато-фиолетовый цвет. Гаметоциты трех перечисленных видов плазмодиев появляются и исчезают из периферической крови одновременно с трофозоидами. Гаметоциты *P. falciparum* имеют характерную полулунную форму, ядро расположено в средней части цитоплазмы. У женских форм оно небольшое и компактное, у мужских — крупное и рыхлое. Пигмент в виде коротких палочек окружает ядро. В тонких мазках гаметоциты расположены свободно между клетками крови. Срок развития гаметоцитов *P. falciparum* в эритроците в несколько раз превышает длительность шизогонии. Они появляются в периферической крови на 8—10-й день после обнаружения кольцевидных трофозоитов и продолжают поступать в кровь спустя несколько недель после их исчезновения на фоне отсутствия клинических проявлений болезни.

Эритроциты, пораженные *P. vivax*, увеличены в диаметре до 10—12 мкм, хуже окрашиваются по Романовскому—Гимзе, чем непораженные. Подобные изменения наблюдаются и при малярии, вызванной *P. ovale*. Размеры и окраска эритроцитов, содержащих *P. malariae* и *P. falciparum*, не изменяются. Нередко эритроциты, пораженные *P. ovale*, приобретают неправильную форму, причем у части эритроцитов одна из узких сторон имеет зубчатый (бахромчатый) край.

В эритроцитах, содержащих *P. vivax* на различных стадиях развития, выявляется множество мелких азурофильных зерен (зернистость Шюффнера). Более редкие и крупные зерна обнаруживаются при наличии в эритроцитах *P. ovale* (зернистость Джеймса). В эритроцитах с кольцевидными трофозоидами *P. falciparum* при продолжительной (свыше 1 ч) окраске мазков иногда заметно небольшое количество крупных азурофильных зерен (зернистость Маурера). В тех случаях, когда возбудителем является *P. malariae*, при длительном окрашивании щелочным раствором красителя (2 ч при pH 7,6—7,8) в эритроцитах выявляют мелкую зернистость Циманна.

Морфология возбудителей малярии в толстой капле. Кольцевидные трофозоиты *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* имеют примерно одинаковую величину, в толстой капле они нередко разрываются, деформируются, приобретая форму запятой, восклицательного знака, а цитоплазма сжимается около ядра в виде округлого или треугольного комочка. Кроме того, при этих формах малярии на-

ряду с кольцевидными трофозоитами нередко обнаруживают и другие формы паразитов, по которым можно определить вид возбудителя.

Подобные изменения происходят и с кольцевидными трофозоитами *P. falciparum*, но часть из них сохраняет свою форму и хорошо различима. Иногда цитоплазма разрывается и располагается с двух сторон от ядра («крылья ласточки»), нередко обнаруживаются раздвоенные ядра. При определении вида плазмодиев нужно учитывать, что на других стадиях развития возбудитель в периферической крови, как правило, не выявляется.

Амебовидные трофозоиты *P. vivax* в толстой капле деформируются, цитоплазма их сжимается и разрывается, располагаясь вблизи ядра, в виде двух или нескольких комочков, что характерно именно для этого вида.

Трофозоиты *P. malariae* в мазке представляют собой компактные овальной или округлой формы образования, содержащие большое количество пигмента.

На стадии моруляции различные виды плазмодиев дифференцируют по числу мерозоитов и форме морулы. У *P. malariae* и в толстой капле она сохраняет форму розетки. При малярии, вызванной *P. vivax*, пораженные эритроциты не всегда полностью разрушаются, сохраняется и зернистость Шюффнера. Шизонты и морулы *P. ovale* сходны с аналогичными формами *P. malariae*, но имеют более крупное ядро и содержат меньше пигмента; встречаются неразрушенные пораженные эритроциты. *P. ovale* отличается от *P. vivax* крупными неправильной формы ядрами, отсутствием крупных «разорванных» амебовидных трофозоитов, а также крупными мерозоитами и меньшим их числом в моруле.

Женские гаметоциты (гамонты) *P. vivax* и *P. malariae* в толстой капле не удается отличить от взрослых трофозоитов. Мужские гаметоциты отличаются крупным ядром, окруженным узким ободком бледно-голубой цитоплазмы с рассеянными по ней зернами пигмента. Гаметоциты *P. falciparum* имеют характерную полулунную форму, особенно если они расположены по периферии или в тонких участках капли.

При подозрении на хлорохинустойчивую малярию возникает необходимость учитывать количественное содержание паразитов в крови до начала и в процессе лечения. Для этого исследуют толстую каплю: подсчитывают общее число лейкоцитов и плазмодиев, расположенных в поле зрения, учитывают общее число возбудителей, приходящихся на 200 лейкоцитов, и делают перерасчет на 1 мл в зависимости от содержания лейкоцитов в указанном объеме крови путем составления пропорции. Исследование крови на лейкоцитоз и определение количественного содержания плазмодиев следует проводить синхронно, иначе результаты будут искаженными.

При исследовании толстой капли можно обнаружить паразиты при их концентрации не менее 10 000 особей в 1 мл крови.

Серологическое исследование. Серодиагностика малярии (РИА, ИФА) проводится редко, главным образом при осуществлении эпидемиологического надзора.

ПЦР. Разработаны методы генодиагностики малярии с помощью обычной и гнездной ПЦР, причем для выделения ДНК возбудителя могут использоваться препараты крови «толстая капля», ранее окрашенные по Романовскому—Гимзе. Кроме того, гнездный вариант ПЦР позволяет дифференцировать рецидив лекарственно-устойчивой малярии и реинфекцию. Высокая чувствительность ПЦР-анализа способствует более эффективному выявлению лиц, зараженных малярией, предупреждает гипо- и гипердиагностику инфекции.

8.2. Криптоспоридиоз

Криптоспоридиоз протекает преимущественно как диарейное холероподобное заболевание, тяжесть которого зависит от иммунокомпетентности организма хозяина. Наиболее частыми возбудителями инфекции являются простейшие класса споровиков — *Cryptosporidium parvum* и *Cryptosporidium muris* — микроорганизмы 3-й группы патогенности. При ВИЧ-инфекции и других иммунодефицитах криптоспоридии могут поражать также органы дыхания (пневмонии).

Материалом для исследования являются испражнения, биоптаты слизистой оболочки кишечника, желчных протоков, желчного пузыря, по показаниям — мокрота и биоптаты легочной ткани. Выраженность диареи, как правило, соответствует количеству ооцист возбудителя в испражнениях.

Основной метод диагностики — обнаружение ооцист при микроскопии исследуемого материала.

Микроскопия. Испражнения и мокроту для концентрирования возбудителя можно подвергнуть обработке методом флотации (см. выше). Наиболее распространенным методом исследования является приготовление тонкого мазка, окрашенного по Цилю—Нильсену. Ввиду кислотоустойчивости ооцисты криптоспоридий окрашиваются в красный цвет, подавляющее большинство других микроорганизмов — в голубой. Ооцисты представляют собой округлые образования диаметром около 5 мкм (см. [цв. вклейку, рис. 32](#)). Для того чтобы не допустить переобесцвечивания при окраске методом Циля—Нильсена, рекомендуется использовать 1—3%-ю серную кислоту и не применять кислотно-спиртовое обесцвечивание. Для окрашивания биоптатов используют обычные гистологические красители.

В ходе диагностики надо дифференцировать криптоспоридии с другими патогенными кокцидиями: *Cyclospora cayetanensis* и *Isospora belli*. Эти микроорганизмы имеют похожую морфологию и также обладают кислотоустойчивостью. В гистологических препаратах тканей кишечника криптоспоридии располагаются преимущественно на поверхности энтероцитов, а циклоспоридии и изоспоры — внутриклеточно.

Другие исследования. Весьма эффективными методами обнаружения ооцист возбудителя или его антигенов в материале является прямая РИФ и ИФА. Преимуществом этих методов является высокая специфичность, обусловленная взаимодействием диагностических антител с АГ возбудителя (специфичность ИФА достигает 100 %).

Серологические исследования при криптоспоридиозе не проводятся.

8.3. Токсоплазмоз

Возбудитель токсоплазмоза — *Toxoplasma gondii* — внутриклеточный паразит, поражающий практически все органы и ткани теплокровных животных, птиц и человека. В соответствии с отечественной классификацией его относят к микроорганизмам 4-й группы патогенности (условно-патогенные микроорганизмы).

В качестве материала для исследования используют пунктат лимфатических узлов, спинномозговую жидкость, кровь, гистологические срезы лимфатических узлов, миндалин, кусочки органов трупа, головной мозг, печень, селезенку, легкие, а в случаях патологической беременности — плаценту и околоплодную жидкость.

Микроскопия. Исследование мазков и гистологических препаратов требует внимания и опыта, так как количество токсоплазм в материале невелико и их можно спутать с другими образованиями. Токсоплазмы имеют полулунную или аркообразную форму длиной 4—7 мкм, шириной 2—4 мкм. Один конец возбудителя заострен, а другой — несколько закруглен. При окраске по Романовскому—Гимзе цитоплазма токсоплазм приобретает голубой цвет, а ядро, расположенное в центре паразита и занимающее около $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{4}$ его тела, — рубиново-красный (см. [цв. вклейку, рис. 33, а](#)).

Биологическое исследование. Для биопробы используют белых мышей, которых заражают центрифугатом спинномозговой жидкости, крови, пунктатом лимфатических узлов, трупным материалом и пр. Кровь (3—4 мл) центрифугируют на низких оборотах, отбирают плазму и повторно центрифугируют. Полученный после этого осадок клеток белой крови, как и взвесь из органов, вводят по 1,0 мл внутрибрюшинно белым мышам: Материал для биопро-

бы следует использовать немедленно, при необходимости его можно хранить при 2—4 °С (не более 24—48 ч).

У мышей развивается острая форма токсоплазмоза, паразиты обнаруживаются в перитонеальном экссудате, реже — в печени, селезенке, легких. Через 2—3 нед после заражения в головном мозге появляются цисты токсоплазм. Для их обнаружения кусочки мозга раздавливают между предметным и покровным стеклами и микроскопируют при малом увеличении. Можно готовить мазки и отпечатки мозга, фиксировать их и окрашивать по Романовскому—Гимзе.

Биологическое исследование применяется главным образом для научных целей, в частности для изучения вирулентности различных штаммов токсоплазм и др.

Серологическое исследование. Микроскопия и биологические пробы в диагностике токсоплазмоза редко дают положительные результаты. Более ценным является серологическое исследование, включающее реакцию с красителем Сэбина—Фельдмана (РСФ), непрямую РИФ, РСК, РНГА. Применяется также аллергическая проба с токсоплазмином.

Реакция с красителем Сэбина—Фельдмана (РСФ) становится положительной в конце первой недели болезни. Она относится к антиген-нейтрализующим реакциям и основана на том, что после воздействия специфических антител токсоплазмы утрачивают способность прижизненно воспринимать окраску.

Реакция считается положительной, если не окрашено более 50 % токсоплазм (учитываются только внеклеточно расположенные простейшие). Окрашенные токсоплазмы имеют округлую форму, неокрашенные — серповидную, цитоплазма их прозрачная (стекловидная), окрашено только ядро. Диагностический титр РСФ — 1 : 64 и выше. Недостатком РСФ является то, что для ее постановки необходим свежий штамм токсоплазм.

РИФ проводят со стандартным коммерческим антигеном из убитых токсоплазм. По специфичности эта реакция уступает РСФ, так как у больных с диффузными болезнями соединительной ткани она дает ложноположительные результаты. Диагностическое значение имеет РИФ в титре 1 : 16 и выше. Вариант этой реакции — РИФ-*IgM* (тест Ремингтона) — позволяет выявить антитела класса *IgM*, свидетельствующие об остром процессе. Этот тест используется для подтверждения диагноза врожденного токсоплазмоза.

С помощью непрямой РИФ выявляют антитела к токсоплазмам уже в конце 1-й нед болезни.

Для диагностики токсоплазмоза используют также РНГА.

РСК становится положительной с 3-й недели заболевания. Повторные исследования позволяют проследить нарастание титра комплементсвязывающих антител.

Для проведения ИФА используют растворимые антигены токсоплазм и антитела к иммуноглобулинам человека, меченные пероксидазой или фосфатазой.

Необходимо учитывать, что при токсоплазмозе антитела разных классов образуются несинхронно и с различной интенсивностью. Поэтому для достоверности диагностики следует ставить 2—3 различных теста с парными сыворотками. Положительный результат однократного исследования каким-либо методом указывает на то, что пациент инфицирован токсоплазмами. Отрицательные результаты серологического исследования свидетельствуют об отсутствии токсоплазмоза у обследуемого.

Аллергологическое исследование. Аллергическая проба с токсоплазмином выявляет наличие сенсибилизации организма в результате инфицирования токсоплазмами, но не позволяет судить об активности процесса. Положительную пробу рассматривают как показатель хорошей реактивности организма и достаточно выраженного иммунитета.

Аллерген для внутрикожной пробы — токсоплазмин — получают из перитонеального экссудата белых мышей, зараженных токсоплазмами.

Аллергическую пробу с токсоплазмином не ставят детям до двух лет и лицам старше 60 лет, так как из-за возрастных особенностей реактивности возможны ложноотрицательные реакции.

Результаты аллергической пробы следует учитывать только в сочетании с данными серологического исследования. Так, положительная проба с токсоплазмином при отрицательных результатах серологических реакций указывает на давно перенесенную инвазию, а положительная РИФ в низких титрах в сочетании с отрицательной РСК свидетельствует о затухании процесса. Для свежей инфицированности характерно наличие антител в РИФ при отрицательных РСК и аллергической пробе. Диагноз врожденного токсоплазмоза ставят при наличии типичных клинических проявлений и нарастания титра специфических антител у ребенка в сочетании с положительными результатами серологических реакций у матери.

8.4. Трипаносомоз

У людей встречаются две формы трипаносомоза — африканский (сонная болезнь) и американский (болезнь Шагаса).

Возбудителями сонной болезни являются микроорганизмы 3-й группы патогенности: *Trypanosoma brucei* вариант *gambiense* и более вирулентная *Trypanosoma brucei* вариант *rhodesiense*. Болезнь Шагаса вызывают простейшие вида *Trypanosoma cruzi*. Морфологически эти три вида трипаносом сходны между собой.

Материалом для исследования являются кровь, спинномозговая жидкость, пунктат лимфатических узлов, грудины, кусочки пораженных тканей.

Микроскопия. Микроскопируют нативный препарат, мазок и толстую каплю крови. При отрицательном результате применяют *метод обогащения* — смесь 10 мл крови с 1 мл 3,8%-го раствора цитрата натрия центрифугируют в течение 10 мин при 1000—1500 об/мин, надосадочную жидкость отсасывают в центрифужную пробирку, а из осадка готовят нативные и окрашенные. Затем повторно центрифугируют надосадочную жидкость в течение 20 мин и из осадка снова готовят препараты, которые фиксируют и окрашивают по методу Романовского — Гимзы. Аналогичным образом окрашивают мазки из осадка спинномозговой жидкости, пунктатов лимфатических узлов и грудины.

В препаратах видны расположенные внеклеточно трипаносомы (см. цв. вклейку, рис. 34) размером 17—30 × 1,4—2,0 мкм с красновато-фиолетовым ядром, расположенным в средней части тела возбудителя. На заднем конце трипаносомы находится блефаропласт, а позади него — палочковидный или круглый кинетопласт. От блефаропласта отходит жгутик, который направляется к наружной оболочке трипаносомы и, волнообразно изгибаясь, доходит до ее переднего конца. Здесь жгутик оканчивается, свободно выступая. Между телом трипаносомы и жгутиком находится прозрачная ундулирующая мембрана.

При острой стадии болезни Шагаса трипаносомы можно обнаружить в крови. При хронической форме заболевания число их невелико, поэтому микроскопическое исследование малоэффективно. В этих случаях иногда применяют *ксенодиагностику* (кормление на больных людях триатомовых клопов, в кишечнике которых происходит размножение трипаносом, выделяющихся с экскрементами клопов, где их и обнаруживают с 5-го дня после кормления).

Серологическое исследование. Серодиагностика разработана только при болезни Шагаса. С этой целью используют РП, антигеном для которой служит экстракт из трипаносом и РА с живыми трипаносомами, полученными из крови зараженных животных или в результате культивирования. Достаточно чувствительной для диагностики болезни Шагаса является РСК, при которой антигеном служит экстракт из сердечной мышцы зараженных животных. РП и РА применяют в остром периоде болезни, а РСК — на поздних стадиях. Реакцию оценивают по нарастанию титра комплементсвязывающих антител.

Для диагностики трипаносомозов разработаны также модификации РИФ и ИФА. Антигеном для ИФА служат лизаты трипаносом, полученных после заражения животных или культивирования на питательных средах.

Биологическое исследование. Для диагностики трипаносомозов может использоваться биологическая проба на морских свинках (*T. cruzi*), белых мышах или крысах (*rhodesiense*), мартышках (*gambiense*). Животным вводят 5—10 мл крови больного и начиная со 2-й нед в течение 1 мес исследуют кровь животных, а также органы и ткани на наличие трипаносом. Возбудитель болезни Шагаса (*T. cruzi*) в периферической крови имеет трипаносомную форму, в клетках он теряет ундулирующую мембрану и превращается в лейшманиальную форму с размерами от 1,5 до 4—5 мкм. В результате размножения трипаносом простым делением пораженные клетки погибают. Скопление свободно лежащих лейшманиальных форм *T. cruzi* можно обнаружить в различных органах, чаще в сердце.

Другие исследования. При диагностике африканского трипаносомоза, помимо этиологического диагноза, важно определить стадию болезни. Для этого исследуют спинномозговую жидкость. Для 1-й (ранней) стадии болезни характерно содержание белка не выше 250 мг/л, клеток — не более 3 в 1 мл. Более высокое содержание белка и клеток указывает на тяжелое поражение центральной нервной системы и свидетельствует о 2-й (поздней) стадии болезни.

8.5. Лейшманиоз

Лейшмании паразитируют у позвоночных животных и человека в лейшманиальной (внутриклеточной, амастиготной безжгутиковой) форме. Вторым хозяином и переносчиком лейшманий являются москиты, в организме которых паразиты встречаются в лептонадной (промастиготной, жгутиковой) форме. При культивировании на искусственных питательных средах лейшманий также образуют жгутиковые формы.

Возбудитель кожного лейшманиоза — *Leishmania tropica*, висцерального лейшманиоза — *Leishmania donovani*, микроорганизмы 3-й группы патогенности.

Микроскопия. Наиболее информативный метод диагностики висцерального лейшманиоза — микроскопия мазков костного мозга, пунктата лимфатических узлов и селезенки, окрашенных по Романовскому—Гимзе. Амастиготы локализуются в цитоплазме гистиофагоцитарных клеток (кожи, слизистой оболочки, внутренних органов и др.). В процессе приготовления мазков из-за повреждения этих клеток лейшмании освобождаются и располагаются внеклеточно или в обрывках цитоплазмы разрушенных клеток.

Амастиготы имеют овальную или круглую форму размером 3—5 × 1—3 мкм. При окраске по Романовскому—Гимзе цитоплазма амастиготы приобретает серо-голубой цвет, ядро, расположенное в центральной части, и кинетопласт, лежащий вблизи ядра, име-

ют красновато-фиолетовую окраску. Наличие ядра и кинетопласта позволяет отличить лейшмании от других образований, встречающихся в препарате.

В мазках, приготовленных из соскоба кожных элементов, хорошо различимы клетки инфильтрата: фагоциты, эндотелиоциты, плазмоциты, лимфоидные клетки, фибробласты и небольшое количество клеток периферической крови. Присутствие эпителиальных клеток и бесструктурных глыбок, равномерно окрашенных в сиреневый цвет, означает, что соскоб сделан слишком поверхностно и исследование нужно повторить. При правильно сделанном соскобе лейшмании (*L. tropica*) расположены в фагоцитах или вне клеток в виде овальных, округлых или удлинённых телец диаметром 3—5 мкм с серо-голубой цитоплазмой и красно-фиолетовым ядром. Вблизи ядра виден интенсивно окрашенный кинетопласт.

Культуральное исследование. При размножении лейшмании на среде *NNN* при 22 °С обильный рост наблюдается на 8—10-й день. Культуры хранят при комнатной температуре. Посевы микроскопируют ежедневно (с объективом 40×). Для обнаружения возбудителя готовят нативные препараты по методу раздавленной капли. В культуре клетки лейшманий приобретают удлинённую (10—12 мкм) конфигурацию со жгутом (промастиготы). Если в течение 40 дней возбудитель не обнаружен, результаты посева считают отрицательными, но это не позволяет полностью исключить лейшманиоз.

Биологическое исследование. Для диагностики лейшманиоза применяется и биопроба. Заражают животных (внутрисердечно, внутривисцерально, внутрибрюшинно, внутривенно) и определяют наличие возбудителя в селезенке, костном мозге, лимфатических узлах, печени.

Серологическое исследование. Серодиагностика (РИФ, РПГ, РСК) широко используется для проведения эпидемиологических исследований в эндемичных по висцеральному лейшманиозу местностях. Достаточно чувствительными и специфичными являются непрямая РИФ и технически менее сложная иммунопероксидазная проба (ИПП). В качестве антигена используют 15- или 30-дневные культуры промастигот *L. donovani*. При ИПП меткой для антисыворотки служит фермент пероксидаза, результаты реакции учитывают при микроскопии. Реакцию считают положительной, если тело лейшмании в мазке окрашивается тотально или по периферии в ярко-коричневый цвет.

Для диагностики висцерального лейшманиоза разработана тест-система для ИФА; при этом в качестве антигена используется экстракт из *L. donovani*. Иммуноферментный анализ является более чувствительным, специфичным и экономичным по сравнению с РИФ. Диагностический титр ИФА — 1 : 400 и выше.

8.6. Лямблиоз

Возбудитель лямблиоза — *Giardia lamblia* (*Lamblia intestinalis*) — относят к микроорганизмам 4-й группы патогенности. Он имеет грушевидное тело с билатеральной симметрией. Лямблии могут быть обнаружены в вегетативной форме или в виде цисты. Мазки готовят из дуоденального содержимого или жидких фекалий, выбирая комочки слизи, как правило содержащие много лямблий и лейкоцитов.

Микроскопия. Передний конец лямблий широкий, округленный; задний, или хвостовой, — вытянутый, заостренный. У переднего конца лямблий на вогнутой брюшной стороне расположен присасывательный диск («присоска») в виде светлого круглого участка. Узкий хвостовой конец обычно загнут на выпуклую дорсальную сторону. Размеры тела: длина 10—28 мкм, ширина 8—12 мкм. В нативном препарате лямблии обладают плавной подвижностью, которая обеспечивается четырьмя парами жгутиков и происходит в одной плоскости. Движения поступательные и вращательные вокруг продольной оси.

При окраске железным гематоксилином в мелкозернистой цитоплазме вегетативных форм лямблий хорошо видны два симмет-

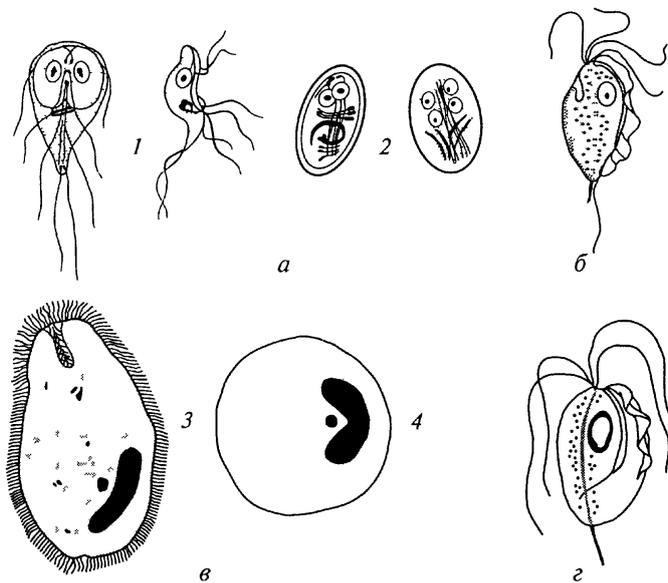


Рис. 8.1. Морфология патогенных простейших:

a — *Lamblia intestinalis* (*Giardia lamblia*) в дорсовентральной и боковой проекциях (1) и ее двух- и четырехъядерные цисты (2), *б* — *Trichomonas hominis*, *в* — *Balantidium coli* (3) и его циста (4), *г* — *Trichomonas vaginalis*

рично расположенных ядра (рис. 8.1, а). Внутри тела по средней линии проходят два аксостилия, которые начинаются от базальных зерен вблизи ядер и выходят наружу в виде хвостовых жгутиков на заднем конце тела. Вместе с ними от самостоятельных базальных зерен начинаются передняя, средняя и вентральная пары жгутиков. Примерно на границе между задней и средней частями тела лямблий располагаются медиальные или парабазальные тела (1—2), имеющие серповидную или треугольную форму.

Цисты лямблий, окрашенные раствором Люголя, имеют коричневатый или желтый цвет, правильную овальную форму, тонкую, гладкую, двуконтурную оболочку, цитоплазма нередко отстает от нее. Размеры цист: длина — 7,5—17,5 мкм, ширина — 5,0—12,5 мкм. В плотном оформленном стуле встречаются и более мелкие (5,0—12,5 × 3,7—8,6 мкм) цисты. Они окрашиваются иодом в голубой или серовато-голубой цвет и представляют собой мертвые и дегенерированные формы.

У переднего конца коричневатых и желтых цист расположены слабо контурированные ядра — 2 в незрелых и 4 в зрелых цистах. Внутри цитоплазмы видны тонкие нити аксонем и свернутые жгутики, а в задней половине — серповидные парабазальные тела.

Аналогично выглядят цисты в препаратах, окрашенных железным гематоксилином, но внутренняя структура их контурируется более четко, ядра имеют вид глазков с крупной центральной кариосомой, окруженной светлым неокрашенным пояском, который отделяет кариосому от ядерной мембраны.

Вегетативные формы обнаруживаются в дуоденальном содержимом или жидком кале, цисты — только в кале.

8.7. Трихомоноз

Патогенными для человека являются два вида трихомонад: *Trichomonas hominis* — возбудитель кишечного трихомоноза и *Trichomonas vaginalis* — возбудитель мочеполового трихомоноза (микроорганизмы 3-й группы патогенности).

Кишечная трихомонада существует только в вегетативной форме и может быть обнаружена лишь в жидких фекалиях. В нативных препаратах трихомонады имеют веретенообразную форму с передним закругленным и задним заостренным концом тела (рис. 8.1, б). Размеры трихомонад: длина 5—10, ширина около 5 мкм. Движения толчкообразные поступательные и вокруг продольной оси, осуществляются при помощи пучка из 3—5 жгутиков, отходящих от переднего конца тела, и ундулирующей мембраны. Последняя расположена продольно, окаймлена аксиальной нитью и заканчивается у заднего конца тела в виде свободного концевых жгутика. Движения мембраны и концевых жгутика периодические,

волнообразные (от переднего конца тела к заднему). В цитоплазме трихомонад содержатся бактерии, реже — эритроциты. Ядро трихомонад без окраски обнаружить не удастся. В окрашенных препаратах форма тела трихомонад такая же, как и в нативном мазке, но размеры их несколько меньше (до 8 мкм в длину). У переднего конца тела расположен слабо заметный цитостом и пузырьковидное ядро, впереди от него — группа блефаропластов, от которых отходят жгутики и аксиальная нить ундулирующей мембраны. Сбоку от ядра и вдоль всего тела трихомонады проходит трубковидный аксостиль, выступающий на заднем конце в виде длинного шиловидного выроста или хвоста. С противоположной стороны от ядра имеется парабазальное тело. Ундулирующая мембрана в виде светлой полосы прилегает к телу по всей его длине. Она, как и жгутики трихомонад, в процессе обработки материала прилипает к телу и поэтому в окрашенных препаратах мало заметна.

Микроскопия. *T. vaginalis* известна только в вегетативной форме, ее можно обнаружить в выделениях из влагалища, шейки матки, мочеиспускательного канала, секрете предстательной железы. Исследуются нативные или фиксированные и окрашенные препараты. Нативные мазки микроскопируют при увеличении в 400 раз с прикрытой диафрагмой. Перед окраской мазки фиксируют высушиванием на воздухе или путем обработки метиловым спиртом, смесью Никифорова, а также парами карболовой кислоты, формалина, осмиевой кислоты. Наиболее распространенные способы окраски — по Романовскому—Гимзе и по Граму. Последний метод используется для одновременного определения трихомонад и бактерий.

T. vaginalis имеют грушевидную или веретенovidную форму, длина тела 10—30 мкм, в слабокислой среде (рН 5,5—5,8) они мельче, чем в щелочной (см. цв. вклейку, рис. 35). У переднего широкого конца тела трихомонады расположено ядро, хроматин которого собран в мелкие, равномерно распределенные зерна. Впереди ядра от группы блефаропластов отходят 4 жгутика одинаковой длины, примерно равной длине тела трихомонады, как и ундулирующая мембрана, которая занимает переднюю половину длины тела и не имеет свободной концевой нити. На заднем конце выступает в виде шипика тонкий аксостиль. Со стороны, противоположной аксостилю, ядро огибает удлинённая парабазальная фибрилла. По всей цитоплазме трихомонад разбросаны многочисленные хроматоидные гранулы. Трихомонады цист не образуют.

При окраске 1%-м раствором метиленового синего трихомонады выглядят как округлые клетки с вытянутыми или треугольными ядрами. Размеры трихомонад примерно в 2 раза превышают размер лейкоцитов, присутствующих в мазке в большом количестве. Жгутики, аксостиль и ундулирующую мембрану при этой окраске обнаружить не удастся.

Культуральное исследование. Кишечные трихомонады можно выделить путем посева испражнений на среду Рейса. Для культивирования *T. vaginalis* используют питательные среды Павловой, Джонсона — Трассела и др.

Среда Джонсона — Трассела: пептона — 32 г, агар-агара — 1,6 г, цистеина солянокислого — 2,4 г, мальтозы — 16 г, печеночного экстракта — 320 мл, раствора Рингера — 960 мл, 1 М раствор NaOH — 13 мл. Смесь нагревают до расплавления агара, фильтруют, добавляют 0,7 мл 0,5 %-го раствора метиленового синего и доводят pH среды до 5,8—6,0. Среду разливают в пробирки по 9 мл и стерилизуют. Перед посевом в каждую пробирку добавляют по 1 мл сыворотки человека или лошади и антибиотики (пенициллин и стрептомицин) для подавления роста сопутствующей микрофлоры.

Среда на основе МПБ: к МПБ добавляют 1 % глюкозы и 5—10 % инактивированной сыворотки крови человека или лошади. После посева в пробирки вносят пенициллин и стрептомицин для подавления роста сопутствующей микрофлоры.

Применение метода культивирования трихомонад особенно показано при обследовании мужчин, а также для контроля эффективности проводимой терапии.

8.8. Амебиаз

Возбудитель амебиаза — *Entamoeba histolytica* (микроорганизмы 4-й группы патогенности). Цикл развития дизентерийной амебы включает две стадии: вегетативную и стадию покоя, или цисты. На вегетативной стадии развития амеба существует в четырех формах: 1) тканевой; 2) большой вегетативной (*magna*); 3) просветной — мелкой вегетативной (*minuta*) и 4) предцистной.

При остром амебиазе обнаруживают тканевую и большую вегетативную, а у реконвалесцентов и цистовыделителей — просветную и предцистную формы. В дистальном отделе кишечника просветные формы превращаются в цисты, приспособленные к выживанию в неблагоприятных условиях внешней среды.

Материалом для исследования служат испражнения, гной из пораженных органов, мокрота и др.

Микроскопия. Исследуют нативные препараты и мазки, окрашенные раствором Люголя, смесью Сафарлиева, а также препараты, обработанные железным гематоксилином по Гейденгайну или другими красителями.

В *нативном* препарате, приготовленном из кала с примесью крови и слизи, тканевую форму дизентерийной амебы обнаруживают среди одиночных эритроцитов, лейкоцитов, фагоцитов, бактерий и других клеток в виде крупных сильно преломляющих свет образований неправильной, изменчивой формы. Их размеры 18—

45 мкм, а при движении — до 60 мкм (см. цв. вклейку, рис. 36, а). Выражено разграничение цитоплазмы на внутреннюю зернистую темную и мутную часть — эндоплазму и покрывающий ее наружный светлый прозрачный слой неравномерной толщины — экзоплазму. В эндоплазме расположены пищеварительные вакуоли с фагоцитированными эритроцитами или без них. При 20—40 °С амебы активно подвижны: внезапно выбрасываются светлые прозрачные эктоплазматические псевдоподии, в которые вихреобразно переливается эндоплазма с содержащимися в ней включениями, затем псевдоподии сглаживаются и исчезают. При охлаждении препарата подвижность амеб ослабевает, они округляются и становятся неподвижными. Отсутствие ядра у живых неокрашенных дизентерийных амеб позволяет отличить их от амеб других видов. Помимо амеб, в мазках встречаются кристаллы Шарко—Лейдена, имеющие характерную ромбовидную форму.

В препаратах, окрашенных железным гематоксилином по Гейденгайну, тканевая форма дизентерийной амебы хорошо видна на фоне многочисленных эритроцитов, единичных лейкоцитов, бактерий и пр. Размеры этой формы от 12—15 до 22—45 мкм, тело вытянутое, часто округлое, обычно разграничено на светлую гомогенную эктоплазму и мелкозернистую темную эндоплазму, в которой видны темноокрашенные округлые включения — эритроциты. Величина их различна в зависимости от степени переваривания. В эндоплазме амеб имеется ядро размером 3—5 мкм с тонкой оболочкой, под которой находятся мелкие правильной формы зернышки периферического хроматина. В центре ядра — пятиугольная кариосома. В препарате могут также встречаться различные дегенеративные формы возбудителя. При этом наблюдается грубая вакуолизация цитоплазмы, пикноз ядра.

При использовании консерванта Сафарлиева цитоплазма дизентерийной амебы окрашивается в бледно-синий цвет, хроматин ядра — в интенсивно-синий, пищеварительные и гликогеновые вакуоли остаются бесцветными. Этот метод позволяет отличить дизентерийную амебу от кишечной (*Entamoeba coli*), у которой кариосома расположена эксцентрично, а глыбки периферического хроматина неодинаковы по величине.

Размеры *просветной формы* дизентерийной амебы 7—25 мкм. Разграничение тела амебы на эндо- и эктоплазму заметно лишь при образовании псевдоподий, которые формируются медленнее, чем у тканевых форм. В пищеварительных вакуолях содержатся бактерии, но эритроциты отсутствуют. Ядро амеб без окраски не выявляется. В значительном количестве просветные формы амеб обнаруживаются в начальной стадии кишечного амебиаза или в конце периода обострения, в небольшом количестве — у здоровых носителей. В препаратах, окрашенных железным гематоксилином, просветная форма дизентерийной амебы сохраняет те же

размеры, величина ядра — 2—5 мкм, зерна периферического хроматина нередко образуют серповидное скопление под ядерной оболочкой. Этот признак позволяет дифференцировать тканевую и просветную форму амёб в окрашенных препаратах.

Цисты дизентерийной амёбы при обработке раствором Люголя имеют правильную округлую, реже овальную, форму и гладкую оболочку желтого цвета со светло-коричневым оттенком. Размеры цист 10—15 мкм. В цитоплазме зрелых цист видны 4 ядра, незрелых — 1—2 ядра. Ядра имеют правильную круглую форму, тонкую оболочку и мелкую точечную или пятиугольную кариосому в центре. Цитоплазма незрелых цист содержит гликогеновые вакуоли светло-бурого цвета со смазанными контурами. В одном и том же препарате обнаруживают цисты различной степени зрелости. В одноядерных цистах ядра наиболее крупные, в 4-ядерных — самые мелкие. Цисты дизентерийной амёбы в препаратах, окрашенных железным гематоксилином, имеют те же размеры и общий вид, что и при обработке раствором Люголя.

Культуральное исследование. Если обнаружить амёбы при микроскопии не удастся, делают посев кала или других материалов на среды Павловой, с печеночным экстрактом и др.

Серологическое исследование. Для серодиагностики амёбиаза применяют РНГА (с антигеном из разрушенных ультразвуком *E. histolytica*), реакцию латексной агглютинации, РСК, РВИЭФ (как для обнаружения антител, так и для выявления специфического амёбного антигена), ИФА и др. Наиболее эффективно применение серологических реакций для диагностики внекишечных форм амёбиаза. При поражении печени исследуют ее пунктат, а также применяют рентгенологические и радиологические методы исследования.

8.9. Балантидиаз

Возбудитель балантидиаза — *Balantidium coli* — относят к микроорганизмам 4-й группы патогенности. Материалом для исследования служит кал.

Микроскопия. Подвижность балантидий изучают под малым увеличением в нативных препаратах раздавленной или висячей капли.

В препаратах, окрашенных железным гематоксилином, балантидии благодаря большому размеру (30—200 мкм в длину и 20—55 мкм в ширину) выделяются на фоне эритроцитов, лейкоцитов и других клеток. Тело балантидии имеет яйцевидную форму, передний конец уже заднего. При микроскопии под большим увеличением обнаруживают макронуклеус, цитостом, сократительную вакуоль в виде светлого неокрашенного пузырька, пищеварительные вакуоли, заполненные эритроцитами, лейкоцитами или бак-

териями на разных стадиях переваривания. По периферии тела балантидии обычно видны реснички с прилипшими к ним пищевыми частицами (рис. 8.1, в, 3).

Цисты V. coli размером 40—65 мкм в содержимом кишечника человека образуются редко. Они имеют круглую форму, двухконтурную оболочку и бобовидное ядро (рис. 8.1, в, 4). В препаратах, обработанных раствором Люголя, цисты коричнево-желтого цвета, при окраске гематоксилином в цистах виден макронуклеус, реже — микронуклеус, сократительная вакуоль (см. цв. вклейку, рис. 37).

Обнаружение балантидии в нативных мазках кала не представляет трудностей, но требует многократного исследования (пять и более раз), так как их выделение с фекалиями отличается непостоянством.

РАЗДЕЛ V

ГЕЛЬМИНТОЗЫ

ГЛАВА 9

МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

9.1. Макро- и микроскопические исследования

Для обнаружения гельминтов, их фрагментов, личинок и яиц исследуют кал, мочу, мокроту, ректальную и перианальную слизь, дуоденальное содержимое, кровь. Диагностика некоторых гельминтозов основана на исследовании биоптатов кожи, слизистой оболочки толстой кишки, мышц, подкожных узлов и пр.

Материал, предназначенный для исследования, помещают в чисто вымытую посуду, которую закрывают крышкой или пробкой, упаковывают в деревянный ящик или бокс и транспортируют в лабораторию. В направлении указывают фамилию и инициалы обследуемого, его возраст, местожительство, основные симптомы болезни (если имеются), длительность болезни, дату взятия материала. Кал собирают в специальные контейнеры из 4—5 разных мест выделенной порции. Его количество должно быть не менее 5 г, так как при высокой температуре воздуха он быстро подсыхает, что затрудняет проведение исследования. Кал следует отправлять в лабораторию в течение 1 сут после дефекации, а само исследование проводить в день поступления материала. Для выявления личинок угрицы кишечной (стронгилоидоз) исследуют свежевыделенный кал.

При необходимости длительного хранения кала используют следующие консерванты: раствор ТИФ (*TIF*) — тиомерсаль-иод-формалин или его аналог МИФ (*MIF*) — мертиолат-иод-формалин.

Раствор МИФ хранят в темной, герметично закрытой посуде и используют для консервации, окраски и концентрирования протейших.

Консервирующее действие (до 6 мес) оказывают также растворы синтетических детергентов (моющих средств) типа «Лотос» (1%), «Экстра» (1,5%) и др. Фекалии смешивают с раствором моющего средства в соотношении 1 : 5. Консервированный кал пригоден для исследования флотационным методом Фюллеборна в течение 1 мес, в нем хорошо сохраняются личинки возбудителей стронгилоидоза, трихостронгилоидоза, анкилостомидоза.

В качестве консервантов можно также применять 4%-й раствор формалина или жидкость Барбагалло (при соотношении кала и консерванта 1 : 1 или 1 : 2).

Для исследования гельминтов цельных паразитов или их фрагменты осторожно отмывают от фекалий. Круглых гельминтов помещают в сосуд с 70%-м этанолом, а плоских (или похожие на них образования) расправляют на предметном стекле, накрывают вторым предметным стеклом, слегка сжимают их и фиксируют препарат 12—24 ч в спирте той же концентрации. Затем гельминтов снимают со стекол и помещают в закрытую посуду. При транспортировке материала в лабораторию вместо спирта можно использовать жидкость Барбагалло. Фекалии, содержащие образования, похожие на яйца или личинки гельминтов, рекомендуется заливать двойным объемом консервирующей жидкости.

9.1.1. Кал

Наиболее распространенным в диагностике гельминтозов является исследование кала, так как большая часть гельминтов паразитирует в кишечнике человека или органах, с ними связанных.

Макроскопическое исследование. Исследование начинают с осмотра всей порции кала для обнаружения невооруженным глазом или с помощью лупы целых гельминтов или их фрагментов. Фекалии разводят водой до жидкой консистенции и небольшими порциями рассматривают в стеклянном кристаллизаторе или чашке Петри при хорошем освещении на темном фоне.

Чтобы лучше просмотреть кал, применяют метод отстаивания. В высоких стеклянных банках смешивают кал с большим количеством воды и отстаивают. Жидкость сливают, а осадок снова разбавляют водой. Так проделывают несколько раз, пока надосадочный слой не станет прозрачным. Осадок небольшими порциями исследуют в стеклянных кристаллизаторах с помощью лупы.

Все образования, подозрительные на фрагменты гельминтов, рассматривают между двумя предметными стеклами, под лупой в капле глицерина, а при необходимости и под микроскопом.

Дифференциация отдельных видов гельминтов основана на их анатомо-морфологических особенностях.

Определение вида нематод возможно по целым особям, реже — по крупным фрагментам, сохранившим характерные органы (например, головной конец). Цестоды идентифицируют по зрелым членикам, гермафродитным членикам и сколексам.

Макроскопическое исследование позволяет обнаружить острицы, членики или обрывки стробиллы свиного и бычьего цепней, широкого лентеца. Этот вид исследования широко используется для обнаружения мелких гельминтов после проведения дегельминтизации при анкилостомидозах, метагонимозе, дипилидиозе, нанофиетозе, аскаридозе и др.

Микроскопия. *Метод мазка.* Деревянной палочкой или спичкой из разных мест порции берут 30—50 мг фекалий (количество,

равное по объему примерно спичечной головке) и растирают на предметном стекле с несколькими каплями 50%-го раствора глицерина (до 5 капель в зависимости от консистенции кала), чтобы получить достаточно прозрачный и равномерный мазок площадью 9—10 см². Мазок накрывают двумя покровными стеклами. Глицерин хорошо просветляет препарат и предохраняет его от высыхания, но при его отсутствии мазки можно готовить с водой, ИХН, 1%-м раствором гидроксида натрия.

Препарат изучают под малым увеличением микроскопа (окуляр 7×, объектив 8×), слегка затемнив поле зрения. Для выявления деталей строения яиц гельминтов и дифференциации их со сходными элементами, а также в сомнительных случаях микроскопируют при большом увеличении (объектив 40×). Из одной порции кала готовят не менее двух препаратов. Метод микроскопии мазка служит дополнением к методу обогащения (см. ниже).

Метод толстого мазка под целлофаном (по Каго). Метод заключается в микроскопии слоя неразбавленных фекалий, спрессованного под листком тонкого гигроскопичного целлофана на предметном стекле. Полоски целлофана длиной 22 мм, шириной 30 мм и толщиной 40—50 мкм выдерживают не менее 24 ч в 5%-м растворе глицерина. На предметное стекло помещают 50—60 мг фекалий (около 0,4 мл), покрывают их целлофановой полоской и раздавливают пробкой для получения тонкого равномерного слоя. Мазок выдерживают в течение 1 ч при комнатной температуре, а в жаркое время года — 30—40 мин. В результате потери влаги и абсорбции глицерина слой фекалий просветляется, яйца гельминтов становятся четко видимыми и определяются при малом увеличении. Метод не пригоден для обнаружения мелких яиц трематод.

Метод закручивания по Шульману. Метод применяется, главным образом, для обнаружения в кале личинок возбудителя стронгилоидоза, но с его помощью можно выявить и яйца других гельминтов. Испражнения (2—3 г) помещают в небольшую баночку, заливают 5-кратным количеством воды или ИХН и тщательно размешивают круговыми движениями. Палочку быстро вынимают, образовавшуюся на ее конце каплю эмульсии переносят на предметное стекло, накрывают покровным и микроскопируют под малым увеличением. Всего просматривают восемь капель полученной эмульсии.

Методы обогащения. Для повышения эффективности исследования используются методы обогащения, позволяющие концентрировать и выделять яйца гельминтов из относительно большого количества испражнений (до 5,0 г и более). Они основаны на разности относительной плотности яиц гельминтов и применяемого солевого раствора: если относительная плотность яиц больше относительной плотности жидкости, они концентрируются в осадке (методы осаждения, или седиментации), в том случае, когда

относительная плотность яиц меньше относительной плотности жидкости, они всплывают (методы всплывания, или флотации).

Для исследования фекалий с помощью методов обогащения используют свыше 50 солевых растворов с относительной плотностью от 1,18 до 1,52. Чаще всего употребляют насыщенные растворы хлорида натрия (относительная плотность 1,2), нитрата натрия (относительная плотность 1,38) и нитрата аммония (относительная плотность 1,3).

Методы флотации. Применение методов флотации наиболее эффективно для обнаружения яиц анкилостомы, некатора, власоглава и карликового цепня.

Обычно для диагностики гельминтозов используется *метод Фюллеборна*. Для разведения фекалий применяется насыщенный раствор хлорида натрия (для его приготовления 380,0 г соли растворяют в 1 л воды, доводят до кипения, остужают и фильтруют). Кал (2,5 г) помещают в стаканчик с несколькими каплями солевого раствора, тщательно размешивают деревянной палочкой с постепенным добавлением жидкости до 50 мл. Смесь отстаивают 30—60 мин, а затем проволочной петлей (рис. 9.1) снимают образовавшуюся на поверхности пленку и переносят ее на предметное стекло. Наиболее удобной из существующих вариантов петель является спиралевидная. Исследуют не менее восьми капель, снятых петлей. Каждые две капли накрывают одним покровным стеклом; на одном предметном стекле, как правило, размещают четыре капли. Проволочную петлю после каждого анализа споласкивают водой или прокалывают над пламенем горелки. После анализа препаратов просматривают осадок. Для этого жидкость осторожно сливают, из осадка берут не менее четырех капель, которые исследуют под микроскопом.

Максимальное количество яиц анкилостом и некатора всплывает через 10 мин, карликового цепня — через 15—20 мин, аскариды — через 1—2 ч, власоглава — через 2—3 ч.

Метод Калантарян отличается от метода Фюллеборна тем, что вместо раствора хлорида натрия используют насыщенный раствор нитрата натрия (1 кг соли заливают 1 л воды, кипятят, охлаждают и фильтруют). Методика исследования такая же, как и по методу Фюллеборна, но благодаря большей относительной плотности раствора нитрата натрия всплывают яйца всех видов гельминтов, и осадок исследовать не нужно. Срок отстаивания 20—30 мин.

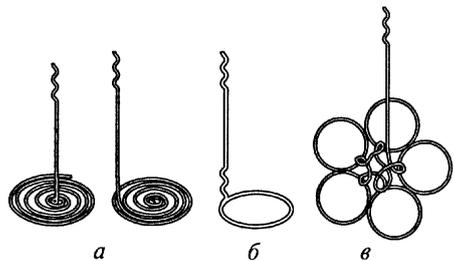


Рис. 9.1. Петли для снятия поверхностной пленки:

а — спиралевидная; б — простая; в — фигурная

Методы осаждения. *Метод Телемана.* Примерно 1,5 г кала перемешивают деревянной палочкой с 5 мл 50%-го раствора соляной кислоты в химическом стаканчике. Смесь переливают в пробирку, добавляют 5 мл эфира, закрывают пробкой и энергично встряхивают несколько раз. Затем фильтруют смесь через металлическую сетку (при необходимости) и центрифугируют в течение 1 мин при 1000—1500 об/мин. При этом образуется три слоя: верхний, содержащий эфир с растворенными жирами и продуктами их расщепления, средний — соляная кислота с растворенными солями и другими соединениями и нижний, в котором остались непереваренные частицы пищи и яйца гельминтов. Верхние два слоя сливают, добавляют воду и опять центрифугируют. После этого 2—4 капли осадка пипеткой переносят на предметное стекло, накрывают покровным и микроскопируют.

Этот метод позволяет обнаружить яйца любых гельминтов, встречающихся в кале человека, особенно яйца трематод, которые не всплывают при исследовании с применением методов флотации. Метод Телемана трудоемкий, соляная кислота деформирует яйца гельминтов, пары ее портят оптику микроскопа. Допускается замена соляной кислоты 10 %-м раствором гидроксида натрия, при этом можно исследовать осадок после первого центрифугирования.

Комбинированный метод Горкиной. Около 1,5 г фекалий помещают в стаканчик, добавляют 6—10 мл воды, перемешивают деревянной палочкой и фильтруют через металлическую сетку в пробирку. К фильтрату добавляют 1 мл концентрированной соляной кислоты и 1—2 мл эфира, пробирку закрывают пробкой и оставляют на 10—15 мин, периодически опрокидывая ее. Затем смесь разливают в две центрифужные пробирки и центрифугируют 1—2 мин при 1000—1500 об/мин. Надосадочную жидкость сливают, к осадку добавляют 6—10 мл смеси насыщенного раствора хлорида натрия пополам с чистым глицерином. Содержимое пробирок тщательно перемешивают палочкой и опять центрифугируют 2—3 мин. Проволочной петлей снимают верхний слой и помещают на два предметных стекла (из каждой пробирки по 4 капли), микроскопируют без покровных стекол.

Метод Горкиной позволяет выявить большее число яиц нематод и цестод, чем метод Телемана, но он непригоден для обнаружения яиц трематод. Кроме того, он сложен, поэтому применяется только в случаях индивидуального обследования больного, как правило, в условиях стационара.

Метод обогащения с детергентами (по А.А. Красильникову). Порцию кала (5—10 г) заливают водным раствором стирального порошка («Лотос», 1 %, «Экстра», 1,5 % или др.) в соотношении 1 : 5 (для этого лучше использовать герметично закрывающиеся флаконы объемом 50—100 мл), размешивают встряхиванием, отстаивают 30 мин, а затем центрифугируют в течение 5 мин при 1000—1500 об/мин. Из среднего слоя осадка готовят препараты на предметном стекле (не менее двух) и микроскопируют.

Пробы, простоявшие в лаборатории 1 сут и более, можно исследовать без предварительного центрифугирования. Используя детергенты других марок, следует подобрать нужную для исследования концентрацию. Для приготовления раствора берут такую навеску стирального по-

рошка, которая растворяется без образования осадка. Фекалии следует помещать в раствор детергента не позже чем через 1 ч после дефекации.

Этот метод пригоден для выявления яиц гельминтов всех видов.

Для диагностики и дифференциации гельминтозов важное значение имеет обнаружение и микроскопическое изучение яиц гельминтов (см. цв. вклейку, рис. 38—41).

Количественные методы. Их используют одновременно с качественными для обнаружения гельминтов, откладывающих яйца в кишечнике или желчевыводящих путях (аскарида, власоглав, анкилостома, некатор, трематоды).

Метод Столла. В стеклянную колбу с отметками 56 и 60 мл или мерный цилиндр наливают 0,1%-й раствор гидроксида натрия до метки 56 мл, затем добавляют фекалии до тех пор, пока уровень жидкости не достигнет метки 60 мл. В сосуд помещают стеклянные бусы, закрывают его резиновой пробкой и тщательно встряхивают. Сразу после этого набирают мерной пипеткой 0,075 мл смеси (содержит около 0,005 мл фекалий), помещают на предметное стекло, накрывают покровным и микроскопируют, подсчитывая все яйца в препарате. Чтобы определить число яиц, содержащиеся в 1,0 г фекалий, полученное число умножают на 200.

Большой мазок на стекле 6×9 см используют не только для качественного, но и для количественного исследования. Берут 0,2 г кала (специальной ложечкой объемом 0,2 мл) и растирают деревянной палочкой с 15—20 каплями 50 %-го раствора глицерина. Материал равномерно распределяют по всему предметному стеклу, помещенному для удобства на другое стекло несколько большего размера. Изучают препарат под микроскопом, причем мазок просматривают в проходящем свете, без покровных стекол, при увеличении в 24—48 раз (объектив 2—4×, окуляр 6—17×). Для удобства подсчета яиц на обратной стороне стекла алмазом наносят параллельные линии, промежутки между которыми чуть уже поля зрения микроскопа. Подсчитывают все яйца в препарате и полученное число умножают на 5 (количество в 1,0 г фекалий).

Этим методом можно подсчитывать только крупные яйца, он непригоден для подсчета мелких яиц описисторхисов или клонорхисов.

Метод осаждения Ритчи используется для определения количества яиц шистосом. В центрифужной пробирке объемом 15 мл смешивают 2 г кала с 10 мл ИХН, закрывают пробкой и встряхивают в течение 30 с. Пробку удаляют и центрифугируют смесь при 2000 об/мин в течение 2 мин. Надосадочную жидкость сливают, к осадку добавляют 10 мл 10%-го раствора формалина, перемешивают и отстаивают 5 мин. К смеси добавляют 3—4 мл эфира, пробирку закрывают пробкой, встряхивают, чтобы получить однородную смесь, удаляют пробку и опять центрифугируют в течение 2 мин. После центрифугирования образуется четыре слоя: 1) осадок, содержащий яйца шистосом; 2) слой формалина; 3) слой калового детрита; 4) слой эфира. Три верхних слоя удаляют, осадок собирают пастеровской пипеткой, готовят препарат и подсчитывают количество яиц в осадке. Для получения окончательного результата пересчитывают их количество на 1 г кала.

При оценке результатов количественного определения яиц гельминтов в кале необходимо учитывать его консистенцию: *F* (*formed* — оформленный), *SF* (*soft-formed* — полуоформленный), *M* (*mushy* — кашицеобразные), *MD* (*mushy-diarrhea* — жидкий). После подсчета яиц в одной или нескольких пробах отмечают с помощью условных обозначений (*F*, *SF*, *M* и *MD*) консистенцию исходного кала и делают перерасчет по отношению к оформленному (*F*). Для этого число яиц в 1,0 г фекалий при *SF*-кале умножают на 1,5, при *M*-кале — на 2, а при *MD*-кале — на 3.

При подсчете яиц в кале маленьких детей следует учитывать, что объем фекалий за сутки у детей до 2 лет составляет $\frac{1}{4}$, а у детей 3—4 лет — $\frac{1}{2}$ количества, выделяемого взрослым. Поэтому для оценки результатов исследования умножают полученное число яиц на 0,25 или 0,5 соответственно.

Измерение яиц гельминтов. При идентификации яиц гельминтов в некоторых случаях нужно учитывать их размеры. Так, только по размерам можно отличить яйца фасциолы, гигантской фасциолы, анкилостомы, некатора, трихостронгилид и пр. (рис. 9.2). Величину яиц гельминтов определяют под микроскопом с помощью объективного и окулярного микрометров.

Объективный микрометр представляет собой специальное предметное стекло с размещенной на нем линейкой длиной в 1 мм, имеющей 100 делений, каждое из которых соответствует 10 мкм или 0,01 мм. Окулярный микрометр — это круглое стекло, которое помещают в окуляр микроскопа. На него также нанесена линейка длиной 0,5 или 1 см, разделенная соответственно на 50 или 100 делений. Величина одного деления этой линейки зависит от системы микроскопа, увеличения окуляра, бинокулярной насадки и пр. Поэтому при измерении объектов для каждого микроскопа и для различных увеличений, с которыми приходится работать, нужно определить значение одного деления окулярной линейки в микрометрах (мкм).

Перед измерением объективный микрометр кладут на столик микроскопа, ставят нужный объектив и окуляр с окулярной линейкой и наводят на резкость, чтобы деления линейки объективного микрометра были четко видны. Далее совмещают в горизонтальном положении обе линейки и высчитывают величину одного деления линейки окулярного микрометра. Например, 50 делений окулярного микрометра линейки соответствуют 30 делениям линейки объективного микрометра, одно деление которой равно 10 мкм. Значит, 50 делений линейки окулярного микрометра равны 300 мкм, а одно ее деление — 6 мкм (300 мкм : 50).

Измерив объект с помощью линейки окулярного микрометра, умножают число делений на значение этой величины в микрометрах при данном увеличении. Яйца гельминтов измеряют при большом увеличении микроскопа (объектив 40×). Перед исследо-

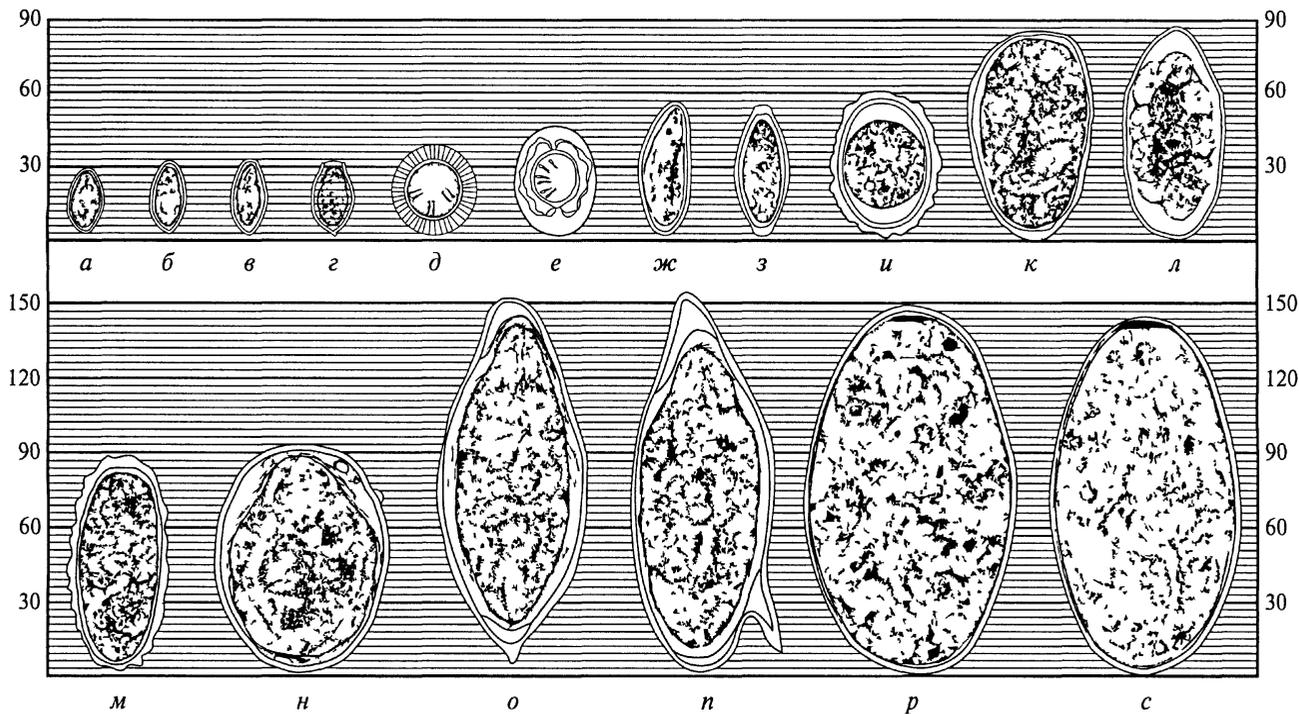


Рис 9 2 Сравнительные размеры яиц гельминтов (мкм)

а — *Metagonimus yokogawai*, б — *Heterophyes heterophyes*, в — *Opisthorchis felineus*, г — *Clonorchis sinensis*, д — *Taenia solium*, е — *Hymenolepis nana*, ж — *Enterobius vermicularis*, з — *Trichuris trichiura*, и — *Ascaris lumbricoides* (оплодотворенное), к — *Paragonimus westermani*, л — *Trichostrongylus colubriformis*, м — *Ascaris lumbricoides* (неоплодотворенное), н — *Schistosoma japonicum*, о — *Schistosoma haematobium*, п — *Schistosoma mansoni*, р — *Fasciola hepatica*, с — *Fasciolopsis buski*

ванием рекомендуется рассчитать, чему соответствует 1, 2, 3-е и последующие деления линейки окулярного микрометра в микроскопе с определенными окулярами и объективами и представить эти данные в виде таблицы.

Дополнительные методы исследования. *Метод Бермана для обнаружения личинок гельминтов.* Фекалии (5—10 г) помещают на мелкоячеистую металлическую сетку в стеклянную воронку, закрепленную на штативе. На узкий конец воронки надевают резиновую трубку с зажимом. Воронку наполняют водой, нагретой до 50 °С так, чтобы нижняя часть сетки была в нее погружена. Личинки из фекалий переходят в воду и скапливаются в нижнем конце трубки. Через 2—4 ч зажим открывают, собирают жидкость в 1—2 центрифужные пробирки, центрифугируют 2—3 мин при 1000—1500 об/мин и микроскопируют осадок под малым увеличением микроскопа.

Метод культивирования личинок Харада и Мори (рекомендован ВОЗ для диагностики анкилостомидоза и стронгилоидоза). На полоску фильтровальной бумаги (15×1,5 мм) наносят свежие фекалии, оставляя оба конца чистыми. Затем полоску помещают в пробирку, на дно которой налита вода высотой примерно на 1/5 часть пробирки. Один конец полоски погружают в воду, а другой закрепляют пробкой. Пробирку выдерживают 5—6 сут при 28 °С. Личинки собираются на дне пробирки, их обнаруживают с помощью лупы или даже невооруженным глазом. Детальное исследование проводят под микроскопом, предварительно убив личинки нагреванием жидкости в пробирке до 60 °С.

Соскоб с перианальных складок. Его исследуют для выявления энтеробиоза и тениаринхоза. Делают его утром до дефекации, а у женщин и до мочеиспускания. Соскабливание производят осторожно с поверхности складок в окружности ануса и в нижних отделах прямой кишки деревянным шпателем или плоской остроганной спичкой, смоченной в 50%-м растворе глицерина или в 1%-м растворе бикарбоната натрия. Полученный материал снимают со шпателя краем покровного стекла, помещают на предметное стекло в каплю того же раствора, которым смочен шпатель, и микроскопируют, просматривая весь препарат. Шпатель сжигают.

Целлофановый метод Холла. Квадратный кусочек целлофана укрепляют на стеклянной палочке при помощи резинового кольца. Сухим целлофановым тампоном делают соскоб, после чего его помещают в сухую пробирку и отправляют в лабораторию. В лаборатории целлофан слегка сдвигают с палочки и конец его срезают ножницами или бритвой. Срезанный кусочек целлофана расправляют на предметном стекле, смочив 0,1 М раствором едкого натра, накрывают покровным стеклом и микроскопируют.

Метод Грэхема. Полоску липкой целлюлозной ленты длиной около 4 см приклеивают к коже в области заднего прохода, снимают пинцетом, переносят на предметное стекло клеевой стороной вниз и микроскопируют без покровного стекла. Этот наименее трудоемкий и достаточно эффективный метод получил широкое распространение во многих странах.

9.1.2. Дуоденальное содержимое и желчь

В желчи или дуоденальном содержимом могут быть обнаружены яйца гельминтов, паразитирующих в печени, желчном пузыре, поджелудочной железе и двенадцатиперстной кишке. Дуоденальное содержимое и желчь исследуют при подозрении на стронгилоидоз, фасциолез, описторхоз, дикроцелиоз, клонорхоз.

Дуоденальное содержимое и желчь (порции А, В, С) получают при помощи тонкого зонда с оливой в ходе зондирования. Каждую порцию отдельно выливают в чашки Петри, шпателем или препаровальной иглой извлекают слизистые или другие комочки и из них готовят препараты для микроскопирования. Оставшуюся жидкость из каждой чашки отдельно сливают в центрифужные пробирки, добавляют равное количество эфира, взбалтывают и центрифугируют, надосадочную жидкость сливают, а весь осадок исследуют под микроскопом. При отсутствии гноя и слизи эфир не добавляют.

Учитывать следует все яйца гельминтов, обнаруженные в осадке и в хлопьях.

9.1.3. Моча и выделения из влагалища

Собранную мочу (желательно суточное количество) отстаивают 1—2 ч в высоких банках. При высокой температуре воздуха к ней следует добавить консервант (формальдегид или мертиолат). После отстаивания верхнюю часть сливают, нижний слой центрифугируют и осадок исследуют под микроскопом. Если осадок состоит из нескольких слоев, то исследуют каждый слой отдельно. В тех случаях, когда моча содержит кровь и кровяные сгустки, к ней добавляют холодную дистиллированную воду для полного гемолиза эритроцитов.

Отделяемое из влагалища, отобранное тампоном или другими приспособлениями, помещают на предметные стекла и готовят препараты для микроскопии.

Обогащение исследуемого материала. Для концентрирования возбудителей в моче используют *методы осаждения* или *центрифугирования*. Не менее 50 мл мочи, собранной в середине дня, помещают в конический стакан и дают отстояться в течение 30 мин. Верхнюю часть сливают, каплю из осадка мочи помещают на предметное стекло, готовят мазок и микроскопируют под малым увеличением. Добавление к осадку мочи 1—2 капель глицерина осветляет осадок и облегчает исследование.

При низкой интенсивности инвазии более эффективен метод центрифугирования. В две центрифужные пробирки наливают по 10 мл свежевыделенной мочи и центрифугируют при 1000 об/мин в течение 5—10 мин. Из осадка готовят мазки и исследуют при

малом увеличении микроскопа (окуляр 10×, объектив 8×). Добавление к препарату раствора Люголя или 1—2%-го водного раствора метиленового синего создает цветной фон и облегчает обнаружение яиц шистосом.

Для подсчета яиц шистосом порцию мочи энергично взбалтывают и 10 мл ее переносят в градуированную центрифужную пробирку. Центрифугируют в течение 2 мин при 1000—1500 об/мин, удаляют надосадочную жидкость с таким расчетом, чтобы в пробирке остался осадок на отметке 0,2 мл. Осадок взбалтывают и 60 мм³ его переносят пипеткой на предметное стекло, накрывают покровным и подсчитывают все яйца шистосом в препарате. Полученный результат соответствует количеству яиц, содержащихся в 3 мл исходного объема мочи.

При исследовании мочи применяются также методы фильтрации. Наиболее распространенным является *метод Белла*.

10 мл мочи фильтруют через бумажный фильтр, причем применение вакуумного насоса ускоряет фильтрацию. На фильтр наносят несколько капель нингидрина для окраски яиц в препарате, высушивают при 50 °С и под малым увеличением микроскопа подсчитывают общее число яиц. Результаты исследования выражают в количестве яиц на 1 мл мочи.

Мочу исследуют при подозрении на мочеполовой шистосомоз (бильгарциоз), возможно обнаружение в ней микрофилярий (на поздних стадиях вухерериоза, бругиоза, онхоцеркоза при наличии хилурии), а также яиц парагонимусов при локализации паразитов в почке, мочеточниках, мочевом пузыре. При микроскопии мазка из влагалищных выделений можно выявить яйца остриц, аскарид, а иногда и членики бычьего цепня.

9.1.4. Мокрота

Доставленную в лабораторию порцию мокроты просматривают визуально или с лупой, выбирают комочки слизи, обрывки тканей и другие примеси, помещают на предметное стекло, накрывают покровным и микроскопируют. Из остальной порции мокроты готовят мазки, которые также просматривают под микроскопом.

Чтобы облегчить обнаружение яиц и личинок в гнойной мокроте, ее смешивают с равным количеством 0,5%-го раствора гидроксида натрия или калия, слегка нагревают на водяной бане и центрифугируют. Из осадка готовят мазок и изучают его под микроскопом.

Чтобы выявить яйца шистосом (*Schistosoma mansoni*), суточное количество мокроты обрабатывают 5%-м раствором гидроксида натрия. Смесь отстаивают в течение 24 ч, центрифугируют при 1000—1500 об/мин в течение 5 мин, из осадка готовят мазки для

микроскопии. Для выявления личинок нематод, мигрирующих в легкие, мокроту обрабатывают по методу Бермана.

В мокроте могут находиться также яйца парагонимуса, томинкса, личинки мигрирующих нематод, обрывки эхинококкового пузыря, сколексы, отдельные крючья.

9.1.5. Соскоб из ногтевого ложа и смыв с рук

Край ногтевой пластинки и ногтевое ложе обрабатывают 0,5—1%-м раствором гидроксида натрия и протирают ватным тампоном, смоченным тем же раствором. Тампон помещают в центрифужную пробирку с раствором гидроксида натрия, взбалтывают, центрифугируют 3—6 мин при 1500 об/мин и из осадка готовят мазок для микроскопии.

Руки обрабатывают 1%-м раствором гидроксида натрия и вытирают ватным тампоном. Смывные воды помещают в высокий узкий цилиндр и отстаивают 1—3 ч, осадок центрифугируют и исследуют под микроскопом. Для фильтрации смывных вод можно использовать аппарат Гольдмана, в этом случае исследуют мембранные фильтры. Для исследования кожи рук применяют также липкую целлюлозную ленту.

В соскобе с ногтевого ложа чаще всего обнаруживают яйца остриц, но возможно выявление яиц и других гельминтов.

9.1.6. Кровь

Кровь исследуют для обнаружения микрофилярий. Берут ее из пальца или мочки уха (несколько капель или 2—6 мл) и помещают в центрифужную пробирку с антикоагулянтом (5%-й раствор цитрата натрия). Кровь в пробирке центрифугируют, сыворотку сливают, эритроциты гемолизируют 20%-м раствором этанола или замораживанием, готовят препараты, окрашивают и микроскопируют их.

Для получения нативного препарата крови на предметное стекло наносят вазелиновый квадрат размером с покровное стекло. В центр квадрата помещают небольшую каплю крови и слегка прижимают покровным стеклом, чтобы она растекалась тонким слоем в пределах квадрата. Нативный препарат крови исследуют под малым увеличением микроскопа, при этом видны микрофилярии, активнодвигающиеся между эритроцитами.

Для определения вида филярий используют окрашенные препараты — мазок и толстую каплю (содержит в 25 раз больше крови, чем мазок). Приготовленные препараты высушивают, гемолизируют эритроциты и окрашивают их по Романовскому—Гимзе или иным способом. Вначале препарат исследуют под малым увеличением микроскопа. Если в нем обнаружены микрофилярии,

толстую каплю дополнительно окрашивают гематоксилином Хансена в течение 15—60 мин и промывают 2 мин в проточной воде. После этого препарат помещают в 0,2%-й раствор соляной кислоты. Если окраска произведена правильно, чехлик микрофилярии окрашивается в бледно-фиолетовый цвет, а ядерные субстанции — в темно-фиолетовый.

При инвазиях слабой степени исследуют 2 мл венозной крови, которую помещают в центрифужную пробирку с 10 мл 1%-го раствора уксусной кислоты и перемешивают, а затем центрифугируют в течение 2 мин при 1500 об/мин. Надосадочную жидкость сливают, а из осадка готовят на предметных стеклах несколько препаратов, окрашивают их по Романовскому—Гимзе и изучают под микроскопом.

Метод фильтрации Белла. Фильтрация производится в аппарате, имеющем воронку из нержавеющей стали с прямоугольным отверстием, размеры которого меньше фильтра. В центрифужной пробирке смешивают 1 мл крови, 10 мл ИХН и 1 мл детергента типа *(teepol)*. Пробирку закрывают пробкой и несколько раз переворачивают, пока не наступит полный гемолиз, а затем фильтруют в аппарате. Пробирку и аппарат промывают свежей порцией ИХН, которую также фильтруют. Чтобы приготовить постоянные препараты (которые могут сохраняться несколько недель), осадок фиксируют на фильтре аппарата, заливая кипящей дистиллированной водой. Как только эта вода пройдет через фильтр, его снимают и окрашивают тем же способом, что и толстую каплю на предметном стекле (по Романовскому—Гимзе, Райту и др.).

Для выявления микрофилярии *Loa loa* препараты окрашивают горячим гематоксилином Эрлиха в течение 2—3 мин. Окрашенный фильтр высушивают в эксикаторе или изопропиловом спирте (последовательно в 3 чашках), а затем просветляют на стекле несколькими каплями иммерсионного масла, накрывают покровным стеклом и микроскопируют.

9.1.7. Кожа

В биоптатах кожи или в материале, полученном при ее скарификации, можно выявить микрофилярии онхоцерков и некоторых других возбудителей филяриатозов, а иногда — личинки шистосом и гельминтов, вызывающих линейный дерматит.

Материал для исследования берут с учетом излюбленной локализации укусов членистоногих — переносчиков инвазии. Энтомологической булавкой поднимают участок эпидермиса и лезвием безопасной бритвы срезают круглый или овальный кусочек диаметром несколько миллиметров. Его помещают на предметное стекло в каплю изотонического раствора натрия хлорида и накрывают покровным. Через 10 мин препарат микроскопируют. Личинки гельминтов обнаруживают по краям препарата.

Биоптат кожи можно поместить на 1—2 ч в пробирку, содержащую 2 мл ИХН, а затем исследовать осадок.

Исследование кожи можно проводить *методом Миллера*: у больного берут пять кусочков кожи, сильно сдавливают их, чтобы получить тканевую жидкость и кровь, из которых готовят препараты толстой капли. Их можно окрашивать краской Майера, гематоксилином Делафильда или по Романовскому—Гимзе.

Метод Дике для стандартного количественного учета инвазии заключается в следующем. Удаляют участок кожи размером 3 × 5 мм (массой 1—4 мг), измельчают его на предметном стекле в ИХН и подсчитывают число личинок. Результат оценивают полуколичественно: если в поле зрения обнаружены 1—4 личинки — +, 5—9 личинок — ++; 10—19 — +++; 20 и более — ++++.

К недостаткам метода относятся агрегация микрофилярий, прилипание среза кожи к предметному стеклу, изменение скорости миграции микрофилярии при подсыхании среза кожи. Для предотвращения прилипания можно помещать кусочек кожи на предметное стекло срезом вверх и через определенный отрезок времени, при необходимости добавлять каплю 10%-го раствора формалина в ИХН. При этом микрофилярии мгновенно погибают. Затем препарат окрашивают для идентификации микрофилярии.

Метод позволяет оценить скорость миграции, выраженную в количестве мигрирующих личинок за единицу времени.

9.1.8. Мышечная и соединительная ткани

В биоптатах пораженных тканей могут быть обнаружены личинки трихинелл, цестод, цистицерки, яйца шистосом, эхинококки и др.

Для обнаружения личинок трихинелл в мышцах применяются следующие методы.

Компрессионный метод. Биоптат икроножной или двуглавой мышцы бедра вблизи сухожилия получают хирургическим путем. Препаровальными иглами расщепляют кусочек мышцы на отдельные тончайшие волоконца, помещают в каплю глицерина и сдавливают между двумя предметными стеклами так, чтобы препарат стал тонким и прозрачным. При микроскопии в темном поле видна свернутая спиралью личинка в капсуле округлой или овальной формы. На ранних этапах болезни личинки не имеют капсул, они появляются на 30—40-й день болезни, а через 3—6 мес постепенно обызвествляются. Использование компрессориумов при санитарной экспертизе повышает эффективность исследования.

Метод переваривания. Около 1,0 г мышц измельчают, заливают 60 мл искусственного желудочного сока (0,6 г пепсина, 0,7 мл соляной кислоты, 100 мл воды) и в течение 18 ч выдерживают в термостате при 37 °С. Верхний слой жидкости осторожно слива-

ют, к осадку добавляют теплую воду (37—45 °С). Смесь выливают в аппарат Бермана, через 1 ч жидкость помещают в центрифужную пробирку, центрифугируют 5 мин при 1500 об/мин и микроскопируют осадок. Обызвествленные личинки можно декальцинировать в растворах соляной, азотной или серной кислоты.

9.1.9. Гистологический препарат

Кусочки мышц фиксируют в 10%-м растворе формалина, жидкости Ценкера или других фиксаторах, делают срезы и окрашивают гематоксилином Делафиляда. При слабой степени инвазии личинки в гистологических препаратах могут отсутствовать, но видна воспалительная инфильтрация (рис. 9.3).

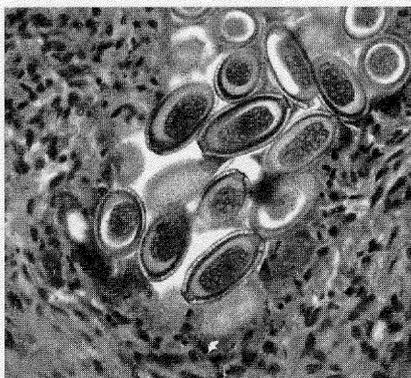


Рис. 9.3. Яйца нематоды *Capillaria hepatica* в печеночной ткани

Выявление цистицерков. Кусочки мышц или клетчатки осматривают невооруженным глазом и осторожно выделяют цистицерк (*Cysticercus cellulosae*) — беловатый полупрозрачный пузырек величиной с горошину. Его помещают в каплю глицерина между двумя предметными стеклами, раздавливают и под микроскопом отыскивают хоботок с крючьями и присосками.

Чтобы проверить жизнеспособность выделенного цистицерка, его помещают в смесь желчи с ИХН и инкубируют в термостате при 37 °С. Через 10—60 мин головка цистицерка выворачивается наружу.

9.1.10. Биоптат слизистой оболочки толстой кишки и мочевого пузыря

При отрицательных результатах исследования кала или мочи изучают биоптаты слизистой оболочки толстой кишки (для диагностики кишечного шистосомоза) или мочевого пузыря (для диагностики бильгарциоза или мочевого шистосомоза). При помощи щипцов, предназначенных для биопсии, с пораженной слизистой оболочки кишки или мочевого пузыря берут образцы величиной с рисовое зерно и помещают на 5—10 мин в воду или ИХН. Два биоптата раздавливают между предметными стеклами, которые плотно сжимают, концы стекол закрепляют липкой лентой и изучают препарат под микроскопом.

9.1.11. Содержимое кисты, абсцесса (пунктат)

Прозрачное содержимое кисты, абсцесса или пунктат исследуют так же, как дуоденальный сок, т. е. с добавлением эфира. Жидкость из эхинококкового пузыря центрифугируют, из осадка готовят препараты и изучают их под микроскопом для обнаружения крючьев и сколексов. Гнойное содержимое можно обрабатывать по методу Телемана (см. подразд. 9.1.1). При необходимости готовят гистологические препараты из удаленной при операции ткани абсцесса, кисты или опухоли.

При исследованиях подобного материала можно выявить гельминты и их фрагменты, личинки, яйца (эхинококк, альвеококк, спарганум, цистицерк, диروفиларии, аскариды, токсокара, парагонимус и др.). В пунктатах из узлов подкожной клетчатки обнаруживают диروفиларий и онхоцерков.

9.2. Серологическое и аллергологическое исследования

Серологическое исследование. Серологические методы имеют большое практическое значение для выявления инвазии на ранних этапах развития, до достижения гельминтом половой зрелости и начала откладывания яиц, а также при эпидемиологическом обследовании в эндемических очагах. Ограничение в использовании серологических реакций для диагностики гельминтозов связано со сложностью получения очищенных антигенов многих гельминтов. В большинстве случаев антигены, применяемые для серологической диагностики, представляют собой неочищенные и неохарактеризованные препараты (дезинтегрированные целые организмы или их экстракты), что обуславливает многочисленные перекрестные реакции. Эффективность серологической диагностики гельминтозов будет возрастать по мере совершенствования методов выделения и очистки соответствующих антигенов.

РСК. Реакция связывания комплемента с антигеном из высушенных личинок трихинелл (этанолрастворимая и этанолнерастворимая фракции) применяется для диагностики трихинеллеза; со спиртовыми экстрактами *Dirofilaria immitis* — для диагностики некоторых филяриатозов человека. Однако довольно часто наблюдаются ложноотрицательные и ложноположительные реакции.

При шистосомозах РСК позволяет установить заражение до достижения гельминтами половой зрелости и откладывания яиц, но до сих пор не удается дифференцировать этим методом три вида шистосом. В районах, пораженных шистосомозом, РСК широко применяются для эпидемиологического обследования населения.

РНГА. Эта реакция является более чувствительным методом диагностики трихинеллеза, чем РСК. Высоко специфична РНГА при

эхинококкозе (с жидкостью из эхинококкового пузыря человека в качестве антигена).

РПГ. Этот метод применяется для серологической диагностики трихинеллеза, аскаридоза и шистосомоза Мансона.

ИФА. Иммуноферментный анализ относится к числу наиболее чувствительных и специфических методов серологического исследования при паразитозах. Метод с успехом применяется для диагностики эхинококкоза, альвеококкоза, трихинеллеза, токсокароза, описторхоза, фасциолеза, шистосомоза Мансона. В перспективе — применение этой реакции при филяриатозах.

Реакция кольцепреципитации. Эта реакция используется для диагностики эхинококкоза. Стандартный антиген для этой реакции выпускается в жидком виде в разведении 1 : 1000. В узкие преципитационные пробирки наливают по 0,1 мл цельной или разведенной 1 : 2 исследуемой сыворотки. На ее поверхность, не допуская смешивания, наслаивают пастеровской пипеткой по 0,1 мл антигена в возрастающих разведениях. Результаты реакции учитывают через 2—3 ч. При положительной реакции на границе сыворотки и антигена появляется непрозрачное белое кольцо преципитата.

При отрицательном или сомнительном результате проводят реакцию преципитации в пробирках на холоде (РППХ). В тех же пробирках, в которых проводилась реакция кольцепреципитации, смешивают ингредиенты запаянным концом пастеровской пипетки. Смесь выдерживают при 2—5 °С в течение 4—5 ч (до 1 сут). Результаты учитывают с помощью лупы или агглютиноскопа. При положительной реакции на дне пробирки образуется осадок — нежный беловатого цвета преципитат.

Контролем служат пробирки, в которых вместо антигена находится ИХН.

Реакция латексной агглютинации. Реакция также применяется для диагностики эхинококкоза.

Для проведения реакции используют боратный раствор хлорида натрия (рН 8,2), для получения которого смешивают 50 мл 0,1 М раствора борной кислоты, 5,9 мл 0,1 М раствора гидроксида натрия и 100 мл дистиллированной воды с последующим добавлением 0,85 г хлорида натрия на каждые 100 мл смеси. Из технического латекса (синтетическая смола, имеющая вид жидкости молочно-белого цвета) готовят рабочее разведение на дистиллированной воде, причем дивинилстирольный латекс разводят 1 : 20, полистирольный — 1 : 2. Антигеном служит жидкость из эхинококкового пузыря человека или овцы.

Для адсорбции антигена на латексе в 10 мл буферного раствора добавляют 0,1 мл рабочего разведения латекса и 0,5 мл эхинококковой жидкости, тщательно перемешивают и в течение 1 ч выдерживают при комнатной температуре, периодически встряхивая. В центрифужные пробирки разливают исследуемую сыво-

ротку, разведенную буфером 1 : 4 — 1 : 64, и в каждую из них добавляют по 0,5 мл антигена, адсорбированного на частицах латекса. Контролем служит смесь 0,5 мл буфера и 0,5 мл антигена. Пробирки встряхивают, выдерживают 3 ч при 37 °С и 12 ч при 4 °С. Затем смесь в пробирках центрифугируют при 2500 об/мин в течение 3—5 мин и учитывают результаты реакции.

При резко положительной реакции (+++) осадок обильный, состоит из крупных частиц, надосадочная жидкость прозрачная. При положительной реакции (++) осадок из мелких частиц видим невооруженным глазом. Реакцию считают отрицательной (-), если жидкость в пробирках мутная и осадка нет. РЛА имеет диагностическое значение в титре 1 : 8 и выше.

При использовании для РЛА коммерческого эхинококкового диагностикума методика более простая: к разведениям сыворотки добавляют по 0,5 мл диагностикума.

РИФ. Эта реакция является одной из наиболее перспективных в серологической диагностике паразитозов, в частности шистосомоза (особенно в эндемичных районах, удаленных от центральных диагностических лабораторий), трихинеллеза и филяриатоза. Для проведения РИФ необходима капля крови, которую получают при проколе пальца иглой, высушивают на фильтровальной бумаге и пересылают в лабораторию, где ее экстрагируют и используют для проведения реакции.

Аллергологическое исследование. Внутрикожные аллергические пробы имеют относительную диагностическую ценность из-за частого развития неспецифических реакций. Эти пробы используются при эпидемиологическом исследовании населения на эхинококкоз, трихинеллез, шистосомоз. Пробу производят по общепринятым правилам, результаты ее учитывают через 20—30 мин, так как они характеризуют гиперчувствительность немедленного типа.

ГЛАВА 10 МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ОТДЕЛЬНЫХ ИНВАЗИЙ

10.1. Трематодозы

10.1.1. Фасциолез

Трематоды — гельминты небольшого размера, имеющие тело листовидной формы. На переднем конце его расположена ротовая присоска, на брюшной стороне — брюшные присоски, являющиеся органами прикрепления. В глубине ротовой присоски име-

ротку, разведенную буфером 1 : 4 — 1 : 64, и в каждую из них добавляют по 0,5 мл антигена, адсорбированного на частицах латекса. Контролем служит смесь 0,5 мл буфера и 0,5 мл антигена. Пробирки встряхивают, выдерживают 3 ч при 37 °С и 12 ч при 4 °С. Затем смесь в пробирках центрифугируют при 2500 об/мин в течение 3—5 мин и учитывают результаты реакции.

При резко положительной реакции (+++) осадок обильный, состоит из крупных частиц, надосадочная жидкость прозрачная. При положительной реакции (++) осадок из мелких частиц видим невооруженным глазом. Реакцию считают отрицательной (-), если жидкость в пробирках мутная и осадка нет. РЛА имеет диагностическое значение в титре 1 : 8 и выше.

При использовании для РЛА коммерческого эхинококкового диагностикума методика более простая: к разведениям сыворотки добавляют по 0,5 мл диагностикума.

РИФ. Эта реакция является одной из наиболее перспективных в серологической диагностике паразитозов, в частности шистосомоза (особенно в эндемичных районах, удаленных от центральных диагностических лабораторий), трихинеллеза и филяриатоза. Для проведения РИФ необходима капля крови, которую получают при проколе пальца иглой, высушивают на фильтровальной бумаге и пересылают в лабораторию, где ее экстрагируют и используют для проведения реакции.

Аллергологическое исследование. Внутрикожные аллергические пробы имеют относительную диагностическую ценность из-за частого развития неспецифических реакций. Эти пробы используются при эпидемиологическом исследовании населения на эхинококкоз, трихинеллез, шистосомоз. Пробу производят по общепринятым правилам, результаты ее учитывают через 20—30 мин, так как они характеризуют гиперчувствительность немедленного типа.

ГЛАВА 10 МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ОТДЕЛЬНЫХ ИНВАЗИЙ

10.1. Трематодозы

10.1.1. Фасциолез

Трематоды — гельминты небольшого размера, имеющие тело листовидной формы. На переднем конце его расположена ротовая присоска, на брюшной стороне — брюшные присоски, являющиеся органами прикрепления. В глубине ротовой присоски име-

ется ротовое отверстие, ведущее в глотку, затем — в пищевод, и две ветви кишечника, которые заканчиваются слепо. Все трематоды, кроме шистосом, гермафродиты. Цикл их развития включает основного дефинитивного хозяина (человек) и одного или двух промежуточных хозяев (моллюск). У промежуточного хозяина личиночная стадия развития происходит в воде.

Возбудитель — печеночная двуустка (*Fasciola hepatica*), имеющая плоское листовидное тело с коричневым оттенком. Размеры половозрелого червя: длина 2,0—3,5 см, ширина 0,8—1,2 см. Яйца печеночной двуустки имеют правильную, овальную, несколько удлиненную форму, тонкую, желтого цвета оболочку, крышечку на одном и плоский бугорок на другом конце. Размеры яиц 125—150×62—81 мкм (см. рис. 9.2, *p*).

Паразитирует печеночная двуустка в желчных путях и желчном пузыре крупного и мелкого рогатого скота, лошадей, свиней, травоядных животных, иногда — у человека.

Острая фаза фасциолеза характеризуется токсико-аллергическими проявлениями с лейкоцитозом и эозинофилией в периферической крови. Хронической фазе свойственны признаки ангиохолита, холецистогепатита, дискинезии желчных путей. В дуоденальном содержимом и в желчи (особенно в порции *B* и *C*) повышено содержание слизи, лейкоцитов, эпителиоцитов.

Диагностика фасциолеза основана на обнаружении яиц печеночной двуустки в дуоденальном содержимом и кале через 3—4 мес после окончания острого периода заболевания. Исследованию подлежат все три порции желчи, хотя вызвать рефлекс желчного пузыря удастся с трудом и не во всех случаях. Наиболее эффективно исследование толстого мазка и применение методов осаждения. При слабой степени инвазии обнаружить яйца печеночной двуустки в кале очень трудно.

У домашнего скота и редко у человека наблюдается инвазия родственным видом гельминтов — *Fasciola gigantica*. Проявления болезни и принципы диагностики те же.

Географическое распространение: спорадические случаи фасциолеза зарегистрированы в большинстве стран мира, вспышки заболевания отмечались во Франции, Чили, на Кубе.

10.1.2. Фасциолопсидоз

Возбудитель — *Fasciolopsis buski* — при жизни имеет красновато-оранжевую окраску, тело его языковидной формы покрыто чешуйками. Длина гельминта 15—50 мм, ширина 0,5—20 мм. Яйца овальной формы, суживаются к полюсам, их размер 130—140×80—95 мкм (см. рис. 9.2, *c*). Оболочка их тонкая, серовато-желтого цвета. На одном полюсе яиц расположена крышечка, на другом — бугорок, лежащий медиально или асимметрично. Яйца

заполнены многочисленными желточными клетками (см. цв. вклейку, рис. 38, а).

Взрослый гельминт паразитирует в тонком кишечнике человека, домашней и дикой свиньи, собаки, но иногда проникает в печень и поджелудочную железу. Клинически инвазия проявляется признаками нарушения моторной и секреторной функции желудка и кишечника, интоксикацией и сенсбилизацией, алиментарной дистрофией с отеками или без них.

Лабораторная диагностика, как и при фасциолезе, основана на обнаружении яиц в кале.

Географическое распространение: страны Юго-Восточной Азии, Индия.

10.1.3. Парагонимоз

Легочный сосальщик — *Paragonimus westermani* — в живом состоянии имеет красновато-коричневый цвет и яйцевидную форму. Длина гельминта 7,5—13 мм, ширина 4,8 мм, толщина 3,5—5 мм; поверхность тела покрыта шипиками. Яйца золотисто-коричневые, овальные, с крышечкой, их величина 80—118×48—60 мкм (см. цв. вклейку, рис. 38, з и рис. 9.2, к).

Половозрелые формы паразитируют у человека, собаки, кошки, тигра, свиньи, локализуясь преимущественно в мелких бронхах, иногда — на плевре, диафрагме, в поджелудочной железе, кишечнике, брыжеечных лимфатических узлах, предстательной железе, печени и других органах и тканях.

Лабораторная диагностика парагонимоза основывается на обнаружении яиц в мокроте и фекалиях (через 3 мес от начала болезни, когда паразиты достигают половой зрелости и начинают выделять яйца). При поражении плевры в плевральном экссудате иногда выявляют молодые трематоды. В случаях локализации гельминтов в почках яйца выделяются с мочой.

В первые 2—3 мес после заражения могут быть положительными реакция связывания комплемента и кожная аллергическая проба.

Географическое распространение: некоторые районы Кореи, Китая, Японии, Индии, Непала, Филиппин, ряд стран Африки (Камерун, Конго, Сомали) и Америки (Бразилия, Венесуэла, Колумбия, Мексика, Панама, Перу, Эквадор).

10.1.4. Метагонимоз

Возбудитель — *Metagonimus yokogawai* — мелкая трематода длиной 1,0—2,5 мм, шириной 0,4—0,7 мм; передняя часть ее тела покрыта шипиками. Яйцо имеет овальную форму, гладкую темно-желтую или светло-коричневую оболочку, крышечка уплощена,

на противоположном полюсе имеется хорошо заметный бугорок. Размеры яиц $26—28 \times 15—17$ мкм (см. рис. 9.2, а).

Метагонимус паразитирует в тонкой кишке человека, свиньи, хищных млекопитающих и рыбоядных птиц. На ранних стадиях метагонимоз проявляется как острая дисфункция желудочно-кишечного тракта с аллергическим компонентом, а в последующем он имеет субклиническое течение с частой болью в животе, диспепсическими расстройствами, упорным поносом.

В начале болезни диагностика основана на клинико-эпидемиологических данных (употребление в пищу сырой или недостаточно обработанной рыбы), а в дальнейшем подтверждается обнаружением яиц в кале. Для ранней стадии метагонимоза характерен эозинофильный лейкоцитоз.

Географическое распространение: Корея, Япония, Китай, Филиппины, на территории России — бассейн реки Амур.

10.1.5. Гетерофиоз

Возбудитель — *Heterophyes heterophyes* — мелкая трематода, имеет удлиненное, усеянное шипиками тело длиной 1—2 мм, шириной 0,4—0,5 мм. Яйца размером $28—30 \times 15—17$ мкм имеют крышечку и утолщение оболочки на противоположном конце (см. цв. вклейку, рис. 38, б и рис. 9.2, б).

Гельминт обитает в тонком кишечнике человека, собаки, кошки, лисицы, которые являются его окончательными хозяевами. Инвазия проявляется разнообразными нарушениями функции желудочно-кишечного тракта. Возможен занос яиц с кровью в мозг, что может сопровождаться эпилептиформными припадками и кровоизлияниями. В случае попадания яиц в мышцу и клапаны сердца развивается сердечная недостаточность.

Диагностика гетерофиоза основана на обнаружении в кале яиц, которые нужно дифференцировать с яйцами клонорхиса и метагонимуса.

Географическое распространение: Египет, Греция, Индия, страны Дальнего Востока.

10.1.6. Описторхоз (болезнь Виноградова)

Кошачий сосальщик — *Opisthorchis felineus* — в организме человека достигает в длину 8,1 мм, в ширину — 2 мм. Яйца описторхиса имеют размер $23—24 \times 10—19$ мкм, слегка вытянуты, асимметричной формы с гладкой тонкой светло-желтой оболочкой, на одном из полюсов имеется слабо различимый бугорок (см. рис. 9.2, в).

Описторхисы паразитируют в печеночных протоках, желчном пузыре, протоках поджелудочной железы человека и хищных млекопитающих, которые являются их окончательными хозяевами.

Острая стадия описторхоза характеризуется токсико-аллергическими проявлениями с высокой температурой тела и эозинофильным лейкоцитозом, в дальнейшем появляются признаки холангита, ангиохолецистита, холецистогепатита и панкреатита. В желчи обнаруживается много слизи, эпителия, лейкоцитов.

Решающее диагностическое значение имеет обнаружение яиц кошачьего сосальщика в кале и дуоденальном содержимом. В отдельных случаях необходимо повторное зондирование. При слабой степени инвазии в кале бывает мало яиц, что затрудняет их обнаружение.

Наиболее эффективен для диагностики описторхоза *метод Горячева*.

Раствор хлорида натрия (70—100 мл) или раствор нитрата калия (22 %-й) наливают в цилиндр диаметром 1,5—3,0 см и высотой 18—20 см. Кал (0,5—1,0 г) тщательно размешивают в отдельной посуде с 20—25 мл воды, фильтруют через воронку с двумя слоями марли, наставляя фильтрат на солевой раствор и избегая перемешивания. Таким образом, фильтрат кала располагается в верхнем слое над солевым раствором в течение нескольких часов. Яйца, имеющие относительную плотность 1,384—1,461, оседают на дно с небольшим количеством калового детрита. Через 2—3 ч верхний слой отсасывают пипеткой, а солевой раствор оставляют еще на 12—20 ч или центрифугируют. Осадок собирают пипеткой и микроскопируют.

При массовых обследованиях на описторхоз целесообразно применение упрощенной методики Горячева: около 1,5 г кала размешивают в химическом стаканчике с 3—4 мл воды, смесь осторожно фильтруют через два слоя марли в центрифужную пробирку, содержащую 4—5 мл насыщенного раствора хлорида натрия. Пробирки выдерживают в штативе 15—20 ч. Осадок микроскопируют под малым увеличением.

Для оценки эффективности лечения дуоденальное содержимое и кал исследуют на наличие яиц описторхов по *методу Стояло* (количественный учет). После лечения мертвые кошачьи сосальщики нередко обнаруживаются в дуоденальном содержимом или кашицеобразных фекалиях после отмывания.

Помимо микроскопии, для диагностики описторхоза используется ИФА, особенно информативный на ранних стадиях болезни или при слабой степени инвазии.

Географическое распространение: очаги в бассейнах ряда рек Европы и Азии.

Родственный кошачьему сосальщику вид гельминта (*Opisthorchis viverrini*) в половозрелой стадии также паразитирует в печеночных протоках, желчном пузыре и протоках поджелудочной железы человека, домашней кошки, собаки, виверры. Проявления инвазии и принципы диагностики такие же, как при описторхозе. Очаги описторхоза виверры имеются в Таиланде, Индии, Китае (Тайвань), некоторых странах Африки.

10.1.7. Клонорхоз

Китайский сосальщик — *Clonorchis sinensis* — имеет плоское тело длиной 10—20 мм, шириной 2—4 мм (см. цв. вклейку, рис. 39). Яйца этого гельминта грушевидной формы, иногда асимметричны, оболочка морщинистая, желтовато-коричневого цвета, под высокой крышечкой образует валик в виде выступов-плечиков. На противоположном от крышечки расширенном полюсе имеется слабо заметный из-за шероховатости оболочки бугорок (см. цв. вклейку, рис. 38, в). Размеры яиц 27—35 × 12—19 мкм (см. рис. 9.2, з).

Паразитирует в печеночных протоках, желчном пузыре, иногда — в протоках поджелудочной железы человека, домашних и диких хищных млекопитающих — окончательных хозяев паразита. Проявление болезни и методы диагностики такие же, как при описторхозе.

Географическое распространение: Корея, Япония, Китай, Индия, в России — на территории Дальнего Востока, в бассейне реки Амур.

10.1.8. Шистосоматоз мочеполовой (бильгарциоз)

Возбудитель — шистосома кровяная (*Schistosoma haematobium*). Тело гельминта покрыто сосочками, длина тела самца — 12—14 мм, ширина — 1 мм, у самки — 20 мм и 0,25 мм соответственно (рис. 10.1, а). Яйца овальные, удлинённые, размером 120—160 × 50—70 мкм, на одном из полюсов — заострение в виде шипа, крышечки нет, оболочка тонкая прозрачная (см. цв. вклейку, рис. 40, в и рис. 9.2, о). Шистосома кровяная паразитирует в венах мочевого пузыря и половых органов. Яйца из мелких вен проникают в просвет мочевого пузыря и выделяются из организма с мочой. Патогенное действие оказывают сами паразиты и их яйца,

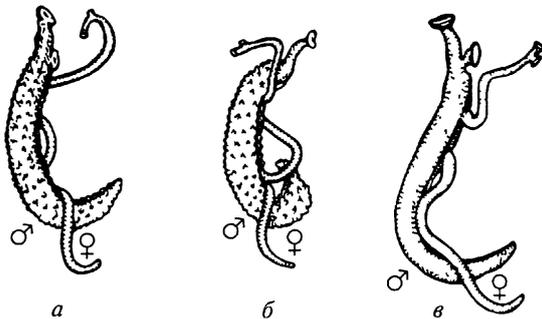


Рис. 10.1. Виды шистосом:

а — *Schistosoma haematobium*; б — *Schistosoma mansoni*; в — *Schistosoma japonicum*

вызывая аллергические реакции, воспалительные изменения в слизистой оболочке мочевых путей и половых органов, папилломотозные разрастания и изъязвления пораженных тканей.

Постоянные проявления мочеполового шистосомоза — дизурия, гематурия, эозинофилия крови. Подтверждением диагноза является обнаружение яиц шистосом в моче. Поскольку максимально они выделяются в полуденное время, мочу следует собирать между 10 и 14 ч.

Для повышения достоверности диагностики желательнее исследовать всю суточную мочу, при отрицательных результатах — повторно.

Жизнеспособность яиц определяют для оценки степени тяжести инвазии, эффективности лечения и контагиозности больных. Зрелые жизнеспособные яйца прозрачны, содержат живых подвижных мирацидиев, нередко окружены эритроцитами и лейкоцитами. Мертвые яйца имеют темно-серую или черную окраску, их содержимое бесструктурно. Если по виду яиц невозможно определить их жизнеспособность, используют *метод определения вылупляемости мирацидиев*. Для этого порцию мочи разводят чистой профильтрованной (без примеси хлора) или дистиллированной водой и выливают в пробирку, которую помещают в штатив вблизи источника света (например, настольная лампа). Через 20—30 мин с помощью лупы можно обнаружить в пробирке движущихся мирацидиев.

Серологическое и аллергологическое исследования. При шистосомозах иммунодиагностика дополняет микроскопическое исследование, но в качестве самостоятельных методов диагностики ее применять не рекомендуется. Практическое значение имеют РИФ, РСК, ИФА, РП, РГА, а также *внутрикожная проба, реакция флоккуляции на предметном стекле, реакция кольцепреципитации, реакция преципитации* вокруг яйца шистосомы, *реакция агглютинации* церкариев, *реакция иммобилизации* мирацидиев и др. Для исследования необходимы гепаринизированная кровь (не менее 1 мл) и 4 пробы сыворотки крови по 1 мл каждая. Кровь из пальца набирают в обработанную гепарином стеклянную трубку или помещают на фильтровальную бумагу, предварительно обработанную консервантами для предупреждения роста плесневых грибов (например, раствором тиомерсала 1 : 10 000) и высушенную. Полоски фильтровальной бумаги с каплями крови определенного объема тщательно высушивают при 56 °С и выше. В дальнейшем участок фильтровальной бумаги с каплей крови вырезают, погружают в буферный раствор (рН 7,2) и оставляют на несколько часов при 4 °С. Объем раствора подбирают с таким расчетом, чтобы исходное разведение сыворотки составило 1 : 20. Кровь для серологического исследования можно хранить около 2 недель при 20—70 °С, но лучше всего ее использовать немедленно.

Географическое распространение: страны Африки (Египет, Заир, Конго, Судан, Уганда, Зимбабве, Ангола, ЮАР, Сьерра-Леоне, Гамбия, Марокко, Алжир, Тунис, Эфиопия и др.), некоторые страны Азии (Ирак, Сирия, Израиль, Саудовская Аравия, Йемен, Иран). Случаи этой инвазии зарегистрированы в Индии, на Кипре, Маврикии, Мадагаскаре, на юге Португалии, Греции, на севере Австралии. В европейских странах и России шистосомоз носит завозной характер.

10.1.9. Кишечный шистосоматоз Мансона

Возбудитель — *Schistosoma mansoni* (рис. 10.1, б). Тело гельминта покрыто сосочками. Размеры самца: длина 10 мм, ширина 1,2 мм, самки — 15 и 0,17 мм соответственно. Яйца овальные, удлинённые, с прозрачной желтой оболочкой, без крышечки. Рядом с одним из полюсов яйца расположен крупный, загнутый к полюсу шип (см. цв. вклейку, рис. 40, а). Размеры яиц 130—180 × 60—80 мкм (см. рис. 9.2, н).

Шистосома Мансона паразитирует в мелких брыжеечных и прямокишечных венах человека и некоторых видов обезьян, вызывая аллергическую реакцию с эозинофилией, тяжелое поражение кишечника, печени с портальной гипертензией, асцитом и расширением вен пищевода и желудка. Возможен занос яиц шистосом в мозг (наблюдаются парезы, параличи, судороги), сосуды малого круга кровообращения, стенку аппендикса и пр.

Диагностика кишечного шистосомоза основана на клинико-эпидемиологических данных и обнаружении яиц шистосом в кале. Готовят *толстый мазок*, который исследуют под бинокулярным микроскопом. Используют также *методы осаждения*, в том числе *метод Горячева*. Необходимо учитывать, что максимальное число яиц концентрируется в первой порции выделенного кала.

Если при исследовании кала, полученного при дефекации (без применения клизмы или слабительного), выявить яйца гельминта не удалось, готовят мазок из ректальной слизи. Около 80 % откладываемых самкой яиц задерживается и погибает в тканях, поэтому для выявления неактивного шистосомоза исследуют биоптат слизистой оболочки прямой кишки, взятой на расстоянии 10 см от заднего прохода.

Кусочек биопсированной ткани раздавливают в капле глицерина между двумя предметными стеклами и микроскопируют препарат; при этом яйца, как правило, хорошо видны.

При ректороманоскопии обнаруживают изменения слизистой оболочки в виде воспаления, полипов, мелких язв, стриктур.

Серологическое и аллергологическое исследования. В последние годы для иммунодиагностики кишечного шистосомоза применяются кожные пробы, РСК и ИФА, непрямая РИФ и др.

Географическое распространение: Египет, Судан, Танзания, Мозамбик, Малайзия, Заир, Камерун, Либерия, Гвинея, Бразилия, Венесуэла, Пуэрто-Рико.

10.1.10. Шистосоматоз кишечный интеркалатный

Возбудитель — *Schistosoma intercalatum* — паразитирует в брыжеечных венах человека. Яйца этого гельминта по внешнему виду идентичны яйцам *S. haematobium*, но выделяются с калом (см. [цв. вклейку, рис. 40, з](#)). Карболовым фуксином Циля оболочки яиц *S. intercalatum* окрашиваются в красный цвет, тогда как яйца *S. haematobium* таким свойством не обладают.

Клинически этот гельминтоз проявляется подобно шистосомозу Мансона. Методы диагностики те же.

Географическое распространение: страны Африки (Заир, Конго, Габон, Камерун, Чад, ЮАР и др.).

10.1.11. Шистосоматоз японский

Возбудитель — *Schistosoma japonicum* — имеет сходное с другими шистосомами строение, но кутикула ее лишена сосочков (рис. 10.1, в). Размеры самца: длина 9,5—17,8 мм, ширина 0,97 мм; самки — 15—20 и 0,36 мм соответственно. Яйца овальной формы с прозрачной бледно-желтой оболочкой, без крышечки. На боковой поверхности яйца, ближе к одному из полюсов, расположен маленький шип ([см. цв. вклейку, рис. 40, б](#)). Размеры яиц 70—100×50—65 мкм (см. рис. 9.2, н). Паразитирует в мелких брыжеечных и прямокишечных венах человека, обезьян, крупного и мелкого рогатого скота, свиней, собак, крыс и пр. По клиническим проявлениям близок к кишечному шистосомозу. Для диагностики японского шистосомоза используются те же методы, что и для распознавания кишечного шистосомоза.

Географическое распространение: Индонезия, Кампучия, Китай, Корея, Лаос, Малайзия, Таиланд, Филиппины, Япония.

10.1.12. Дикроцелиоз

Дикроцелий ланцетовидный — *Dicrocoelium lanceatum* — представляет собой мелкую трематоду длиной 5—12 мм и шириной 0,25—0,33 мм, паразитирующую в печеночных протоках и желчном пузыре у овец и других травоядных животных, иногда — у человека.

Проявления инвазии и принципы диагностики такие же, как при фасциолезе.

Распространен повсеместно, чаще в странах с теплым климатом.

10.2. Цестодозы

Ленточные гельминты, или цестоды, имеют лентовидное строение, на переднем конце тела расположена головка (сколекс) с органами прикрепления — присосками и крючьями. От нее отходит шейка, переходящая в тело гельминта — стробиллу, которая состоит из члеников (проглоттид). В средней части тела членики гермафродитные, на заднем конце паразита — зрелые с разросшейся маткой, заполненной яйцами. Цикл развития цестод включает одного или двух промежуточных хозяев. Цестоды питаются всасыванием пищевых веществ всей поверхностью тела, так как у них редуцирована пищеварительная система.

10.2.1. Дифиллоботриоз

Лентец широкий — *Diphyllobothrium latum* — достигает в длину 2—10 м, головка его длиной 2,0—2,5 мм снабжена двумя продольными присасывательными щелями (ботриями), с помощью которых она фиксируется к слизистой оболочке кишки. Ширина зрелых члеников в 2,5—3,0 раза больше длины, в центре их расположена извилистая матка, собранная в клубок и заполненная яйцами (рис. 10.2, а). Матка имеет выводное отверстие, поэтому яйца постоянно выделяются с калом.

Яйца лентеца широкого имеют овальную форму, гладкую желтоватого цвета прозрачную оболочку. На одном полюсе яйца расположена крышечка, на другом — бугорок шириной около 5 мкм. Размеры яиц 70—83 × 50—54 мкм.

Лентец широкий паразитирует в тонкой кишке человека, собаки, лисицы, медведя, кошки и других хищных млекопитающих.

Инвазия проявляется диспепсическими расстройствами, глосситом, гиперхромной анемией, обусловленной дефицитом циан-

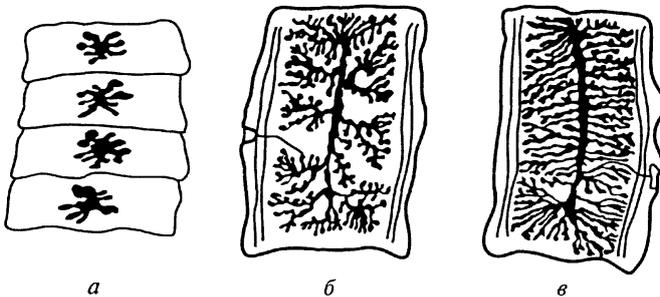


Рис. 10.2. Концевые зрелые членики цестод с маткой, заполненной яйцами:

а — *Diphyllobothrium latum*; б — *Taenia solium*; в — *Taeniarhynchus saginatus*

нокобаламина, парестезиями; нередко наблюдается бессимптомное течение.

Лабораторная диагностика дифиллоботриоза основана на обнаружении яиц гельминта в кале. Для этого пригодны все описанные выше способы, в том числе мазок на предметном стекле. Иногда необходимы повторные исследования. При дефекации нередко выделяются фрагменты стробиллы различной длины.

Географическое распространение: многие страны мира, особенно в районах пресноводных водоемов.

10.2.2. Тениоз и цистицеркоз

Цепень свиной, или вооруженный, — *Taenia solium* — имеет тело длиной 3—4 м, состоящее из нескольких сот члеников. Диаметр головки 1—2 мм, она снабжена четырьмя присосками и хоботком с двойным венчиком крючьев. В передней части тела свиного цепня ширина члеников превышает их длину, в средней части членики становятся квадратными, а в задней приобретают прямоугольную форму. В продольном направлении величина зрелого членика 12—15 мм, в поперечном — 6—7 мм (рис. 10.2, б). Матка в зрелых члениках содержит 30 000—50 000 яиц и имеет вид центрального ствола, от которого отходят обычно до 12 пар боковых ветвей. Онкосфера (зародыш) гельминта в яйце имеет характерное строение с радиальной исчерченностью (см. [цв. вклейку, рис. 41, а](#)). Размеры яиц 28—40×28—38 мкм (см. рис. 9.2, д).

Свиной цепень обитает в тонком кишечнике человека, прикрепляясь сколексом к слизистой оболочке. Симптомы инвазии обусловлены нарушением пищеварения и сходны с симптомами дифиллоботриоза.

Человек может быть не только окончательным, но и промежуточным хозяином паразита. При паразитировании личиночной стадии свиного цепня (цистицеркоз) в организме человека проявления инвазии зависят от локализации цистицерка. Особенно тяжело протекает цистицеркоз центральной нервной системы, глаз и пр.

Диагностика тениоза основана на обнаружении в кале члеников свиного цепня, которые отходят пассивно. Промытые водой членики цепня помещают между двумя предметными стеклами, слегка сдавливают и просматривают невооруженным глазом или с помощью лупы. При дифференциации члеников свиного и бычьего цепней учитывают их размеры и число ветвей матки.

Поскольку матка у свиного и бычьего цепней замкнутая, яйца в кале могут появиться лишь при разрушении оболочки членика в кишке хозяина.

Цистицеркоз мозга диагностируют на основании неврологических симптомов, результатов исследования спинномозговой

жидкости, в которой обнаруживают лимфоцитарно-нейтрофильный плеоцитоз с наличием эозинофильных гранулоцитов. Можно использовать РСК с сывороткой крови или спинномозговой жидкостью и цистицеркозным антигеном, но при обызвествлении цистицерков она обычно отрицательна. Ценные данные для диагностики тениоза дает пневмоэнцефалография. Для выявления цистицеркоза глаз применяют офтальмоскопию. Диагностика цистицеркоза мышц основана на обнаружении обызвествленных цистицерков при рентгенографии конечностей. Вспомогательное значение имеют сведения об отхождении члеников цепня с калом.

Географическое распространение: тениоз встречается во всех странах, где развито свиноводство и население употребляет в пищу свинину. Цистицеркоз нередко наблюдается в Южной Африке, Мексике, Чили.

10.2.3. Тениаринхоз

Цепень невооруженный, или бычий — *Taeniarrhynchus saginatus* — имеет сколекс округлой формы диаметром 1,5—2,0 мм с четырьмя присосками. Длина стробиллы достигает 4—12 м. Размеры гермафродитных члеников 9×12 мм, зрелых — 20—30×12 мм (рис. 10.2, в). Матка бычьего цепня имеет 18—35 боковых ветвей. Когда стробилла достигает 6—7 м, с фекалиями начинают выделяться конечные членики по 6—8 за сутки, обычно одиночные. Яйца и онкосферы *T. solium* и *T. saginatus* морфологически идентичны (см. цв. вклейку, рис. 41, а).

Окончательный хозяин — человек, у которого паразит локализуется в тонком кишечнике. Проявления тениаринхоза обусловлены сочетанным механическим, рефлекторным и токсико-аллергическим влиянием гельминта на организм хозяина, особенно при множественной инвазии. Они сходны с признаками тениоза и дифиллоботриоза.

Диагностика тениаринхоза основана на обнаружении члеников цепня, которые выделяются с калом почти ежедневно, часть из них активно выползает наружу и задерживается на белье. Дифференциация члеников невооруженного цепня и проглоттид свиного цепня проводится с учетом их размеров и строения матки.

При массовых обследованиях на тениаринхоз, особенно среди животноводов, проводят опрос населения с демонстрацией члеников цепня.

Для обнаружения яиц с онкосферой внутри, которые выдавливаются из члеников при прохождении через задний проход, делают соскоб с кожи перианальных складок.

Тениаринхоз распространен в скотоводческих районах, где мясо является основным продуктом питания населения.

10.2.4. Гименолепидоз

Карликовый цепень — *Hymenolepis nana* — мелкая цестода длиной 1,5—3,0 см, шириной 0,5—1,0 мм. Сколекс диаметром 0,25—0,3 мм снабжен четырьмя присосками и хоботком с венчиком крючьев. Яйцо имеет овальную форму и многослойную оболочку. Шестикрючная онкосфера расположена в центре яйца (см. цв. вклейку, рис. 41, б). Размеры яиц 45 × 37 мкм (см. рис. 9.2, е).

Карликовый цепень паразитирует в тонком кишечнике человека. При массивной инвазии возникают воспаление слизистой оболочки кишечника, диспепсические расстройства, нарушения перистальтики, а также различная неврологическая симптоматика.

Диагностика гименолепидоза основана на обнаружении яиц в фекалиях, включает исследование *нативного мазка* и применение *методов флотации* в растворе нитрата аммония или нитрата натрия (см. подразд. 9.1.1) со снятием пленки предметным стеклом. При слабой степени инвазии и при двух-, трехкратном отрицательном результате исследования эффективность анализа можно повысить назначением на ночь фенасала (0,5—1,0 г в зависимости от возраста пациента) и пургена (0,1 г) с последующим исследованием кала, выделенного утром.

Географическое распространение повсеместное.

10.2.5. Эхинококкоз

Цепень эхинококка — *Echinococcus granulosus* — достигает в длину 2,5—5,4 мм, в ширину — 0,6 мм, состоит из 3—4 члеников. Сколекс снабжен хоботком с 36—40 крючьями. Конечный зрелый членик имеет длину 1,6—2,8 мм. Матка замкнутая, мешковидной формы, с непостоянным числом ветвей, содержит 500—800 яиц. Диаметр яиц 28—36 мкм, по строению они похожи на яйца других тениид.

Окончательными хозяевами эхинококка являются собака, волк, лиса, шакал и другие животные. Гельминт на стадии личинки паразитирует у промежуточных хозяев (копытных), а также у человека, локализуясь в печени, легких, почках и других органах и тканях.

Пузырчатая личинка (однокамерный эхинококк) растет медленно, может размножаться почкованием. Снаружи эхинококковый пузырь окружен реактивной фиброзной капсулой, состоящей из наружного слоистого кутикулярного и внутреннего зародышевого слоя, за счет которого формируются инвазионные элементы дочерних и внучатых пузырей, содержащие сколексы эхинококка.

Клинические проявления эхинококкоза обусловлены локализацией паразитарных кист. Так, при прорыве пузыря в бронхи в мокроте можно обнаружить крючья эхинококка (рис. 10.3).

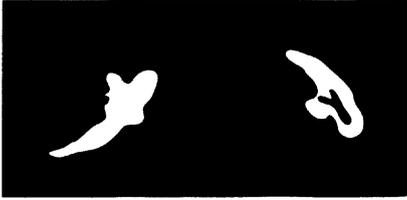


Рис. 10.3. Крючья эхинококка в мокроте

Серодиагностика эхинококкоза осуществляется с помощью ИФА, РНГА, РИД, РЛА и реакции кольцепреципитации. Наиболее эффективно использование 2—3 реакций одновременно. Диагностические титры: ИФА — 1 : 400; РНГА — 1 : 256; РЛА — 1 : 8 и выше. РИД и реакцию кольцепреципитации оце-

нивают качественно, по наличию линии или кольца преципитации.

Применявшаяся в прошлом внутрикожная аллергическая проба (Кацони) в настоящее время не используется из-за возможной анафилактической реакции.

Географическое распространение: очаги эхинококкоза имеются в Южной Европе, Монголии, Иране, Турции, Северной Африке, Южной Америке, Австралии и др.

10.2.6. Спарганоз

Спарганоз — инвазия человека личинками (плероцеркоидами) лентеца *Sparganum profiferum*. Окончательные хозяева гельминта — собака, волк, кошка, тигр, леопард и др. Промежуточными хозяевами, в различных органах и тканях которых паразитирует личиночная стадия гельминта, могут быть змеи, лягушки, птицы, некоторые млекопитающие и человек. Плероцеркоиды достигают в длину 1—60 см и в ширину 3—5 мм.

У инвазированных отмечаются признаки аллергии, образование подкожных узлов, абсцессов, для поражения глаз характерны боль, слезотечение, отек и птоз век.

Диагностика спарганоза заключается в идентификации удаленных при операции гельминтов.

Географическое распространение: страны Дальнего Востока, Австралия, Африка, Южная Америка и др.

10.3. Нематодозы

Нематоды (или круглые черви) имеют нитевидную или веретенообразную форму тела, на поперечном разрезе — круглые. Тело нематод покрыто кутикулой, на переднем конце его расположено ротовое отверстие, ведущее в пищевод и кишечник. На вентральной стороне заднего конца тела открывается анальное отверстие.

Размеры нематод различны — от 1—2 мм до 100 см и более. Все нематоды раздельнополы, самцы в 1,5—2 раза меньше самок. Нематоды могут быть живородящими или яйцекладущими.

Цикл развития большинства нематод проходит прямым путем с выходом яиц во внешнюю среду. Возможно более сложное развитие со сменой хозяев.

10.3.1. Филяриатозы

Филяриатозы — группа заболеваний, вызываемых филяриями: *Wuchereria bancrofti* (вухерериоз), *Brugia malayi* (бругиоз), *Loa loa* (лоаоз), *Onchocerca volvulus* (онхоцеркоз), *Acanthocheilonema (Dipetalonema) perstans* (дипеталонематоз, или акантохейлонематоз), *Mansonia ozzardi* (мансонеллез).

Все филярии, или нитчатые черви, имеют тело нитевидной формы длиной 23—90 мм и шириной 0,09—0,35 мм, самцы меньше самок (см. цв. вклейку, рис. 42). Самки живородящие, личинки каждого вида — микрофилярии — имеют характерные особенности. Дифференциация их основана на размерах, наличии или отсутствии чехлика, расположении ядер в хвостовом конце и др. (табл. 10.1).

Патогенное действие филярии и их личинок определяется локализацией паразитов, сенсбилизацией организма больных продуктами обмена веществ, распадом гельминтов и их личинок. Возможно присоединение вторичной бактериальной инфекции с развитием абсцессов и даже сепсиса. Нередко филяриатозы протекают бессимптомно.

Географическое распространение филяриатозов представлено в табл. 10.1.

Вухерериоз. Возбудитель — *Wuchereria bancrofti* паразитирует в лимфатических узлах и сосудах человека. Инвазия проявляется аллергическими реакциями, нарушением лимфообращения, прекращением лимфооттока, дистрофическими расстройствами и воспалительными изменениями в пораженных тканях. Клинически вухерериоз проявляется аллергическими реакциями — сыпь на коже, эозинофилия, слоновость конечностей (чаще нижних), мошонки и пр.

Диагностика вухерериоза основана на обнаружении микрофилярий в периферической крови (см. подразд. 9.1.6). В связи с периодичностью микрофиляремии следует брать кровь для исследования не только днем, но и в ночные часы. Для определения вида микрофилярий препарат микроскопируют с использованием иммерсионного объектива. Тело микрофилярий размером 0,13—0,32×0,01 мм окружено чехликом, далеко выступающим за головной и хвостовой концы (см. цв. вклейку, рис. 42, а). Головной конец тела тупой, хвостовой — заострен, ядра мелкие, четко очерчены, ядерная колонка заканчивается несколькими удлинненными ядрами, которые не доходят до вершины хвостового конца (рис. 10.4, а).

Основные дифференциально-диагностические признаки микрофилярий

Вид паразита		Признаки и особенности диагностики инвазии				
		Географическое распространение	Локализация		Время появления в крови	Исследуемый материал
			взрослых гельминтов	микрофилярий		
Микрофилярия без чехлика	<i>Onchocerca volvulus</i>	Экваториальная, Западная и Восточная Африка, Гватемала, Мексика	Подкожная клетчатка	Лимфатические и онхоцеркозные узлы	—	Срез кожи
	<i>Di petalonema treptocerca</i>	Африка (Конго, Камерун, Гана)	Подкожная клетчатка	Кожа и ткани	—	Срез кожи
	<i>Di petalonema perstans</i>	Африка, Южная Америка	Полости тела	Кровеносные сосуды	Строгой периодичности нет (небольшой пик ночью)	Толстая капля крови, взятая в ночное время
	<i>Mansonella ozzardi</i>	Южная Америка	Полости тела	Кровеносные сосуды	—	Толстая капля крови, взятая в любое время суток
Микрофилярия с чехликом	<i>Wuchereria bancrofti</i> (периодический штамм)	Африка, Центральная и Южная Америка, Азия	Лимфатические узлы	Кровеносные сосуды	Ночью	Толстая капля крови, взятая в ночное время

<i>Wuchereria bancrofti</i> (субпериодический штамм)	Острова Тихого океана	Лимфатические узлы	Кровеносные сосуды	Строгой периодичности нет (небольшой пик днем)	Толстая капля крови, взятая в дневное время
<i>Brugia malayi</i> (периодический штамм)	Цейлон, Индия, Филиппины и некоторые страны Юго-Восточной Азии	Лимфатические узлы	Кровеносные сосуды	Ночью	Толстая капля крови, взятая в ночное время
<i>Brugia malayi</i> (субпериодический штамм)	Малайзия, Филиппины, Таиланд (лесные, болотистые районы)	Лимфатические узлы	Кровеносные сосуды	Строгой периодичности нет (небольшой пик ночью)	Толстая капля крови, взятая в ночное время
<i>Loa loa</i>	Западная и Центральная Африка	Подкожная клетчатка	Кровеносные сосуды	Днем	Толстая капля крови, взятая в дневное время

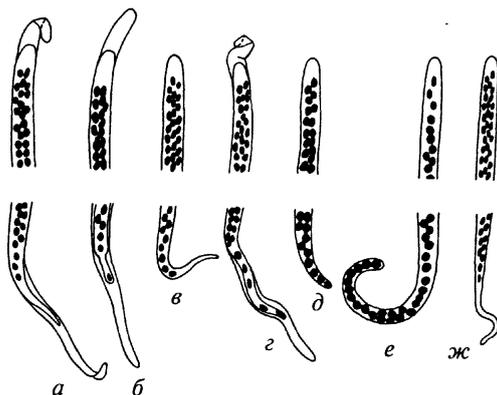


Рис. 10.4. Передние и задние концы микрофилярий:

а — *Wuchereria bancrofti*; *б* — *Brugia malayi*; *в* — *Onchocerca volvulus*; *г* — *Loa loa*; *д* — *Mansonella (Dipetalonema) perstans*; *е* — *Mansonella (Dipetalonema) streptocerca*; *ж* — *Mansonella ozzardi*

При хилурии возможно обнаружение микрофилярий в моче. На поздних стадиях болезни для диагностики вухерериоза используют методы накопления.

Иммунодиагностика при вухерериозе включает применение РСК, РП. Ставят также внутрикожную пробу с антигеном из *Dirofilaria immitis* (филяриаты собак).

При отсутствии микрофилярий в периферической крови определенное диагностическое значение имеет реакция *Мазотти*, которая заключается в том, что у больных филяриатозом после приема небольшого количества (0,1 г) дитразина (диэтилкарбамазина) резко усиливаются аллергические проявления болезни, в частности высыпания на коже. Эта реакция обусловлена гибелью микрофилярий под действием препарата и освобождением соответствующих антигенов.

Географическое распространение: Экваториальная Африка, Индия, Малайзия, Индонезия, острова Тихого океана, Центральная и Южная Америка.

Бругиоз. Бругия — *Brugia malayi* — сходна с возбудителем вухерериоза по морфологии, биологии и патогенному воздействию на организм человека. Диагностика основана на тех же принципах, включает обнаружение возбудителя в крови, серологическое исследование, реакцию Мазотти (см. *Вухерериоз*).

Возбудители бругиоза (их величина 0,22—0,26×0,05 мм) имеют нежный и менее заметный чехлик, чем у вухерерий (см. [цв. вклейку, рис. 42, б](#)), ядерная колонка кончается, не доходя до хвостового конца тела, причем отдельно от колонки и друг от

друга располагаются два терминальных ядра, одно из них — на самой вершине хвостового конца (рис. 10.4, б).

Географическое распространение: страны Азии (Шри-Ланка, Индия, Индонезия, Китай, Япония, Филиппины).

Лоаоз. Возбудитель — *Loa loa* — имеет размеры $0,25—0,30 \times 0,007$ мм и локализуется в подкожной клетчатке, под серозными оболочками, может проникать под конъюнктиву глаз человека.

Для лоаоза характерно наличие у больных своеобразного отека, напоминающего отек Квинке (калабарская опухоль), а также эозинофилии. Мигрирующие под конъюнктиву гельминты хорошо видны невооруженным глазом. Лабораторная диагностика основана на обнаружении микрофилярий в периферической крови, взятой у больного в дневное время (около полудня).

Возбудители лоаоза имеют слабо окрашивающийся чехлик, который менее заметен, чем у вухерерий (см. цв. вклейку, рис. 42, в). Головной конец тела тупой и широкий, ядерная колонка доходит до заостренного хвостового конца, ядра довольно большие, хорошо окрашиваются (рис. 10.4, г).

Иногда с диагностической целью применяют *серологические методы* и ставят *реакцию Мазотти* (см. Вухерериоз). Однако следует учитывать, что при различных филяриатозах эти исследования часто дают перекрестные положительные результаты.

Географическое распространение: страны Центральной и Западной Африки.

Онхоцеркоз. Возбудитель — *Onchocerca volvulus* — локализуется в подкожной клетчатке, а микрофилярии мигрируют в поверхностные слои кожи, ткани глаза.

Типичными проявлениями онхоцеркоза являются: подкожные соединительнотканые узлы (чаще в области ребер, таза, на конечностях вблизи суставов, реже — на голове), зуд, дерматит с депигментацией кожи, лимфаденопатия и лимфатический отек, эозинофилия, конъюнктивит (при поражении глаз) и пр.

Для подтверждения клинического диагноза исследуют срезы кожи на наличие в них микрофилярий (см. подразд. 9.1.7). В передней камере глаза микрофилярий можно обнаружить при исследовании с помощью щелевой лампы, роговичного микроскопа или электроофтальмоскопа, хотя паразиты избегают света, быстро удаляясь от него.

Микрофилярии *O. volvulus* имеют величину $0,2—0,3 \times 0,06—0,09$ мм, не имеют чехлика (см. цв. вклейку, рис. 42, г), хвостовой конец заострен, ядерная колонка не доходит до верхушки тела (рис. 10.4, в).

Географическое распространение: ряд стран Африки, Центральной и Южной Америки.

Дипеталонематоз. Дипеталонема — *Dipetalonema perstans* — паразитирует в брыжейке, забрюшинной клетчатке, печени и пери-

карде человека. У инвазированных лиц развиваются аллергические отеки на конечностях, половых органах по типу калабарской опухоли и другие симптомы, присущие филяриатозам. Нередко наблюдается бессимптомная инвазия.

Личинки дипеталонемы — микрофилярии имеют величину $0,1—0,2 \times 0,005$ мм, не имеют чехлика (см. цв. вклейку, рис. 42, д), хвостовой конец тупой, ядерная колонка доходит до его верхушки, ядра расположены компактно (рис. 10.4, д).

Дигностика дипеталонематоза основана на обнаружении микрофилярий в периферической крови.

Географическое распространение: Экваториальная Африка, Южная Америка, некоторые острова в Карибском море.

Мансонеллез. Мансонелла — *Mansonella ozzardi* — паразитирует у человека под париетальной брюшиной, в брыжейке, вызывая сенсibilизацию организма: лихорадку, зудящий дерматит, отеки, эозинофилию и другие симптомы. Диагностика мансонеллеза основана на обнаружении микрофилярий в периферической крови. У микрофилярий (их размеры $0,2 \times 0,005$ мм) отсутствует чехлик (см. цв. вклейку, рис. 42, е), хвостовой конец заострен, ядерная колонка доходит до его конца (рис. 10.4, ж).

Географическое распространение: ряд стран Центральной и Южной Америки (Мексика, Бразилия, Колумбия, Боливия, Перу и др.), Индия.

10.3.2. Другие нематодозы

Дипеталонематоз (стрептоцеркоз). Возбудитель — *Dipetalonema streptocerca* — весьма сходен с *D. perstans*.

Микрофилярии (личинки) паразита имеют размеры $0,18—0,24 \times 0,003$ мм, чехлик у них отсутствует (см. цв. вклейку, рис. 42, д), хвостовой конец сужен и загнут в виде крючка, ядерная колонка доходит до его верхушки. В области головного конца микрофилярии расположен один ряд ядер (10—12), четыре передних ядра имеют овальную форму (рис. 10.4, е).

Клинические проявления стрептоцеркоза сходны с симптомами онхоцеркоза и дипеталонематоза. Диагностика основана на обнаружении микрофилярий в срезах кожи и крови. Инвазия мало изучена. Встречается в Западной Африке.

Дракункулез. Возбудитель — *Dracunculus medinensis* — имеет струновидное тело, ротовое отверстие треугольной формы, окруженное сосочками. Самка паразита достигает в длину 70—120 см, в ширину — 0,9—1,6 мм (рис. 10.5). Хвостовой конец взрослой самки заканчивается шиловидным придатком, матка заполняет все тело, вульва и кишечник атрофированы, личинки выходят через разрыв стенки вблизи переднего конца тела. Самец *D. medinensis* имеет длину 12—29 мм, ширину — 0,4 мм.

Миграция гельминта в под-кожной клетчатке сопровождается нервно-рефлекторными и токсико-аллергическими проявлениями (зуд, крапивница, одышка, понос, рвота, отек, эозинофилия и пр.). К моменту полового созревания самки ее головной конец приближается к поверхности кожи, где появляется характерный пузырь, который вскоре вскрывается. В центре образовавшейся язвы видна головка гельминта с частью выпавшей матки.

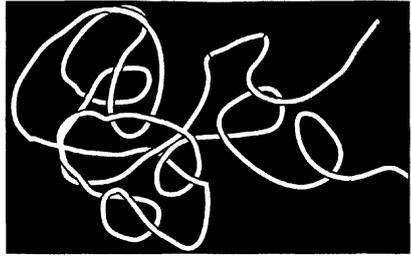


Рис. 10.5. Самка *Dracunculus medinensis*

Диагностика дракункулеза при формировании первичных кожных элементов не представляет трудностей. На ранних стадиях инвазии используется *внутрикожная проба* с экстрактом из зрелого паразита. Обызвестленный гельминт можно обнаружить при рентгенологическом исследовании.

Географическое распространение: Восточная, Центральная и Западная Африка, Саудовская Аравия, Иран, Ирак, Афганистан, Пакистан, Западная и Центральная Индия и др.

Анкилостомидоз. Возбудители анкилостомидоза — кривоголовка двенадцатиперстная, или анкилостома (*Ancylostoma duodenale*) и кривоголовка американская, или некатор (*Necator americanus*). Оба паразита имеют зияющую ротовую полость, ротовая капсула вооружена хитиновыми зубцами (анкилостома) или хитиновыми режущими пластинками (некатор). Дифференциация анкилостомид основана на исследовании морфологии их ротовой капсулы, формы тела, локализации полового отверстия самки и пр. (табл. 10.2).

Возбудители анкилостомидоза паразитируют в верхних отделах тонкого кишечника человека и питаются кровью, вызывая повреждение слизистой оболочки в местах прикрепления. Они выделяют антикоагулянты, поэтому ранки постоянно кровоточат.

Клинически анкилостомидоз проявляется дуоденитом, симулирующим язвенную болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки, или холециститом, гипохромной анемией, аллергической реакцией и другими признаками.

Диагностика анкилостомидоза основана на клинико-эпидемиологических данных, наличии анемии и эозинофилии (особенно в первые 3 мес с момента заражения) и подтверждается исследованием свежего кала. В странах с жарким климатом пробы фекалий для исследования нужно немедленно доставлять в лабораторию, а при задержке доставки использовать консерванты или хранить пробы на холоде.

Для обнаружения яиц анкилостомид в кале используют *метод большого мазка* с изучением под бинокулярным микроскопом и

**Дифференциально-диагностические признаки возбудителей
анкилостомидоза**

Признак	Вид гельминта	
	<i>A. duodenale</i>	<i>N. americanus</i>
Длина тела (мм): самки	9—15	8—13
самца	7—10	5—10
Форма тела	Тело с головным концом изогнуто дорсально	Тело изогнуто вентрально, головной конец обращен дорсально
Длина пищевода, мм	1,3	0,5—0,8
Размеры и вооружение ротовой капсулы	0,21 × 0,19 мм; две пары крупных зубцов, дорсальные зубцы — рудиментарны	0,1 × 0,10 мм; две режущие пластинки, дорсальные зубцы развиты
Локализация полового отверстия у самки	В задней половине тела	В передней половине тела
Хвостовой конец: самки	Имеет острый шип	Без шипа
самца	Снабжен широкой половой бурсой	Снабжен узкой половой бурсой
Спикула	Обе спикулы на концах свободны	Обе спикулы на концах соединены общим крючком

метод Фюллеборна со снятием пленки предметным стеклом (см. подразд. 9.1.1). Оптимальный срок отстаивания в насыщенном растворе хлорида натрия — 10—20 мин, затем число яиц в пленке значительно уменьшается.

Яйца анкилостомы овальной формы с тупо закругленными полюсами и тонкой прозрачной оболочкой, содержат зародыши на стадии бластомеров, бесцветны. Размеры их 50—60 × 34—40 мкм. Если фекалии содержат в тепле около суток и более, то в зародыше может сформироваться рабдитовидная личинка и даже выйти из яйцевой оболочки в кал. Яйцо некатора имеет то же строение, что и яйцо анкилостомы, но несколько длиннее его: 64—76 × 38—40 мкм.

Для исследования кала, длительно хранившегося в жаркое время, можно использовать *метод Бермана* или *метод культивирования личинок на фильтровальной бумаге* (как при стронгилоидозе). В период миграции личинок их можно обнаружить в мокроте.

Рабдитовидные и филяриевидные личинки возбудителей анкилостомидоза весьма сходны с личинками возбудителей стронгилоидоза. При дифференциации рабдитовидных личинок возбудителей анкилостомидоза и стронгилоидоза учитывают величину ротовой полости (у анкилостомид она больше), длину узкого отрезка задней части тела (у возбудителей анкилостомидоза он длиннее), разграниченность отделов пищевода (у возбудителя стронгилоидоза она выражена более резко) и размеры полового зачатка (меньше — у анкилостомид). Для серодиагностики анкилостомидоза наиболее эффективно использование ИФА (некатороз).

Географическое распространение: Южная Европа, Африка, Южная Америка, Индия, Юго-Восточная Азия, Япония, Китай, Австралия, Океания.

Стронгилоидоз. Стронгилоид кишечный, или угрица кишечная, — *Strongyloides stercoralis* — относится к мелким нитевидным нематодам. Размер самок $2,2 \times 0,03$ мм, самцов — $0,7 \times 0,05$ мм. Развитие гельминта протекает со сменой свободноживущего и паразитического поколений. В организме человека самки паразита локализуются в слизистой оболочке верхних отделов тонкого кишечника, здесь же происходит отложение яиц, из которых вскоре выходят рабдитовидные личинки. Поскольку часть рабдитовидных личинок (длина 225—250 мкм, ширина 16 мкм) в просвете кишки превращается в филяриевидные (длина 500 мкм, ширина 17 мкм), внедряющиеся в различные органы и ткани, нередко отмечается гиперинвазия.

Рабдитовидные личинки имеют пищевод с двойным расширением, длина которого составляет 30 % длины тела, у филяриевидных личинок пищевод цилиндрической формы, длина — более 40 % длины тела.

Проявления стронгилоидоза в период миграции личинок обусловлены механическим повреждением тканей и сенсibilизацией организма хозяина. Отмечается дерматит, зуд кожи, астматический бронхит, эозинофилия и др. При паразитировании в тонком кишечнике гельминтов, достигших половой зрелости, отмечаются диспепсические явления, боль в животе, явления дуоденита, холецистита, нарушения функции нервной системы, крапивница, выраженная эозинофилия и пр.

Диагноз стронгилоидоза основан на обнаружении подвижных рабдитовидных личинок в кале и дуоденальном содержимом. Чаще всего с этой целью используется *метод Бермана*. При признаках поражения легких в сочетании с эозинофильным лейкоцитозом исследуют мокроту на наличие личинок угрицы кишечной.

Географическое распространение: Южная Азия, Восточная и Южная Африка, Латинская Америка, реже — Северная Америка, Океания; спорадические случаи стронгилоидоза зарегистрированы в Европе.

Трихостронгилоидоз. Возбудитель трихостронгилоидоза — *Trichostrongylus colubriformis* — волосовидная нематода; размеры самок 5—6×0,08—0,10 мм, самцов — 4,6×0,07—0,09 мм. Форма яиц удлиненная, один полюс слегка заострен, другой — более тупой, их размеры 70—80×40—43 мкм (см. рис. 9.2, л).

В свежих фекалиях яйца гельминта содержат 8—30 бластомеров, при высокой температуре воздуха из зародыша формируется рабдитовидная личинка, которая выходит из яйца в кал. Яйца трихостронгилид сходны с яйцами анкилостом, но отличаются от них величиной, очертаниями и числом бластомеров.

Возбудитель трихостронгилоидоза паразитирует в двенадцатиперстной и тощей кишках, вызывая сенсibiliзацию организма, явления дуоденита и другие нарушения функции желудочно-кишечного тракта. Инвазия нередко сопровождается повышенной возбудимостью, слабостью.

Диагностика основана на обнаружении яиц трихостронгилоидов в кале или дуоденальном содержимом.

Географическое распространение: Япония, Корея, Индонезия, Иран, Ирак, Египет, Чили.

Аскаридоз. Аскарида — *Ascaris lumbricoides* — имеет удлиненное тело бело-розового цвета у самок длиной 24—44 см, шириной 4—6 мм, у самцов — соответственно 12—25 см и 2—4 мм. Хвостовой конец тела у самцов изогнут вентрально. Ротовое отверстие аскариды окружено тремя выступающими губами. Оплодотворенное яйцо имеет овальную форму и толстую многослойную оболочку, причем наружная белковая оболочка крупнобугристая, желто-коричневого цвета. Внутри яйца находится шаровидный бластомер, расположенный центрально (см. цв. вклейку, рис. 43, б). Размеры яиц аскариды 50—70×40—50 мкм. Неоплодотворенное яйцо сильно вытянуто, наружная белковая оболочка темно-желтого цвета, тонкая, мелкобугристая, с отдельными большими выступающими буграми. Яйцо заполнено желточными клетками. При хранении кала в тепле в течение 2—3 дней происходит формирование личинок и выход их из яиц (см. рис. 9.2, и, м).

Период миграции личинок аскарид, оказывающих на организм человека токсико-аллергическое воздействие, клинически проявляется кашлем, явлениями бронхита, иногда с астматоидным компонентом (обусловленными развитием воспалительных очагов и кровоизлияниями в легких), крапивницей, кратковременным лейкоцитозом с эозинофилией и увеличением СОЭ. Половозрелые формы аскарид паразитируют в тонком кишечнике. В этот период преобладает механическое и рефлекторное воздействие гельминта на органы пищеварения, которое приводит к снижению аппетита, появлению тошноты, неустойчивого стула, тяжести и боли в животе и пр. Нередко инвазия протекает бессимптомно. Извращенная локализация гельминта или очень высокая интенсивность

инвазии могут быть причиной развития состояний, требующих хирургического вмешательства (аппендицит, холецистит, абсцесс печени, непроходимость кишечника и др.).

Диагностика аскаридоза на стадии миграции личинок представляет известные трудности. Поставить правильный диагноз помогает рентгенологическое исследование органов грудной клетки (наличие специфических «летучих» эозинофильных инфильтратов в легких), исследование мокроты на наличие личинок аскарид. Длина их достигает 1,5—2,0 мм, при комнатной температуре они малоактивны, но при 35—37 °С становятся подвижными. Для обнаружения личинок готовят большие мазки из свежей мокроты и исследуют их под микроскопом (рис. 10.6).

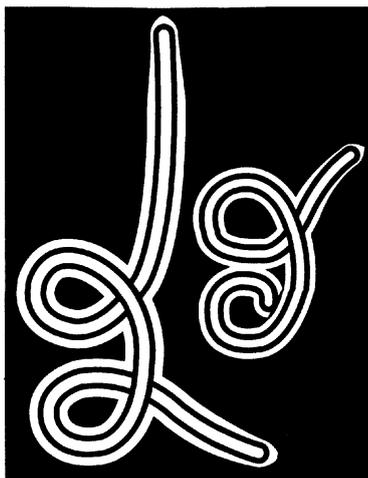


Рис. 10.6. Личинки *Ascaris lumbricoides*, выделенные из легких мыши через 7 дней после заражения ее яйцами аскариды

Диагностика аскаридоза в период паразитирования половозрелого гельминта в тонкой кишке основана на обнаружении яиц аскарид в кале. Для этой цели используют *большой мазок*, который изучают под микроскопом, и *метод Фюллеборна* с растворами аммония нитрата или натрия нитрата, позволяющий обнаружить как оплодотворенные, так и неоплодотворенные яйца (см. подразд. 9.1.1).

Нужно учитывать, что яйца аскарид могут отсутствовать в кале при паразитировании одних самцов, молодых (незрелых) или, наоборот, старых самок.

Географическое распространение: встречается повсеместно в странах умеренного, тропического и субтропического климата, особенно в зоне орошаемых земель и предгорьях.

Трихоцефалез. Власоглав — *Trichocephalus trichiurus* — круглый гельминт, имеющий тело с нитевидным передним концом, который длиннее заднего. Соотношение нитевидной и утолщенной частей тела у самок 2 : 1, самцов — 3 : 2. Задний конец тела самцов свернут спиралью. Длина тела самок 30—55 мм, самцов — 30—45 мм. Яйца власоглава имеют вид бочонков желтовато-коричневого цвета с двумя бесцветными «пробочками» на полюсах. Скорлупа яиц состоит из четырех оболочек. Размеры яиц 50—54 × 23—26 мкм.

Власоглав паразитирует в слепой кишке, при массивной инвазии поражаются и другие отделы кишечника. Патогенное воздей-

ствие гельминта на человека обусловлено особенностями его фиксации к слизистой оболочке кишки, интенсивностью инвазии, индивидуальной реактивностью макроорганизма. Клинически инвазия проявляется недомоганием, диспепсическими явлениями, болью в животе, иногда — анемией.

Диагностика трихоцефалеза основана на выявлении яиц власоглава в кале. Помимо осмотра нативного препарата (мазка), необходимо использовать *методы обогащения*. При исследовании кала по *методу Фюллеборна* (см. подразд. 9.1.1) максимальное количество яиц власоглава всплывает на поверхность солевого раствора при отстаивании в течение 6—24 ч.

Географическое распространение почти такое же, как при аскаридозе, но уступает ему по частоте.

Трихинеллез. Возбудитель — *Trichinella spiralis* — мелкая нитевидная живородящая нематода. Длина самок 2,2—3,6 мм, диаметр 0,60—0,072 мм; длина самцов 1,4—1,6 мм, диаметр 0,033—0,040 мм; длина мышечных трихинелл (личинок) — 1 мм. Трихинеллы половозрелой стадии паразитируют в стенке тонкого кишечника, а личиночной — в исчерченной мышечной ткани многих млекопитающих и человека (рис. 10.7). Взрослые особи и личинки трихинелл обитают в одном и том же организме, который вначале является окончательным, а затем промежуточным хозяином.

Патогенное воздействие трихинелл на человека обусловлено общей сенсibilизацией организма, механическим повреждением зрелыми гельминтами и их личинками стенки кишки, а также миграцией личинок и тканевыми реакциями. Клинически инвазия проявляется повышением температуры тела, появлением отеков, эозинофилией, сильной болью в мышцах, нарушением функции органов кровообращения, поражением нервной системы и пр.

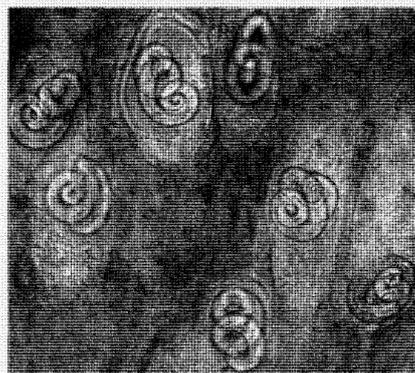


Рис. 10.7. Личинки трихинеллы, окруженные толстой двухконтурной капсулой, в раздавленной мышечной ткани диафрагмы

Диагностика трихинеллеза основана на клинико-эпидемиологических данных и результатах *серологического исследования*. Для подтверждения диагноза трихинеллеза применяются: РСК, РЛА, РЛГ, реакция кольцепреципитации. Высокой чувствительностью и специфичностью отличается ИФА. Антигеном для этой реакции служит экстракт дезинтегрированных личинок.

Географическое распространение: очаги трихинеллеза в природе известны на всех кон-

тинентах, кроме Австралии, заметно преобладание этого паразитоза в северном полушарии.

Энтеробиоз. Возбудитель — *Enterobius vermicularis* — мелкая беловатая нематода с поперечно исчерченной кутикулой. Длина самок 0,9—1,2 см, самцов — 0,5 см. Яйца овальной асимметричной формы, одна сторона их выпуклая, другая — уплощенная. Оболочка яиц гладкая, бесцветная, многослойная, размеры 50—60 × 20—30 мкм (см. цв. вклейку, рис. 43, а).

Острицы, паразитируя в верхнем отделе толстого кишечника, при фиксации к слизистой оболочке повреждают ее и создают условия для вторичной бактериальной инфекции. Они могут быть косвенной причиной аппендицита и тифлита (см. цв. вклейку, рис. 44). Выползание самок для откладывания яиц в область заднего прохода сопровождается сильным зудом. Энтеробиоз проявляется нарушением функции органов пищеварения, токсико-аллергическими и нервно-рефлекторными симптомами.

Диагностика энтеробиоза заключается в обнаружении яиц гельминта в соскобе с кожи в области заднего прохода. Рекомендуется снимать яйца липкой пленкой (*метод Грэхема*). Применим также *метод мазка с ватного тампона*. Единичные тампоны можно пересылать в лабораторию в пенициллиновых флаконах или других подходящих емкостях, а при массовых обследованиях для транспортировки тампонов используются специальные многогнездные штативы.

Энтеробиоз распространен повсеместно, преимущественно среди детей.

Томинксоz. Возбудитель — *Thominx aerophilus* — нитевидная нематода светло-серого цвета, головной конец ее тела утончен. Длина самок 18—20 мм, самцов — 15—18 мм. Яйца паразита бочонковидные, асимметричные, с двумя «пробками» по полюсам, их размеры — 62—72 × 35 мкм.

Возбудитель паразитирует в трахее, бронхах, гортани, носовых ходах, иногда — в легких у пушных зверей, собак, кошек. У инвазированных людей развивается упорный трахеобронхит с астматическим компонентом и отделением слизисто-гношной мокроты. Диагностика основана на обнаружении при микроскопии яиц в мокроте и кале. Исследование проводят *методом Фюллеборна* или *методом большого мазка* (см. подразд. 9.1.1).

Гнатостомоз. Гнатостома — *Gnathostoma spinigerum* — нематода красноватого цвета, кутикула которой снабжена разных размеров шипиками. Размеры самок 25—55 × 3—4 мм, самцов — 10—25 × 1—2 мм. Оплодотворенные яйца несегментированные, оболочка их имеет нежные бороздки и утолщение на одном из полюсов; размеры яиц 62—79 × 36—42 мкм.

Гнатостомы поражают стенку желудка у домашней и дикой кошки, собаки, кабана. У человека описано паразитирование личи-

ночной стадии в подкожной клетчатке с образованием опухолевидных узлов или мигрирующих личинок. Лишь в единичных случаях обнаружены взрослые гельминты. Диагностика гнатостомоза основана на обнаружении личинок в биоптатах соединительнотканых узлов.

Географическое распространение: Таиланд, Индия, Бирма, Малайзия, Япония, Китай.

Токсокароз. Возбудитель — *Toxocaria canis* — нематода, окончательным хозяином которой является собака. Личинки токсокар способны мигрировать во внутренние органы и ткани человека, вызывая разнообразные высыпания на коже, рецидивирующую лихорадку, поражение легких, увеличение печени, эозинофилию. Заболевают преимущественно дети в возрасте 1,5—6 лет. Паразитологическая диагностика возможна при гистологическом исследовании биоптата печени или пунктата периферических лимфатических узлов. Для серологической диагностики токсокароза человека применяют ИФА. В качестве диагностикума для этой реакции используют экскреторно-секреторные антигены личинок гельминта.

РАЗДЕЛ VI

САНИТАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

ГЛАВА 11

ОСНОВЫ САНИТАРНОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

11.1. Санитарно-микробиологическое исследование

Санитарная микробиология — наука о микрофлоре окружающей среды (воды, воздуха, почвы и др.) и связанных с ней процессах, которые могут оказывать неблагоприятное влияние на здоровье людей.

С помощью санитарно-микробиологических исследований решают вопрос о наличии или степени вероятности присутствия опасных для человека микробов или их токсинов в объектах внешней среды (воде, воздухе, почве, пищевых продуктах, лекарствах, различных материалах, оборудовании и др.). Комплексное санитарно-микробиологическое исследование включает: определение *косвенных* показателей неблагополучия — общей микробной обсемененности (микробного числа), титра или индекса санитарно-показательных микробов, степени микробной порчи; реже *прямых* — обнаружение патогенных микробов или их токсинов в объекте.

Микробным числом называют количество микробов в 1 мл жидкости, 1 г твердого вещества или 1 кубометре воздуха. Для определения делают мерные посеvy материала на питательный агар с подсчетом выросших колоний (1 колонию обычно образует 1 клетка). Результат выражают в колониобразующих единицах — КОЕ/мл, КОЕ/г или КОЕ/м³. Если, например, на чашке с посевом 1 мл воды, разведенной 1:1000, выросло 120 колоний, то микробное число составляет $1,2 \cdot 10^5$ КОЕ/мл. В соответствии с принятым стандартом (ГОСТом) водопроводная вода должна иметь микробное число менее 50. Микробное число почвы определяют аналогично после посевов 10-кратных разведений почвенной суспензии.

Санитарно-показательными называют микробы, являющиеся представителями нормальной микрофлоры тела человека и служат показателями санитарного неблагополучия объекта, т. е. его загрязнения выделениями человека. В качестве санитарно-показательных выбраны микробы, отвечающие следующим требованиям:

постоянно и в больших количествах присутствующие в выделениях человека и ограниченного круга теплокровных животных;

не имеющие других природных резервуаров или естественных сред обитания;

сохраняющиеся в объектах в течение определенных сроков, близких к срокам выживания патогенных микробов;

не размножающиеся (интенсивно) в объектах внешней среды;

легко идентифицируемые, поддающиеся количественному определению.

Например, основной показатель *фекального загрязнения* почвы, пищевых продуктов, рук, спецодежды персонала, воды, лабораторной посуды, предметов обихода, лекарственных средств — бактерии группы кишечной палочки (БГКП) или колиформные бактерии. *Воздух* оценивают по содержанию стафилококков и стрептококков, попадающих в него вместе с другими микробами из дыхательных путей и полости рта человека. К СПМ относят также эшерихии, клостридии, энтерококки, колифаги (бактериофаги). В ходе оценки состояния объекта определяют *индекс* — количество СПМ в единице объема (1 литр, 1 г или 1 кубометр) материала или *титр* — наименьший объем (в мл), или весовое количество (в г) материала, в котором еще обнаруживаются санитарно-показательные микробы.

Например, основной показатель фекального загрязнения — колиформные бактерии, их определение проводят в смывах с рук, спецодежды персонала, лабораторной посуды, в нестерильных лекарственных формах, инъекционных растворах и глазных каплях до стерилизации. Воздух оценивают по содержанию золотистого стафилококка, попадающего в него из верхних дыхательных путей, ротовой полости. Его считают показателем капельного загрязнения воздуха. Другими микробами, отражающими санитарное неблагополучие того или иного объекта, являются дрожжевые и плесневые грибы, синегнойная палочка, сальмонеллы.

Точность санитарно-микробиологических исследований обеспечивается: правильным отбором, хранением и транспортировкой проб в лабораторию, использованием стандартных методов, комплексностью исследования и его повторностью.

11.1.1. Вода

Среди объектов, подлежащих микробиологическому контролю, важное место отводится исследованию воды. Микробное загрязнение воды более опасно, по сравнению с химическим, так как при отсутствии у воды органолептических признаков загрязнения могут возникать массовые заражения, имеющие тяжелые последствия. В этой связи, например, для питьевой воды не устанавливают нижнего переносимого предела (ПДК, как принято для химических веществ), а считают, что она должна быть свободна от патогенов.

В соответствии с действующими нормативными документами контролю подлежат:

- вода питьевая (централизованного и местного водоснабжения, т. е. из водопровода, колодцев, родников и скважин);
- вода плавательных бассейнов;
- вода открытых водоемов (из рек, водохранилищ);
- сточные воды;
- вода очищенная для приготовления лекарств;
- вода для приготовления инъекционных растворов и глазных капель.

Предупредительный надзор осуществляют:

- 1) при решении вопросов водоснабжения и канализации населенных территорий;
- 2) при санитарной оценке бассейнов, пляжей, мест коллективного отдыха и т. д.

Текущий санитарный надзор осуществляют:

- 1) при оценке качества питьевого водоснабжения населенных мест;
- 2) при оценке санитарного состояния поверхностных вод для установления степени влияния биологической контаминации на способность воды к самоочищению;
- 3) при контроле над обезвреживанием сточных вод;
- 4) по эпидемическим показаниям для выяснения возможного пути передачи инфекционных заболеваний (проводят обнаружение санитарно-показательных и патогенных микроорганизмов).

Контроль воды осуществляют в соответствии с имеющимися нормативами (табл. 11.1).

Отбор проб. Пробы воды питьевой из разводящей сети городского водопровода отбирают работники центра госсанэпиднадзора. Для отбора проб используют стерильные флаконы емкостью 500 мл с притертой резиновой, корковой или каучуковой пробкой. Предварительно проводят обжигание кранов пламенем горящего тампона, смоченного спиртом, и спускают воду в течение 10—15 мин при полностью открытом кране. Бумажный колпачок с пробкой снимают с флакона непосредственно перед ее заполнением, не касаясь руками горлышка флакона и пробки.

Пробы воды из бассейнов в ходе их эксплуатации отбирают не менее чем в двух точках (глубокой и мелкой части) с 25—30 см от поверхности в количестве одного литра один раз в месяц.

Пробы воды очищенной, используемой для приготовления лекарственных форм (кроме лекарств для инъекций и глазных капель) отбирают в количестве 500 мл в стерильные бутылки, закрытые ватными пробками и бумажными колпачками. Пробы отбирают из бюретки, у которой предварительно обжигают кончик с помощью ватного тампона, смоченного спиртом.

Пробы воды очищенной для приготовления инъекционных растворов и глазных капель отбирают в стерильные флаконы в ко-

Требования к микробиологической чистоте воды

Наименование объекта контроля	Определяемые показатели микробиологической чистоты	Требование	Нормативный документ
Вода питьевая	1. Микробное число (КОЕ/мл) 2—3. Общие и термотолерантные колиформные бактерии (в 3 пробах по 100 мл воды) 4. Колифаги (в 100 мл воды) 5. Споры сульфитредуцирующих клостридий (в 20 мл воды)	Не более 50 Отсутствие « «	СанПиН 2.1.4.559—96
Вода плавательных бассейнов	1. Микробное число (КОЕ/мл) 2. Представители <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> 3. Колифаги (БОЕ/100 мл воды) 4. Патогенные микроорганизмы	Не более 1000 Отсутствие Не более 2 Отсутствие	СанПиН 2.1.2.568—96
Вода очищенная	1. Микробное число (КОЕ/мл) 2. Представители <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Не более 100 Отсутствие	ФС42-2619—97
Вода для инъекционных растворов	Микробное число (КОЕ/мл)	Не более 15 (обеспечивает апиrogenность)	ФС42-2620—97

личестве 20 мл непосредственно из баллона сразу же после перегонки или из сосудов, в которых вода стерилизуется.

Методика исследования. *Общее микробное число.* ОМЧ — количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных бактерий в 1 см³ (1 мл) воды — определяют у всех видов воды. Иссле-

дуемую воду вносят по 1 мл в две стерильные чашки Петри и заливают расплавленным и остуженным питательным агаром (метод глубинного посева). Инкубируют при 37 °С 24 ч, после чего при комнатной температуре еще 24 ч. Подсчитывают на 2-х чашках число выросших колоний (на поверхности и в глубине питательного агара) и рассчитывают среднее арифметическое значение. Для выявления плесневых и дрожжевых грибов исследуемую воду засевают по 0,5 мл на среду Сабуро и инкубируют при комнатной температуре в течение 3—4 сут. Подсчитывают число выросших колоний и также рассчитывают среднее арифметическое. Результат (ОМЧ) вычисляют путем суммирования среднего арифметического числа бактерий, дрожжевых и плесневых грибов и выражают в КОЕ/мл.

Определение колиформных бактерий. Присутствие колиформных бактерий также определяют в воде всех видов. Общие колиформные бактерии — это Гр- аспорогенные палочки, не обладающие оксидазной активностью и сбраживающие лактозу с образованием кислоты и газа при 37 °С в течение 24—48 ч (или сбраживающие глюкозу с образованием кислоты и газа при температуре 37 °С в течение 24 ч). Термотолерантные колиформные бактерии обладают теми же характеристиками, но дополнительно сбраживают лактозу с образованием кислоты и газа при 44,5 °С через 24 ч. Термотолерантные колиформные бактерии быстро отмирают во внешней среде, поэтому их обнаружение свидетельствует о свежем фекальном загрязнении воды.

Для определения колиформных бактерий в питьевой воде и воде очищенной используют метод мембранных фильтров. Исследуемую воду (3 по 100 мл) пропускают через 3 бактериальных фильтра из нитроцеллюлозы, которые затем помещают на среду Эндо и инкубируют при 37 °С 24 ч. Подсчитывают количество выросших на фильтрах лактозоположительных колоний, идентифицированных как колиформные бактерии.

Определение колифагов. Присутствие колифагов (бактериофагов, паразитирующих на *E. coli*) определяют в воде поверхностных источников и питьевой воде, подготовленной из нее, а также в сточных водах. Они являются индикаторами эффективности охраны грунтовых вод и очистки питьевой воды. Исследование проводят методом агаровых слоев по Грациа (см. рис. 1.10 и цв. [вклейку, рис. 12](#)). Для титрования колифагов исследуемую воду смешивают с расплавленным и остуженным питательным агаром, куда вносят также индикаторный штамм *E. coli*. Полученную смесь выливают вторым слоем на питательный агар в чашке Петри и после застывания среды чашку инкубируют при 37 °С 24 ч. В результате индикаторная культура образует равномерный сплошной рост, а при наличии колифагов в этом «газоне» образуются прозрачные блестяшки («негативные колонии» бактериофа-

га). Результат исследования выражают в бляшкообразующих единицах (БОЕ/мл).

Определение спор сульфитредуцирующих клостридий. Присутствие спор сульфитредуцирующих клостридий определяют в воде для оценки эффективности работы сооружений по подготовке питьевой воды. Для этого испытуемую воду вносят в расплавленную и остуженную среду Вильсона — Блера. Среда содержит тиосульфат (гипосульфит) и бесцветную соль железа. В результате прорастания спор, размножения клостридий и восстановления ими сульфита образуется сульфид железа, который придает среде черный цвет.

При использовании воды из поверхностных водоисточников, а также в крупных населенных пунктах питьевую воду исследуют ежедневно. В случае повторного обнаружения колиформных бактерий и/или колифагов проводят определение в воде возбудителей бактериальных и вирусных кишечных инфекций.

Ввиду того что очистка и обеззараживание воды, а также существующие методы санитарно-микробиологического исследования воды по ряду причин могут быть неэффективными, наилучшим способом обеспечения безопасности воды считается охрана водоисточников от микробного загрязнения.

11.1.2. Почва

Знания состава и значения микрофлоры почвы для человека, влияния на нее различных условий необходимы для корректной санитарно-микробиологической оценки почв (в плане ее эпидемиологической безопасности). Санитарно-микробиологическое исследование почвы регламентируется инструкциями по предупредительному и текущему санитарному надзору.

Предупредительный надзор осуществляют:

а) при планировке, строительстве и реконструкции вновь застраиваемых участков и населенных мест;

б) при выборе участков для строительства лечебно-профилактических и аптечных учреждений, санаториев, детских учреждений;

в) при решении вопросов водоснабжения и канализации населенных территорий;

г) при санитарной оценке пляжей, мест коллективного отдыха и т. д.

Текущий санитарный надзор осуществляют:

а) при оценке санитарного состояния почвы и ее способности к самоочищению после загрязнений (например, почву детских садов, больниц, зон отдыха исследуют 2 раза в год);

б) при контроле за почвенными и биотермическими методами обезвреживания сточных вод и отходов (1—4 раза в месяц);

Требования к микробиологической чистоте почв

Категория почвы	Титр БГКП*	Титр нитрифицирующих бактерий	Титр клостридий	Индекс термофильных микроорганизмов**
Чистая	$\geq 1,0$	$\geq 0,1$	$\geq 0,001$	$10^2 - 10^3$
Загрязненная	$0,9 - 0,01$	$0,09 - 0,001$	$0,009 - 0,0001$	$10^3 - 10^5$
Сильно загрязненная	$\leq 0,0009$	$\leq 0,0009$	$\leq 0,00009$	$1 \cdot 10^5 - 4 \cdot 10^6$

Примечание. * — наименьшее количество материала (г), в котором еще обнаруживаются эти СПМ; ** — количество особей СПМ в 1 г исследуемой почвы.

в) по эпидемическим показаниям для выяснения возможного пути передачи инфекционных заболеваний.

При осуществлении текущего санитарного надзора рекомендуется *сокращенный* анализ. Он включает: определение ОМЧ, БГКП, титра строгих анаэробов, термофильных бактерий, нитрифицирующих бактерий. В *полный* санитарно-микробиологический анализ дополнительно входят: определение численности и процентного отношения спор к общему количеству микроорганизмов, количество актиномицетов, грибов, целлюлозоразрушающих микроорганизмов и аммонификаторов, основных групп почвенного микробиоценоза и ряд дополнительных исследований (например, токсичность почв для микроорганизмов). По эпидемическим показаниям в ходе исследований проводят обнаружение патогенных микроорганизмов (табл. 11.2).

Отбор проб. Пробы отбирают с прямоугольного участка размером не менее чем 5×5 м из 5 точек («метод конверта»). При этом в условиях асептики берут с глубины 20—25 см образцы для приготовления смешанной пробы весом 1 кг.

Методика исследования. ОМЧ почвы определяют глубинным посевом (на плотной среде) из 10-кратных разведений или методом прямой микроскопии (по Перфильеву). Если предполагается невысокая степень фекального загрязнения, БГКП в почве определяют методом бродильных проб или методом мембранных фильтров (см. выше); при высокой степени — прямым посевом почвенной суспензии (1 : 10) на среду Эндо. Важным критерием санитарного состояния почвы и ее способности к самоочищению является *перфрингенс-титр* почвы (минимальное количество почвы, в котором еще определяют *Clostridium perfringens*). При фекальном за-

грязнении почвы уже через 4—5 мес эшерихии исчезают, а клостридии обнаруживают в титре 0,01 г. Определяют перфрингенс-титр глубинным посевом на среду Вильсона—Блера из 10-кратных разведений почвенной суспензии. Число термофильных бактерий определяют глубинным посевом на плотные среды с инкубированием при 60 °С в течение суток. Титр нитрифицирующих бактерий определяют посевом из 10-кратных разведений почвенной суспензии на жидкую синтетическую среду Виноградского.

На свежее фекальное загрязнение указывают: обнаружение энтерококков, большое количество БГКП при отсутствии нитрифицирующих бактерий и термофилов, относительно высокое содержание вегетативных форм клостридий. Определение термофильных бактерий помогает оценить загрязнение почвы навозом, компостом или сточными водами и стадию разложения их органического субстрата. Появление нитрифицирующих бактерий указывает на развитие процессов самоочищения. Для более полной оценки процесса самоочищения определяют также группы микроорганизмов, быстро разрушающих органический субстрат: бациллы, актиномицеты, грибы.

11.1.3. Воздух

Санитарно-микробиологические показатели воздуха нормируются в зависимости от типа и назначения помещений (табл. 11.3). Их определяют седиментационным или аспирационным методами.

Таблица 11.3

Допустимые уровни микробной обсемененности воздуха помещений некоторых отделений стационаров

Место отбора проб	Время отбора проб	Результаты исследования		
		Общее количество микробов (КОЕ/м ³)	1 м ³ воздуха	
			на золотистый стафилококк	на грамотрицательные бактерии
Операционный блок	До работы После работы	Не более 100 1000	Отсутствие Отсутствие	Отсутствие Отсутствие
Реанимационное отделение (палаты)	Подготовленные к работе	Не более 1000	Не более 4	Отсутствие
Процедурная	До работы Во время работы	Не более 50 1000	Отсутствие Не более 1—2	Отсутствие Не более 1—2

Методы исследования. *Аспирационный метод* отбора проб — принудительное осаждение микробных частиц из воздуха. Для этого используют, например, пробоотборник аэрозоля бактериологического (ПАБ-1). Принцип его действия основан на электризации частиц исследуемого воздуха и последующем их осаждении на электроде противоположного знака, роль которого играет металлический поддон с питательной средой (расчетная скорость протягивания воздуха 125—150 л/мин). Принцип действия другого прибора — аппарата Кротова — основан на механическом прокачивании воздуха через клиновидную щель в крышке, расположенной над вращающейся поверхностью питательной среды в чашке Петри. При этом происходит инерционное осаждение бактерий из воздуха на поверхность питательной среды (расчетная скорость протягивания воздуха — 25 л/мин, а чувствительность метода ниже, чем при использовании аппарата ПАБ-1). После инкубирования питательной среды подсчитывают количество выросших колоний и выражают обсемененность воздуха в КОЕ (колониеобразующих единицах) на определенный объем исследованного воздуха. В связи с распространением госпитальных инфекций в воздухе больничных помещений, помимо обычных показателей, определяют содержание грамотрицательных бактерий.

Седиментационный метод — осаждение микробов на поверхность плотной питательной среды под действием силы тяжести (гравитации). Открытую чашку Петри с питательной средой ставят на горизонтальную поверхность на высоте рабочего стола и оставляют на определенное время. Затем чашку закрывают и инкубируют в термостате. С помощью этого метода можно ориентировочно определить микробную обсемененность воздуха, используя *формулу Омелянского*: на 100 см² поверхности агара за 5 мин оседают бактерии из 10 л воздуха (10 дм³). Результаты получаются заниженными примерно в 3 раза по сравнению с данными, получаемыми при использовании аппарата Кротова.

Основные показатели санитарного состояния воздуха следующие.

Общее микробное число. ОМЧ воздуха — количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 м³ воздуха (подсчитывают колонии, вырастающие на поверхности питательного агара при посеве определенного объема воздуха и инкубации в течение 24 ч при 37 °С и 24 ч при комнатной температуре).

Присутствие Staphylococcus aureus. В определенном объеме воздуха определяют наличие золотистого стафилококка (воздух засевают на желточно-солевой агар, где вырастают характерные колонии грамположительных кокков, обладающих ферментом плазмокоагулазой).

Присутствие грибов. Определяют наличие в воздухе дрожжеподобных и плесневых грибов — подсчитывают количество коло-

ний, вырастающих на среде Сабуро за 96 ч инкубации при 22—28 °С.

Присутствие патогенных микроорганизмов. По эпидемиологическим показаниям в воздухе определяют наличие сальмонелл, микобактерий, вирусов.

В соответствии с «Методическими указаниями по микробиологическому контролю в аптеках» (МЗ СССР, 1985 г.) плановые исследования воздуха на общую бактериальную обсемененность, стафилококк и грибы проводятся не реже четырех раз в год.

11.1.4. Пищевые продукты

Гигиенический контроль пищевых продуктов предусматривает их оценку по следующим показателям:

величине общей микробной обсемененности (ОМЧ);

наличию БГКП;

присутствию условно-патогенных бактерий (кишечной палочки, золотистого стафилококка, антракоидной палочки, протеев, клостридий);

наличию патогенных микроорганизмов (сальмонелл и др.);

присутствию специфических возбудителей микробной порчи продукта.

Основными показателями качества продуктов являются *ОМЧ* и *наличие патогенных микроорганизмов*. Обнаружение последних ввиду трудоемкости проводят лишь при первичной обработке мяса и анализе мясных продуктов, молока (не всегда), а также при контроле консервного производства. Для различных групп пищевого сырья и продуктов питания действуют соответствующие стандарты (ГОСТы) и критерии санитарного благополучия, а в случае их отсутствия придерживаются гигиенических требований к качеству. Обычно при этом нормируется масса (вес) продукта, в котором не допускается присутствие БГКП, условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, а также указывается допустимое микробное число продукта, в КОЕ/г(мл).

Отбор проб. Жидкие продукты отбирают стерильной пипеткой или половником, сыпучие — стерильной мешалкой или ложкой (то и другое после тщательного перемешивания). Из кусковых продуктов образцы вырезают стерильным ножом в объеме (массе), достаточном для анализа.

Методика исследования. Перед проведением исследования пробы гомогенизируют и готовят их серийные разведения (1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000 и т. д.). Для получения гомогенных суспензий исследуемого материала иногда используют ИХН с добавлением твина-80 или 0,1%-ю пептонную воду.

Определение общей микробной обсемененности. ОМЧ определяют у тех продуктов и блюд, которые не должны содержать специфици-

ческих микроорганизмов (не исследуют кисломолочные продукты, квашения и т. п.). Методики исследования жидких и плотных продуктов такие же, как для воды и почвы соответственно, но посевы инкубируют при 30 °С в течение 72 ч.

Определение БГКП (см. выше).

Определение Staphylococcus aureus. Определенное количество исследуемого материала засевают для накопления стафилококков в солевой бульон, например: 1 мл(г) в пробирку с 5 мл среды, инкубируют при 37 °С в течение 24 ч. При наличии роста (помутнении среды) делают высевы на желточно-солевой агар для получения изолированных колоний, которые затем идентифицируют по культуральным свойствам, морфологии (в мазке по Граму), ферментации глюкозы и маннита, наличию плазмокоагулазы.

Определение других условно-патогенных микроорганизмов. Другие УПМ также определяют микробиологическим методом (с использованием соответствующих накопительных и дифференциально-диагностических сред).

Определение сальмонелл. Гомогенизированную навеску продукта (обычно 25,0 г) вносят в среду обогащения (селенитовый бульон) и инкубируют при 37 °С.

Через сутки делают высевы на плотные дифференциальные среды (висмут-сульфитный агар) и идентифицируют подозрительные культуры по биохимическим и другим признакам.

Исследование консервов. Особым объектом санитарно-микробиологического исследования являются консервы. Эти продукты герметично укупорены, прошли обработку тепловыми или комбинированными методами и предназначены для длительного хранения (в том числе при комнатной температуре). Если в продукте были термостойкие споры некоторых бацилл или клостридий, промышленная стерильность консервов может не достигаться и такой продукт становится небезопасным для здоровья. Среди остаточной флоры консервов могут быть также лактобактерии, дрожжевые и плесневые грибы, способные к вегетации и порче продукта. В зависимости от величины рН и режима тепловой обработки выделяют несколько групп консервированных продуктов, для каждой из которых предусмотрены свои направления санитарно-микробиологического исследования с определением:

- промышленной стерильности;
- специфических возбудителей микробной порчи;
- патогенных микроорганизмов (по эпидпоказаниям).

Перед исследованием осматривают упаковку (вскрывшиеся консервы на промышленную стерильность не исследуют). Для стимуляции размножения мезо- и термофильной флоры консервы термостатируют при соответствующей температуре 3—7 сут. После вскрытия содержимое упаковки исследуют микробиологическим методом в соответствии с действующими инструкциями. В несте-

**Требования к микробиологическим показателям
некоторых пищевых продуктов**

Вид продукта	Микробиологические критерии доброкачественности				
	ОМЧ (КОЕ/г(мл))	Количество продукта, в котором не допускается присутствие бактерий			
		БГКП	<i>S. aureus</i>	Клостридий	Патогенных (в том числе сальмонелл)
Молоко сырое (высший сорт)	$3 \cdot 10^5$	—	—	—	—
Молоко пасте- ризованное (А)	$5 \cdot 10^4$	1 см ³	1 см ³	—	—
Кисломолоч- ные напитки	—	—	1 см ³	—	—
Мясо заморо- женное	$1 \cdot 10^4$	0,01 г	—	—	—
Колбасные из- делия вареные	$1 \cdot 10^3$	1 г	1 г	0,01 г	25,0 г

рильных консервах определяют ОМЧ, выявляют наличие лактобактерии, бацилл группы *Bacillus subtilis*, клостридий, кокков, дрожжевые и плесневые грибы (в зависимости от продукта).

Поскольку химический состав продуктов и способы консервирования, а также их исходная и остаточная микрофлора весьма переменчивы, существенно отличаются и критерии доброкачественности разных консервов. Так, в газированных напитках ОМЧ не должно превышать 50 и в 1 мл не допускается наличие лактобактерий и дрожжей, а в квашеной капусте и фруктовых консервах с рН менее 3,8 недопустимо присутствие кокков, дрожжевых и плесневых грибов. Основные показатели качества пищевых продуктов приведены в табл. 11.4.

11.2. Санитарный режим лечебно-профилактических учреждений

Лечебно-профилактические учреждения (ЛПУ) — больницы, родильные дома, лечебно-диагностические стационары и центры — ввиду своих особенностей представляют угрозу возникновения и распространения внутрибольничных инфекций (ВБИ). К факторам, способствующим распространению ВБИ, относят: большую концентрацию восприимчивых к инфекции лиц при их круглосуточном пребывании в стационаре, множество специфических

путей перемещения микроорганизмов во время лечебно-диагностических процедур и ухода за больными (руки персонала, приборы, инструменты и др.), применение средств и воздействий, ослабляющих антиинфекционную защиту пациентов, нерациональное применение антимикробных средств. Наибольший риск возникает при переливании крови и проведении так называемых инвазивных манипуляций (операций, инъекций, катетеризаций и др.), связанных с повреждением естественных барьеров кожи и слизистых оболочек. При распространении ВБИ в эпидемический процесс могут включаться как пациенты, так и лица из числа персонала. Для сведения к минимуму возможности возникновения и распространения ВБИ в учреждениях необходимо поддерживать санитарный режим.

11.2.1. Режимные мероприятия в ЛПУ

Санитарный режим ЛПУ включает:

организационные меры (контроль за режимом поступления, пребывания и выписки пациентов, за службой крови и ее препаратов, за назначением инвазивных манипуляций и антимикробных средств, за режимом стерилизации и дезинфекции в ЛПУ);

медицинские осмотры и обследование персонала (при поступлении на работу и периодические профилактические): на возбудителей венерических инфекций, золотистый стафилококк, патогенные энтеробактерии (результаты осмотров заносят в индивидуальную санитарную книжку);

работу только в спецодежде, соответствующей выполняемым операциям (для работы в асептических условиях необходим комплект стерильной одежды);

соблюдение сроков хранения стерильного материала (см. подразд. 12.1.4);

соблюдение правил личной гигиены;

влажную уборку помещений (оборудования, стен, полов) с применением дезинфицирующих средств;

дезинфекция ультрафиолетом воздуха в операционном блоке, перевязочных и др.;

соблюдение правил использования дезинфицирующих и антисептических средств (в том числе сроков хранения);

дезинфекцию использованных материалов (см. подразд. 12.1.3);

проведение санитарно-микробиологических исследований.

Для предупреждения ВБИ в плане текущего надзора проводятся санитарно-микробиологические исследования: рук хирургов, кожи операционного поля, перевязочного и шовного материала, инструментов, воздуха, поверхностей оборудования. Обязательному исследованию подлежат специфические устройства, расположенные в операционном зале, наркозной, пред- и послеопера-

ционной палатах, перевязочной, а также в палатах интенсивной терапии и реанимации, кабинетах физиотерапии и лечебной физкультуры. В акушерских стационарах обязательно обследуют родильные залы, операционный блок, послеродовые и детские палаты, комнаты пастеризации и хранения грудного молока. Важными направлениями является контроль стерильности изделий медицинского назначения и обследование персонала на микробоносительство. Конкретными объектами контроля, например, являются: тазы и щетки для мытья рук хирургов, перчатки, зонды, катетеры, кровать, подготовленная для оперированного больного, ларингоскоп, дыхательный мешок, кушетка для перевязок, халат и рабочий стол медсестры, термометры, лекарственные формы для инъекций, для ухода за кожей новорожденных, внутренняя поверхность холодильника для хранения лекарств и др. Контролируют также качество уборки и дезинфекции помещений.

В плане самоконтроля лаборатории ЛПУ проводят санитарно-микробиологические исследования 1—4 раза в месяц, лаборатории центров госсанэпиднадзора — 2—4 раза в год и внепланово (по эпидпоказаниям, в случае санитарного неблагополучия).

Контроль стерильности изделий медицинского назначения описан в подразд. 12.1.4. Смыть с рук берут у всех участвующих в операции; исследование проводят, как указано выше. Для выявления носителей золотистого стафилококка персонал хирургических и акушерских отделений, а также отделений реанимации и интенсивной терапии обследуют 1 раз в квартал. Материал из передних отделов обеих половин носа берут стерильным сухим или увлажненным тампоном и непосредственно засевают штрихами на поверхность желточно-солевого агара в чашке Петри (вращая тампон). В другом варианте на ту же среду засевают, растирая шпатель, 0,1 мл из 5 мл ИХН, в котором в течение 10 минут отмывали тампон. После инкубирования среды подсчитывают количество колоний, образованных *Staphylococcus aureus* (по культуральным и морфолого-физиологическим признакам). Повторное выделение этих микроорганизмов в высокой концентрации (10^3 КОЕ в 1 мл и более) свидетельствует о микробоносительстве. Для санации микробоносители проходят специальные процедуры с применением антимикробных воздействий.

11.2.2. Санитарно-микробиологическое исследование оборудования, рук и спецодежды персонала

Отбор проб. С рабочих столов, весов, посуды, тары для хранения материала, оборудования, рук и спецодежды персонала пробы отбирают методом смыва стерильным ватным тампоном, помещенным в пробирки со стерильным ИХН или пептонной во-

дой. При отборе проб с крупных плоских поверхностей (столы, халаты и т.д.) используют проволочную рамку-шаблон площадью 100 см². Перед взятием пробы шаблон фламбируют, а тампоны увлажняют. Для проведения смывов с рук увлажненным ватным тампоном (или марлевой салфеткой, 5 × 5 см) протирают руки обследуемого, начиная с менее загрязненных участков кожи: тыльную часть ладони, ладонь, межпальцевые поверхности, ногтевые ложа и подногтевые поверхности. Перед исследованием смывную жидкость с тампоном или салфеткой встряхивают в течение 10 мин для десорбции микроорганизмов и далее смывную жидкость используют для посева.

Методика исследования. *Определение БГКП* (см. выше).

*Определение *Staphylococcus aureus*.* 1 мл смывной жидкости засевают в пробирку с 5 мл солевого бульона, инкубируют в термостате при 37 °С в течение 24 ч (далее, как в разделе по исследованию пищевых продуктов).

Требования к микробиологической чистоте: присутствие БГКП, синегнойной палочки, протеев, стафилококка в смывах не допускается.

ГЛАВА 12 АНТИМИКРОБНЫЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ

12.1. Чувствительность микроорганизмов к физическим и химическим воздействиям

На практике нередко требуется контролировать нежелательный микробный рост, ограничивая его появление и скорость, частично или полностью уничтожая микроорганизмы во внешней среде или в/на живых тканях. Для этого используют физические, химические, биологические или комплексные воздействия на микроорганизмы. Эффект от таких воздействий может быть *микробицидным* (гибель микроорганизмов), *микробостатическим* (прекращение их роста и размножения) или *литическим* (разрушение микробных клеток).

В зависимости от характера и целей антимикробного воздействия различают:

стерилизацию — полное уничтожение в/на объектах жизнеспособных микроорганизмов и их спор (обеспложивание объектов);

дезинфекцию — уничтожение в/на объектах патогенных микроорганизмов (обеззараживание объектов);

антисептику — уничтожение или ограничение роста микроорганизмов в/на живых тканях;

дой. При отборе проб с крупных плоских поверхностей (столы, халаты и т.д.) используют проволочную рамку-шаблон площадью 100 см². Перед взятием пробы шаблон фламбируют, а тампоны увлажняют. Для проведения смывов с рук увлажненным ватным тампоном (или марлевой салфеткой, 5 × 5 см) протирают руки обследуемого, начиная с менее загрязненных участков кожи: тыльную часть ладони, ладонь, межпальцевые поверхности, ногтевые ложа и подногтевые поверхности. Перед исследованием смывную жидкость с тампоном или салфеткой встряхивают в течение 10 мин для десорбции микроорганизмов и далее смывную жидкость используют для посевов.

Методика исследования. *Определение БГКП* (см. выше).

*Определение *Staphylococcus aureus*.* 1 мл смывной жидкости засевают в пробирку с 5 мл солевого бульона, инкубируют в термостате при 37 °С в течение 24 ч (далее, как в разделе по исследованию пищевых продуктов).

Требования к микробиологической чистоте: присутствие БГКП, синегнойной палочки, протеев, стафилококка в смывах не допускается.

ГЛАВА 12 АНТИМИКРОБНЫЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ

12.1. Чувствительность микроорганизмов к физическим и химическим воздействиям

На практике нередко требуется контролировать нежелательный микробный рост, ограничивая его появление и скорость, частично или полностью уничтожая микроорганизмы во внешней среде или в/на живых тканях. Для этого используют физические, химические, биологические или комплексные воздействия на микроорганизмы. Эффект от таких воздействий может быть *микробицидным* (гибель микроорганизмов), *микробостатическим* (прекращение их роста и размножения) или *литическим* (разрушение микробных клеток).

В зависимости от характера и целей антимикробного воздействия различают:

стерилизацию — полное уничтожение в/на объектах жизнеспособных микроорганизмов и их спор (обеспложивание объектов);

дезинфекцию — уничтожение в/на объектах патогенных микроорганизмов (обеззараживание объектов);

антисептику — уничтожение или ограничение роста микроорганизмов в/на живых тканях;

деконтаминацию — удаление микробного загрязнения объекта до безопасного уровня;

консервацию — предотвращение роста и размножения микроорганизмов в/на объектах.

Чувствительность микроорганизмов к тем или иным воздействиям определяется рядом факторов: структурно-функциональными особенностями микроорганизма и его физиологическим состоянием, силой и продолжительностью воздействия, наличием сопутствующих факторов, усиливающих или ослабляющих антимикробную активность. Наибольшей устойчивостью к различным воздействиям обладают споры бактерий, что объясняется их особым строением (толстая оболочка, гелеподобная концентрированная протоплазма, наличие дипиколиновой кислоты, высокое содержание кальция при пониженном содержании воды) и тем, что у спор практически отсутствует метаболизм. Повышенная устойчивость микробактерий туберкулеза обусловлена высоким содержанием в их клетках липидов и воска. Следует отметить, что одно и то же воздействие может быть антимикробным в отношении одних микроорганизмов и в то же время стимулировать рост и размножение других. Так, кислород губителен для анаэробов, но стимулирует рост аэробных микроорганизмов, а применение антибактериальных антибиотиков может способствовать росту грибов.

12.1.1. Действие физических факторов

Фильтрация. Фильтрация является механическим методом освобождения жидкостей и газов от микроорганизмов. С целью сохранения стерильности жидкостей флаконы и пробирки, а также пипетки, в которые помещают такие жидкости, закрывают ватными пробками. Для предотвращения заражения через воздух, например, в хирургических стационарах используют ватно-марлевые повязки и специальную одежду. Фильтрование применяют для стерилизации воздуха, например, с целью создания условий строгой стерильности при работе в ламинарном боксе или в помещениях, где находятся ослабленные (иммунодефицитные) больные. Для удаления микробов из жидкостей обычно применяют мембранные фильтры с диаметром пор менее 0,2 мкм, однако многие фильтры не задерживают вирусы, микоплазмы и другие мельчайшие микроорганизмы.

Высушивание. Высушивание губительно действует на микробов, однако разные виды отличаются по чувствительности. Так, холерный вибрион погибает через 48 ч, а возбудитель туберкулеза — через 70 дней. Длительно сохраняются микробы в высохших пленках из гноя, крови или мокроты (месяцами). Высушивание практически не действует на споры. В процессе высушивания клетка лишается воды, происходит инактивация ферментных систем, что

в конечном итоге ведет к гибели микроба. Высушивание применяют в медицине: в сухом виде хранят лекарственное сырье, многие лекарства. Широко применяется *лиофильная сушка* — быстрая заморозка и высушивание из замороженного состояния в вакууме. В этом случае вода переходит из кристаллического состояния в парообразное, минуя жидкую фазу, и жизнеспособность микробов сохраняется; срок годности живых вакцин и других иммунобиологических препаратов увеличивается до 1 г и более.

Лучистая энергия. Ультрафиолет и ионизирующее излучение непосредственно действуют на нуклеиновые кислоты в клетке, вызывая смертельные мутации, или приводят к образованию свободных радикалов, вызывающих инактивацию ферментных систем и разрушение клеточных структур. Солнечный свет, особенно его коротковолновая часть спектра, оказывает выраженное бактерицидное действие. УФО используют в медицине для обработки (дезинфекции) воздуха и поверхностей в операционных, родильных домах и отделениях, асептических помещениях аптек, в бактериологических лабораториях. Для этих целей в помещениях устанавливают бактерицидные облучатели с длиной волны 260—300 нм. Волны 260 нм максимально поглощаются ДНК, что приводит к образованию димеров тимина и соответственно к летальным мутациям. Вместе с тем УФО обладает низкой проникающей способностью и оказывает антимикробное действие только на поверхностях или в прозрачных растворах. Ионизирующее излучение (чаще γ -лучи изотопов ^{60}Co или ^{137}Cs) используют для стерилизации термочувствительных материалов, например изделий из пластика. Обладая высокой проникающей способностью, этот вид электромагнитных волн приводит к потере электронов и образованию из атомов ионов, появлению свободных радикалов, которые могут приводить к полимеризации и другим химическим реакциям, сопровождающим разрушение химических структур микроорганизмов, а также появлению токсичных перекисных соединений. Чувствительность микроорганизмов к ионизирующему излучению сильно варьирует (например, облучение микобактерий туберкулеза дозой 0,14 мегарад приводит к такому же эффекту, как облучение возбудителя полиомиелита дозой 3,8 мегарад).

Ультразвук. Ультразвук вызывает гибель микроорганизмов в суспензиях: в микробной клетке образуются кавитационные полости с резкими перепадами разрежения и избыточного давления, что приводит к разрушению клетки. Этот метод используют для очистки (деконтаминации) медицинских инструментов, обеззараживания некоторых жидких препаратов, питьевой воды, молока, соков, а также для получения компонентов микробной клетки для исследований или в ходе биотехнологического производства.

Температура. Температура ниже 0°C не оказывает губительного действия, однако у микробов прекращается рост и размножение.

Некоторые вирусы сохраняются при -270°C . Лекарственное сырье, многие лекарственные и иммуно-биологические препараты, а также пищевые продукты хранят при температуре от 0°C до $+10^{\circ}\text{C}$ (температура бытового холодильника). При этой температуре резко замедляется метаболическая активность и размножение большинства микроорганизмов (исключение составляют *психрофильные* и *психротрофные* микроорганизмы). Разрушение и гибель части микробных клеток вызывают повторное замораживание и оттаивание материалов. Высокие температуры губительны для микробов, однако разные виды обладают неодинаковой чувствительностью. Так, менингококки гибнут уже при комнатной температуре, возбудитель сифилиса — при $+40^{\circ}\text{C}$, возбудитель дизентерии — при $+60^{\circ}\text{C}$, бруцеллы — при $+100^{\circ}\text{C}$. Споры бактерий погибают лишь через 2—3 ч кипячения. При температурах выше $+60^{\circ}\text{C}$ в обычных условиях происходит денатурация белка, ведущая к инаktivации ферментов и разрушению микробных структур.

12.1.2. Действие химических факторов

Различные химические вещества, обладающие антимикробным действием, в зависимости от его спектра и активности могут обозначаться разными терминами. Вещества, убивающие микроорганизмы, называют *микробицидами*: бактериоциды, фунгициды, вирулициды, спороциды, альгициды (действуют соответственно на бактерии, грибы, вирусы, споры бактерий, водоросли). Если вещества подавляют рост и размножение микроорганизмов, их называют, например, *бактериостатиками* или *фунгиостатиками* (*микостатиками*).

В зависимости от целей применения антимикробные вещества подразделяют на несколько групп:

антибиотики (вещества, которые в малых концентрациях специфически подавляют размножение или вызывают гибель определенных групп микробов и опухолевых клеток);

антисептики (вещества, вызывающие гибель широкого круга микроорганизмов или предотвращают их размножение в/на тканях организма);

дезинфектанты (вещества, уничтожающие микробов в/на объектах внешней среды);

консерванты (вещества, препятствующие размножению микробов в пищевых продуктах, косметических средствах и других объектах).

Для антибиотиков и других химиотерапевтических препаратов характерна специфичность и избирательность действия на микроорганизмы (см. подразд. 1.2.5). Антисептики и дезинфектанты, как правило, обладают неспецифическим (общетоксическим) действием на широкий круг микроорганизмов. Эти различия в анти-

микробном действии обусловлены химическим строением веществ и отражаются в величине их действующих доз: у химиотерапевтических препаратов тот же эффект наблюдается при концентрациях в 100—1000 раз меньших, чем у других антимикробных средств.

Различают несколько групп антимикробных средств, для каждой из которых характерны строение или особенности их действия на микроорганизмы.

Фенолы. Эти вещества денатурируют белки, повреждают клеточные мембраны и используются в качестве дезинфектантов, а некоторые их нетоксичные для тканей производные (гексахлорофен и др.) — для антисептики.

Галогены. Препараты хлора, иода являются окислителями или галогенизируют белки (иод соединяется с остатками тирозина). Хлорирование широко применяется для дезинфекции воды и других объектов, а иодосодержащие препараты — в качестве антисептиков.

Спирты. 70%-й водный раствор этанола и другие спирты растворяют липиды и денатурируют белки. Они обладают бактерицидным и фунгицидным действием, но малоэффективны в отношении спор и некоторых вирусов. Обычно их используют для целей дезинфекции и антисептики.

Поверхностно-активные вещества. Группа ПАВ включает мыла и детергенты, которые обеспечивают механическое удаление микроорганизмов с поверхностей кожи и объектов внешней среды. Катионные детергенты, включая четвертично-аммониевые соединения (ЧАС), обладают антимикробной активностью — они взаимодействуют с фосфолипидами мембран, нарушая их функции. Применяют для дезинфекции и антисептики.

Соли тяжелых металлов. Соли серебра, меди, ртути, цинка используются для дезинфекции и антисептики. Так, ионы серебра и меди преципитируют белки, а ионы ртути взаимодействуют с сульфгидрильными (SH—) группами белков, блокируя их.

Красители. Бриллиантовый зеленый и некоторые другие красители взаимодействуют с нуклеиновыми кислотами, нарушая их функции. Их используют в качестве антисептиков.

Окислители. Перекись водорода, озон, перманганат калия повреждают ферментные системы. Их используют для целей деконтаминации, дезинфекции и антисептики. В некоторых случаях они могут выступать в качестве стерилиантов (уничтожают в том числе споры бактерий, что обеспечивает стерилизующий эффект)

Кислоты и щелочи. Эти вещества также обладают антимикробной активностью. Органические кислоты (бензойная, салициловая, молочная, аскорбиновая, пропионовая) широко применяются в качестве консервантов в пищевой и фармацевтической промышленности. Иногда их используют для антисептики.

Альдегиды. Глютаровый и другие альдегиды обладают выраженным антивирусным действием и используются для деконтаминации и дезинфекции.

Активность многих антимикробных средств (дезинфектантов, антисептиков) выражают через *феноловый коэффициент*. Для определения фенолового коэффициента в параллельных рядах готовят серийные разведения фенола и испытуемого вещества. Затем в каждый ряд разведений вносят определенное количество тест-культуры (микроорганизма с известной чувствительностью к фенолам) и определяют антимикробное действие (по отсутствию роста тест-культуры). Феноловый коэффициент рассчитывают как отношение МИК испытуемого вещества к МИК фенола.

12.1.3. Дезинфекция

Дезинфекция — это комплекс мероприятий, направленных на уничтожение на/в объектах конкретных патогенных микробов. После дезинфекции могут сохраняться непатогенные микробы или их споры. В медицине применяют физические и химические методы дезинфекции.

Физические методы. Физический метод дезинфекции прост, надежен, экологически чист и безопасен для персонала, поэтому, если позволяют условия, этому методу следует отдавать предпочтение. К физическим методам дезинфекции относят: 1) механические (вытряхивание, проветривание, влажная уборка, стирка с моющим средством); 2) действие высокой температуры (проглаживание утюгом, кипячение, пастеризация); 3) УФО (облучение бактерицидными лампами).

Кипячение. Кипячение в дистиллированной воде используют для дезинфекции изделий из стекла и металла, термостойких полимеров и резины. Экспозицию (не менее 30 мин) выдерживают, начиная с момента закипания воды при полном погружении изделий, а при кипячении в воде с 2 % бикарбоната натрия (содой) время экспозиции — не менее 15 мин.

Пастеризация. Пастеризация — это однократное кратковременное прогревание при температуре ниже 100 °С с последующим быстрым охлаждением. Прогревание проводят при 65—95 °С от 30 с до 2 мин, что ведет к частичному обезплодотворению объектов. Как и кипячение, пастеризация не является методом стерилизации. После пастеризации сохраняются живыми споры и часть вегетативных форм, поэтому пастеризованный продукт (молоко, соки и т.д.) хранят в холодильнике.

Облучение ультрафиолетом. УФО (облучение бактерицидными лампами) используют в медицине для обработки воздуха и поверхностей в операционных, родильных домах и других помещениях лечебно-профилактических учреждений. Расчет необходимо-

го количества бактерицидных облучателей и времени экспозиции ведут, исходя из кубатуры помещения и характера микробной контаминации.

Химические методы. При дезинфекции химическим методом применяют следующие дезинфицирующие вещества:

хлорсодержащие препараты (хлорная известь, хлорамин Б, гипохлорит кальция, гипохлорит натрия, получаемый электрохимическим путем и др.);

окислители (перекись водорода с моющим средством и без него, перманганат калия);

фенолы (карболовая кислота, лизол);

иод и иодофоры (иод + ПАВ);

соли тяжелых металлов (сулема, диоцид, мертиолят);

поверхностно-активные вещества — ПАВ (сульфанол);

четвертичные аммониевые соединения (мирамистин, роккал, бензалкония хлорид и др.);

спирты (70 % этанол);

формальдегид (формалин);

красители (бриллиантовый зеленый, метиленовый синий);

кислоты (салициловая, борная и др.);

альдегиды (глютаровый).

Выбор метода дезинфекции определяется устойчивостью конкретных микроорганизмов, контаминировавших объект, а также свойствами самого объекта. По устойчивости к действию дезинфицирующих средств в настоящее время выделяют 5 групп возбудителей инфекций: вирусных, бактериальных, туберкулеза, кандидоза, дерматомикозов. В зависимости от направления дезинфекции могут быть использованы различные вещества, разные концентрации одного и того же вещества или время экспозиции. Различные методы и режимы дезинфекции применяют для изделий из стекла, металлов, пластмасс, резин, эндоскопов и сложной техники, стоматологических инструментов. Например, если проводится дезинфекция изделий из коррозионно-стойкого металла, контаминированных микобактериями туберкулеза, используют 5%-й раствор хлорамина с экспозицией 240 мин, а если другими бактериями — используют 1%-й раствор и время экспозиции сокращают до 30 мин.

Контроль эффективности дезинфекции. Контроль текущей и заключительной дезинфекции в очагах кишечных инфекций основан на обнаружении в исследуемом материале кишечной палочки (этот микроб постоянно находится в выделениях больных и по устойчивости близок к возбудителям кишечных инфекций). После проведения дезинфекции в исследуемом материале кишечная палочка должна отсутствовать.

Для контроля работы дезинфекционных камер используют эталонные культуры, например: стафилококк — при обработке вещей из очагов инфекций, вызванных неспорообразующими мик-

роорганизмами, споры антракоидной палочки — при дезинфекции вещей из очагов инфекций, вызванных спорообразующими микробами.

О качестве проведенной дезинфекции изделий медицинского назначения судят по отсутствию золотистого стафилококка (*S. aureus*), синегнойной палочки (*P. aeruginosa*) и БГКП. Для этого методом смывов исследуют 1 % (не менее 3—5 единиц) одновременно обработанных изделий одного наименования. По 0,1 мл смывов, взятых марлевыми салфетками (5 × 5 см), наносят на поверхность желточно-солевого, кровяного агаров и среды Эндо и инкубируют засеянные чашки при 37 °С. Дезинфекцию считают эффективной, если через 48 ч на чашках не вырастают колонии указанных микроорганизмов.

Дезинфекция, предстерилизационная очистка и стерилизация изделий медицинского назначения являются важнейшим комплексом мер, препятствующих возникновению и распространению ВБИ среди больных и персонала.

Предстерилизационная очистка изделий медицинского назначения. Очистку таких изделий осуществляют ручным или механизированным (с применением ультразвука) методом после их дезинфекции и последующего отмывания остатков дезинфицирующих средств питьевой водой. Если средство одновременно обладает моющим и антимикробным действием, допускается совмещение в одном процессе дезинфекции и предстерилизационной очистки. Для очистки используют различные химические вещества, кипячение, замачивание, ершевание, тампоны, салфетки, струйный метод. Разъемные изделия очищают в разобранном виде, тщательно очищают каналы и полости изделий. После очистки изделия ополаскивают и высушивают. Режимы очистки и высушивания определяются видом изделия и характером загрязнения. Контроль качества очистки проводят центры ГСЭН и дезинфекционные станции (не реже одного раза в квартал), а в качестве самоконтроля — централизованные стерилизационные (не реже одного раза в неделю). При этом проверяют не менее 1 % изделий (трех единиц), обработанных за смену.

Качество очистки оценивают путем постановки амидопиридиновой (азопирамовой) пробы на остаточные количества крови и фенолфталеиновой пробы на остатки щелочных компонентов моющих средств. При положительном результате той или иной пробы всю группу изделий подвергают повторной очистке до получения отрицательного результата.

На практике важно различать между собой и отличать от дезинфекции асептику и антисептику.

Асептика. Асептика — это система профилактических мероприятий, направленных на предотвращение попадания микроорганизмов в рану, лекарственные препараты, питательные среды и

другие объекты. Она включает: 1) стерилизацию инструментов, приборов, материалов; 2) специальную (антисептическую) обработку рук перед асептической работой; соблюдение определенных правил и приемов работы (стерильный халат, маска, перчатки, исключение разговоров и т.п.); 4) осуществление специальных санитарно-противоэпидемических и гигиенических мероприятий (правильная вентиляция, влажная уборка с применением дезинфицирующих средств, использование бактерицидных облучателей, боксированных помещений).

Антисептика. Антисептика — это комплекс мероприятий, направленных на уничтожение микробов, попавших в рану, лекарственный препарат или другой объект. Различают антисептику:

1) *механическую* (например, при обработке раны удаление из нее инфицированных и нежизнеспособных тканей);

2) *физическую* (наложение гигроскопических повязок, применение гипертонических растворов, способствующих оттоку раневого отделяемого в повязку, сухого тепла, УФО, лазера и т.д.);

3) *химическую* (применяют химические вещества, обладающие бактерицидными или бактериостатическим действием при минимальном органотропном действии, например, мирамистин или хлоргексидин; в лекарственные препараты вносят борную кислоту, мертиолят и др.);

4) *биологическую* (применение антибиотиков, бактериофагов, иммуноглобулинов, средств, стимулирующих защитные силы организма).

12.1.4. Стерилизация

Стерилизация — полное обеспложивание объектов, при котором уничтожаются все формы микроорганизмов (вегетативные и споры). Для стерилизации применяют физические и химические методы. Выбор метода определяется видом стерилизуемого материала, который после стерилизации должен сохранять свои основные свойства (форму, эластичность, активность и др.). Если объект должен сохранять некоторое время состояние стерильности, перед стерилизацией он должен быть соответствующим образом упакован, а изделия медицинского назначения, кроме того, подвергают дезинфекции и предстерилизационной очистке (эти меры направлены на профилактику внутрибольничных инфекций у больных и персонала, контактирующих с такими изделиями). Для упаковки стерилизуемых изделий медицинского назначения применяют специальные виды бумаги, стерилизационные коробки (биксы), двойную мягкую упаковку из бязи и др. Срок хранения стерильного изделия зависит от вида упаковки: в коробках без фильтра и двойной мягкой упаковке — 3 сут, в пергаменте или коробке с фильтром — 20 сут.

Тепловые методы. Физические методы стерилизации включают действие высокой температуры, ионизирующего излучения, фильтрование через коллоидные фильтры.

Основные режимы тепловой стерилизации предметов приведены в табл. 12.1.

Помимо указанных, имеются и другие методы тепловой стерилизации. Например, стерилизация *в среде горячих стеклянных шариков* (так стерилизуют зубные боры, рабочие части зондов, гладилок и другие стоматологические инструменты).

Контроль тепловой стерилизации. Контроль процесса стерилизации осуществляют несколькими методами:

1) по показаниям приборов (мановакуумметров, термометров, таймеров);

2) с использованием физико-химических тестов (вместе со стерилизуемым материалом в аппарат закладывают ампулы с кристаллами веществ или специальные бумажные термохимические индикаторы; при нужной температуре вещества расплавляются, а индикаторы меняют цвет);

3) биологические тесты (в аппарат помещают флакончики с салфетками или бумажными дисками, пропитанными взвесью термостойкого спорообразующего микроба (*Bacillus stearothermophilus* для контроля паровых или *Bacillus licheniformis* для контроля воздушных стерилизаторов), и после стерилизации их инкубируют в ПБ, который, если споры погибли, не должен мутнеть).

Максимальные термометры, физико-химические и биотесты помещают в определенные точки аппарата. Показателями эффективной работы стерилизационной аппаратуры являются: отсутствие роста тест-культуры в сочетании с удовлетворительными результатами физического и химического контроля.

Воздействие ионизирующим излучением. Обработка ионизирующими лучами («холодная стерилизация») — наиболее перспективный способ стерилизации, так как возможна полная автоматизация всех процессов. Стерилизацию проводят в товарной упаковке, что обеспечивает длительность сохранения материала стерильным. Установка представляет собой бетонную камеру с толстыми стенами для защиты персонала от излучения. После обработки материал контролируют на остаточную радиоактивность. Этим способом стерилизуют хирургический инструментарий, изделия из пластмасс (например, шприцы однократного использования), вакцины, лечебные сыворотки, многие лекарства.

Фильтрование. Для стерилизации жидкостей используют фильтры из коллодия, диаметр пор которых меньше размеров вирусов. Этот метод применяют в биотехнологическом производстве при изготовлении вакцин, иммунных сывороток, растворов антибиотиков, бактериофагов и других материалов, не пригодных для тепловых или других методов стерилизации. Фильтрование через бак-

Таблица 12.1

Методы тепловой стерилизации

Метод	Аппаратура	Режим (температура, время, давление)*	Стерилизуемый материал
<i>Однократные методы</i>			
Прокаливание	Спиртовка, газовая горелка	До красного каления	Бактериологические петли, мелкие металлические инструменты
Горячим воздухом	Воздушный стерилизатор	180 °С, 60 мин (160 °С, 150 мин)	Стеклопосуда, пипетки, вата, тальк, вазелиновое масло, металлические инструменты
Паром под давлением (1 атм = 0,11 МПа = 1,1 кгс/см ²)**	Паровой стерилизатор (автоклав)	120 °С, 45 мин — давление 1 атм (132 °С, 20 мин, 2 атм)	Простые питательные среды (ПБ, ПА), заразный материал, изделия из стекла, металла, резины или латекса, халаты, белье, перчатки, перевязочный и шовный материал, некоторые лекарства и др.
<i>Дробная стерилизация (тиндализация)***</i>			
Текущим паром	Паровой стерилизатор с открытым выпускным краном	100 °С, 3 дня по 1 ч в день	Молоко, среды и лекарства с углеводами, некоторые другие лекарства
Щадящее прогревание	Водяная баня с терморегулятором	56—58 °С, 5 дней: 1 день 2 ч, остальные дни по 1 ч	Белковые жидкости (питательные среды, содержащие белок, сыворотка крови, асцитическая жидкость)

Примечание. * — приведены некоторые из возможных режимов; ** — стерилизующим фактором является не давление, а температура пара; *** — дробно стерилизуют объекты, которые могут быть питательным субстратом для микробов (в промежутках между воздействиями объект оставляют в термостате при 37 °С или комнатной температуре для прорастания спор). Образовавшиеся вегетативные формы микроорганизмов убивают при последующем прогревании.

териальные фильтры (асбестовые, целлюлозные) не являются в строгом смысле стерилизующим, так как у этих фильтров более крупные поры. Через них могут проходить вирусы и фильтрующиеся формы бактерий.

Химические методы стерилизации. *Стерилизация растворами химических средств.* Этот метод является вспомогательным, так как изделия нельзя простерилизовать в упаковке, а по окончании процесса их надо промыть стерильной жидкостью (например, питьевой водой), что нарушает правила асептики и может привести к вторичному обсеменению изделий. Эти методы применяют для изделий, которые нельзя стерилизовать другими методами (из-за термолабильности, конструкции и т. п.). Используют различные режимы стерилизации, например:

6 %-й раствор перекиси водорода, экспозиция 6 ч (изделия из полимерных материалов, стекла, коррозионностойких металлов);

4,8 %-й раствор первомура, экспозиция 15 мин (лигатурный шовный материал).

Обязательными условиями являются: полное погружение изделия в раствор (с заполнением каналов и полостей) и температура раствора не менее 18 °С. После стерилизации все манипуляции проводят, строго соблюдая правила асептики (достают из раствора стерильным пинцетом или корнцангом, промывают стерильной жидкостью). Если изделия используют не сразу после стерилизации, то их помещают в стерильную коробку со стерильной простыней и хранят не более 3 сут.

Газовая стерилизация. Этот метод применяется для обработки оптики, кардиостимуляторов, сложной техники (аппаратов искусственного кровообращения), изделий из полимеров, стекла, металлов. Используют окись этилена или смесь ОБ (окись этилена с бромистым метилом), озон, а также пары раствора формальдегида в этиловом спирте, которыми наполняют стационарные газовые стерилизаторы или портативные анаэробы. Для поддержания температуры (35 или 55 °С) анаэробы помещают в термостат или водяную баню. Для упаковки используют полиэтиленовую пленку (два слоя), пергамент и специальный упаковочный материал. Выбор метода и режима газовой стерилизации зависит от вида стерилизуемого изделия (например, смесью ОБ разные изделия стерилизуют от 4 до 16 ч). Стерилизованные газом изделия применяют после их выдержки (в течение 1—21 сут) в вентилируемом помещении. Срок сохранения стерильности для изделий в упаковке из полиэтиленовой пленки — 5 лет, пергамента или бумаги — 20 сут. Контроль процесса ведут по показаниям приборов (термометров, мановакуумметров), а контроль эффективности стерилизации — с помощью биотестов.

Контроль стерильности изделий медицинского назначения. Контроль изделий, простерилизованных в ЛПУ, проводят в специ-

ально оборудованных боксах с предбоксниками, соблюдая асептические условия, исключая возможность вторичной контаминации изделий микробами. В боксах используют бактерицидные облучатели, поверхности обрабатывают моющими и дезинфицирующими средствами, воздух подают в бокс через бактериальные фильтры. Перед входом в бокс сотрудники лаборатории тщательно моют руки, надевают в предбокснике стерильную спецодежду (халаты, бахилы, шапочки, перчатки, 4-слойные маски). В процессе работы в боксе проверяют обсемененность воздуха: на рабочем столе на 15 мин открывают две чашки с питательным агаром, которые затем инкубируют 48 ч при 32 °С (допускается рост не более трех колоний неспорообразующих сапрофитов). Пробы для исследования (не менее 1 % из числа одновременно простерилизованных изделий в той же упаковке) отбирает лаборант ЦГСЭН, дезстанции или медсестра под наблюдением сотрудника баклаборатории. Контроль стерильности проводят путем прямого посева (погружения) изделий в питательные среды (мелкие изделия или детали разъемных изделий — целиком, от шовного или перевязочного материала — отрезанные фрагменты). Стерильность крупных изделий контролируют методом смывов. Материалом обязательно засевают две среды — тиогликолевую (для роста бактерий) и среду Сабуро (для роста грибов). Посевы на тиогликолевой среде выдерживают при 32 °С, на среде Сабуро — при 22 °С в течение 7 сут (для изделий после тепловой стерилизации). При отсутствии роста во всех пробирках (флаконах) делают заключение о стерильности изделий.

12.2. Организация, оборудование и режим работы микробиологической лаборатории

Организация лаборатории. В зависимости от назначения микробиологические лаборатории могут быть бактериологическими, паразитологическими, микологическими, вирусологическими, иммунологическими и специальными (для диагностики особо опасных инфекций). Как правило, микробиологическая лаборатория включает следующие помещения: 1) препараторскую для подготовки лабораторной посуды, приготовления питательных сред и проведения других вспомогательных работ; 2) моечную; 3) автоклавную, в которой стерилизуют питательные среды и лабораторную посуду; 4) комнату для взятия материала от больных и носителей; 5) комнаты для микроскопических и микробиологических исследований, включающие один или два бокса; 6) помещения для обеззараживания отработанных материалов. Лабораторные животные, используемые для биологических проб, содержатся в отдельном изолированном помещении (виварии).

Желательно, чтобы комнаты лаборатории были непроходными. Стены для удобства мытья и обработки дезинфицирующими веществами окрашивают светлой масляной краской или облицовывают плиткой, а полы покрывают линолеумом.

Заразный материал исследуют в отдельной комнате. Для работы, требующей соблюдения микробиологического режима (посевы материала на стерильность, заражение тканевых культур, куриных эмбрионов и т.д.), необходимо специальное помещение (бокс), площадь которого должна быть достаточной для работы двух человек. Перед работой и после нее помещение бокса обрабатывают дезинфицирующими растворами и облучают бактерицидными лампами.

Оборудование лаборатории. Лабораторная мебель должна быть простой и удобной. Лабораторные столы, покрытые специальной эмалью, линолеумом или другими легко дезинфицирующимися материалами, ставят у окон. В сейфах-холодильниках хранят культуры микроорганизмов.

Основное оборудование *бактериологической лаборатории* — приборы для различных видов микроскопии, приборы для нагревания (газовые и спиртовые горелки, электрические печи и др.), термостаты, холодильники, аппараты для стерилизации (стерилизатор, аппарат Коха, печь Пастера, свертыватель и др.), центрифуга, дистилляционный аппарат и др. Для того чтобы избежать попадания материала в рот, рекомендуется пользоваться автоматической пипеткой или пипеткой с резиновой грушей.

Оборудование *паразитологической лаборатории* почти не отличается от оснащения бактериологической лаборатории и включает, помимо него, окулярный микрометр и нагревательный столик к микроскопу. Препараты кала следует готовить в вытяжном шкафу. Отработанный материал обезвреживают кипячением, стерилизацией или дезинфицирующими растворами.

Микологическая лаборатория включает, помимо оборудования, необходимого для бактериологической лаборатории, инструменты для взятия и обработки материала — маникюрные кусачки, ложечки Фолькмана, лопаточки, «копья» из тугоплавкого металла, препаровальные иглы для расщепления волос и чешуек. Лабораторные столы в микологической лаборатории покрывают стеклами, под которые подкладывают листы белой и черной бумаги для лучшего рассмотрения культур грибов и пигмента исследуемых колоний.

Обезвреживание отработанного материала производится таким же образом, как и в бактериологических лабораториях.

Иммунологическая лаборатория оборудована термостатами, холодильниками, посудой и приборами, необходимыми для проведения серологических реакций в массовых количествах.

Устройство и оснащение вирусологической лаборатории несколько отличается от бактериологической. Помещение *вирусоло-*

гической лаборатории должно включать бокс с предбоксником, разделенные стеклянной перегородкой, где осуществляется работа с культурами клеток и куриными эмбрионами.

Кроме посуды и обычного оборудования, необходимы камеры глубокого и сверхглубокого замораживания (с температурой $-30 \dots 70^\circ\text{C}$), холодильные камеры (с температурой -20°C), центрифуги со скоростью вращения 1500—3000 об/мин и более для очистки вируса от балластных веществ и концентрации его, а также гомогенизаторы для измельчения тканей, овоскоп, горелки для запаивания ампул, вакуумный насос.

Перед работой помещения дезинфицируют таким же образом, как и бокс микробиологических лабораторий. Обработку помещений производят только влажным способом с применением дезинфицирующих растворов и бактерицидных ламп.

Правила работы в лаборатории. 1. Персонал лабораторий обеспечивают медицинскими халатами, косынками или шапочками. В боксах работают в стерильном халате, шапочке и марлевой маске, а при вскрытии животных надевают клеенчатые передники, нарукавники и резиновые перчатки. Спецодежда защищает работающего, а также предупреждает загрязнение исследуемого материала посторонней микрофлорой.

2. В лаборатории категорически запрещают принимать пищу и курить.

3. Не допускают лишних хождений, резких движений и посторонних разговоров.

4. Рабочее место в процессе исследований содержат в полном порядке. Бактериологические петли обезвреживают прокаливанием в пламени горелки; использованные шпатели, стекла, пипетки и другие инструменты помещают в банки с дезинфицирующим раствором.

5. После окончания работы питательные среды с посевами помещают в термостат, музейные культуры — в сейфы-холодильники, приборы и аппараты устанавливают на специально отведенных для них местах. Столы протирают дезинфицирующим раствором и тщательно моют руки.

6. При случайном попадании исследуемого материала или культуры микроорганизмов на руки, стол, халат или обувь немедленно обрабатывают их 1%-м раствором хлорамина.

Правила работы в микробиологической лаборатории особого режима. Перед входом в лабораторию все сотрудники снимают в гардеробной верхнюю одежду, а в следующей комнате с индивидуальными шкафами — остальную одежду и белье, надевают пижаму, медицинский халат, косынку, носки и тапочки (комплект 1-й — защитный костюм 4-го типа). При работе в секционной надевают противочумный костюм (комплект 2-й), второй секционный халат, шлем, ватно-марлевую маску, резиновые перчат-

ки, клеенчатый фартук и нарукавники. Для защиты глаз используют очки-консервы. Противочумный костюм 1-го типа надевают в следующем порядке: 1) комбинезон, 2) носки, 3) сапоги, 4) шлем, 5) противочумный халат, 7) ватно-марлевая маска (над крыльями носа помещают ватные тампоны), 8) очки-консервы, 9) перчатки, 10) клеенчатые передник и нарукавники (надевают при работе в секционной). У работающего с заразным материалом должно быть полотенце, смоченное 3%-м раствором лизола. По окончании работы руки в перчатках погружают в 5%-й раствор лизола на 1 мин, таким же способом обрабатывают руки после снятия каждого предмета одежды. Противочумный костюм снимают в обратной последовательности, за исключением перчаток, которые снимают в последнюю очередь, складывают наружной поверхностью внутрь и погружают в 5%-й раствор лизола или 1%-й раствор хлорамина на 2 ч. Очки помещают в 70%-й спирт.

После вскрытия трупов инструменты и шприцы кипятят в лизоле не менее 40 мин. Все отработанные материалы и трупы животных сжигают или стерилизуют.

Методы лабораторной диагностики вирусной инфекции

Возбудитель	Нозологическая форма	Основной синдром	Материал для исследования	Выделение вирусного штамма			Серологическая диагностика	Экспресс-диагностика
				Живая система для выделения	Показатель размножения вируса	Идентификация вируса		
Ортомиксовирусы человека	Грипп	Лихорадка, токсикоз, симптомы воспаления верхних отделов дыхательных путей	Смыв из носоглотки, кровь, секционный материал	Куриные эмбрионы	Гибель или недоразвитие эмбриона, капилляротоксикоз, бляшкообразование на ХАО	РТГА, РН	РТГА, РН, РСК, ИФА	РИФ, ИФА, РОНГА
				Культуры клеток (первичные — почек эмбриона человека, телят, собак, фибробласты куриных эмбрионов; перевиваемые — МДСК) Чувствительные лабораторные животные (белые мыши, хомяки, хорьки)	РТГадс, РГА, ЦПД Клинические проявления инфекции и гибель животного; изменения в трахее, бронхах, легочной ткани; РГА	РТГадс, РТГА, РН, РИФ, ИФА		

Возбудитель	Нозологическая форма	Основной синдром	Материал для исследования	Выделение вирусного штамма			Серологическая диагностика	Экспресс-диагностика
				Живая система для выделения	Показатель размножения вируса	Идентификация вируса		
Вирусы парагриппа (1—4 тип)	ОРВИ (парагрипп)	Лихорадка, ларинготрахеит (симптомы воспаления верхних и средних отделов дыхательных путей)	Смыв из носоглотки	Культуры клеток (первичные — почек макаки-резуса, эмбриона человека; перевиваемые — <i>HEp-2</i> , <i>KB</i> , <i>Vero</i> и др.) Куриные эмбрионы	РГадс, РГА РГА	РТГА, РН, РТГАадс РИФ, ИФА	РТГА, РСК, РН, РТГАадс ИФА	РИФ
Респираторно-синцитиальный вирус	ОРВИ	Лихорадка, симптомы воспаления верхних отделов дыхательных путей, в тяжелых случаях — пневмония	Смыв из носоглотки, мокрота, секционный материал	Культуры клеток (<i>KB</i> , <i>HEp-2</i> ; <i>HeLa</i> , <i>BSC-1</i> , <i>FL</i> , <i>WI-38</i> и др.)	ЦПД по типу симпластообразования	РИФ, РН, РСК	РН, РНГА, РИФ, РИА, РСК	РИФ, ИФА, РОНГА
Вирус паротита	Эпидемический паротит	Лихорадка, припухлость околоушных желез	Слюна, моча, ликвор	Культуры клеток (<i>BHK-21</i> , <i>Vero</i> , <i>FL</i> , <i>IMK</i> , <i>I-41</i> , <i>HeLa</i> и др.)	РГадс, ЦПД по типу симпластообразования, РИФ	РГадс, РН	РСК, РИФ	РИФ

Вирус кори	Корь	Лихорадка, сыпь (макулопапулезная), нарушения функции ЦНС	Смыв из носоглотки, кровь, моча, секционный материал	Куриные эмбрионы Культуры клеток (первичные — почек обезьян или человека; перевиваемые — <i>FL, KB, HeLa, L, Vero, MS, BSC-1</i>)	РГА ЦПД по типу симпластообразования, РГА	РИФ, РН, РТГА, РСК, РТГадс РН, РТГА	РТГА	РИФ
Вирус полиомиелита	Полиомиелит	1. Отсутствие клинических проявлений (инаппарантная форма) 2. Симптомы гастроэнтерита без поражения ЦНС (абортивная, висцеральная форма и др.) 3. Симптомы поражения нервной системы	Не отобрают Смыв из носоглотки, фекалии, кровь, моча Смыв из носоглотки,	Культуры клеток (первичные — почек обезьян, перевиваемые — <i>Vero, HeLa, KB, RD, Detroit-6, HEp-2</i> и др.)	Вирусоносительство выявляется случайно ЦПД — полная дегенерация; бляшкообразующая активность; цветная проба	РН	РСК, РН	—

Возбудитель	Нозологическая форма	Основной синдром	Материал для исследования	Выделение вирусного штамма			Серологическая диагностика	Экспресс-диагностика
				Живая система для выделения	Показатель размножения вируса	Идентификация вируса		
Вирус Коксаки А 1—24 типы	ОРВИ, герпетическая ангина, менингит, миокардит	(паралитическая форма) Симптомы поражения той или иной системы (дыхательной, сердечно-сосудистой, нервной и др.)	фекалии, кровь, моча, ликвор, секционный материал Смыв из носоглотки, кровь, моча, фекалии, ликвор, секционный материал	Новорожденные белые мыши	Вялые параличи, недоразвитие, смерть	РН	РН, РСК	ИЭМ
				Культура клеток — <i>RD</i>	ЦПД — полная дегенерация; бляшкообразование	РН		
Вирус Коксаки В 1—6 типы	ОРВИ, менингит миалгия, миокардит, панкреатит	То же	То же	Новорожденные белые мыши Культуры клеток <i>Vero</i> , <i>HEp-2</i> , <i>HeLa</i> , <i>RD</i> и др.)	Спаستические параличи, смерть ЦПД — полная дегенерация; бляшкообразующая активность; цветная проба	РН РН	РН, РСК	ИЭМ

Вирус ЕСНО	ОРВИ, менингит	Симптомы поражения верхних и средних отделов дыхательных путей, нервной системы	»	Культуры клеток (<i>Vero</i> , <i>HeLa</i> , <i>HEp-2</i> и др., первичные почки обезьян, эмбриона человека	ЦПД — полная дегенерация	РН	РН, РСК	ИЭМ
Энтеровирус-72	Гепатит А	Желтуха	Сыворотка крови	Методы, доступные для применения в практической лаборатории, не разработаны			РИА, ИФА	ИЭМ, ИФА, РИА
Риновирусы человека (более 100)	ОРВИ	Симптомы катарального воспаления верхних отделов дыхательных путей	Отделяемое слизистой оболочки носа, смыв из носоглотки	Культуры клеток человека (для <i>H</i> -штаммов: первичные культуры почек эмбриона человека; диплоидные — <i>WI-38</i> , перевиваемые — <i>HeLa</i> , <i>HEp-</i> , <i>KB</i>), обезьян (для <i>M</i> -штаммов)	ЦПД по очаговому типу	РН, РСК	РН, РСК	РИФ
Вирус бешенства	Бешенство	Судороги, параличи, смерть	Секционный материал (ЦНС), слюна	Органные культуры трахеи эмбриона человека	Прекращение мерцательной активности эпителия трахеи	РН, РИФ, РПГ	РН, РИФ, РПГ	РИФ, цитоскопия (тельца Бабеша — Негри)

Возбудитель	Нозологическая форма	Основной синдром	Материал для исследования	Выделение вирусного штамма			Серологическая диагностика	Экспресс-диагностика
				Живая система для выделения	Показатель размножения вируса	Идентификация вируса		
Вирус краснухи	Краснуха	Лихорадка, припухание заднешейных, затылочных, околоушных и других лимфоузлов; сыпь	Кровь, смыв из носоглотки, моча, ликвор, пробы тканей плода	Чувствительные животные (новорожденные или взрослые белые мыши) Культуры клеток (<i>BHK-21</i> , <i>Vero</i> , <i>HEp-2</i> , <i>HeLa</i> , <i>FL</i> и др.)	Параличи, смерть, тельца Бабеша—Негри в ЦНС Интерференция, бляшкообразование, ЦПД, РГА	РН, РТГА, РИФ	РСК, РТГА, РН, РИФ	—
Коронавирусы	ОРВИ, гастроэнтерит	Симптомы воспаления верхних отделов дыхательных путей и гастроэнтерита	Слизь из носа, смыв из носоглотки, фекалии	Чувствительные животные (новорожденные белые мыши) Культуры клеток (<i>WI-38</i> , <i>L132</i>) Органные культуры трахеи эмбриона человека	Энцефалит, гибель ЦПД (медленное) Прекращение мерцательной активности эпителия трахеи, ЭМ	Не разработаны для практических лабораторий	РН, РСК	РИФ

Реовирусы (1—8 типы)	ОРВИ	Симптомы воспаления верхних отделов дыхательных, путей, диарея	Смыв из носоглотки, фекалии, кровь	Культуры клеток (первичные — почек человека, макаки-резуса переливаемые — <i>KB, HeLa, BSC-1, L</i>)	ЦПД (8—10-й день), РГА	РТГА, РН, РИФ	РН, РТГА, РСК	
Ротавирусы	Гастроэнтерит	Симптомы гастроэнтерита	Фекалии	Новорожденные мыши	Параличи, смерть	РН	РН, РСК, ИФА, РИА	ИЭМ, РИФ, ИФА, РИА
ВИЧ	СПИД	Иммунодефицит	Кровь, биоптаты костного мозга, пунктаты лимфоузлов, сперма, ликвор, секционный материал	Н9 (лимфоциты), МТ-2, МТ-4 (трансформированные лимфоциты пупочной вены)	Образование симпластов, РИФ	РИФ, ЭМ	ИФА, РИФ, РИА	ПЦР
Парвовирусы	Разнообразная	Разнообразные	Сыворотка крови, мононуклеарные клетки периферической крови,	Клетки костного мозга, селезенки плода, пупочной крови, периферической крови, стимулированные эритропоэтином	РИФ	РИФ, ПЦР, ДНК-гибридизация	ИФА, ИФА	ПЦР, иммуноблотинг

Возбудитель	Нозологическая форма	Основной синдром	Материал для исследования	Выделение вирусного штамма			Серологическая диагностика	Экспресс-диагностика
				Живая система для выделения	Показатель размножения вируса	Идентификация вируса		
Вирусы гепатитов D, C, E, G	Гепатиты	Желтуха	биоптаты синовиальной сумки и т. д. Сыворотка крови				ИФА, РИА, РИФ	ИЭМ, ПЦР
Аренавирусы, патогенные для человека				Нет методов, доступных для применения в практической лаборатории				
Вирус Ласса	Лихорадка Ласса	Тяжелая геморрагическая лихорадка с высокой летальностью	Смыв из носоглотки, кровь, ликвор, моча, плевральная жидкость, секционный материал	Культуры клеток (<i>L, Vero, HeLa, ВНК-21</i> , первичные культуры куриных фибробластов)	ЦПД	РНГА, РИФ, РН, РСК	РСК, РНГА, РТНГА, РИФ	РНГА
Вирус Хунин	Аргентинская лихорадка							
Вирус Мачупо	Боливийская лихорадка							

Вирус ЛХМ	Серозный менингит	Симптомы поражения ЦНС	Кровь, ликвор, секционный материал	Чувствительные лабораторные животные (новорожденные и взрослые белые мыши)	Судороги, смерть	РНГА, РН	РН, РСК	—
Тога-вирусы*	Энцефалит, менингоэнцефалит, лихорадка (геморрагическая, желтая, Денге)	Лихорадка, геморрагическая сыпь, желтуха, параличи	Кровь, ликвор, моча, секционный материал	Культуры клеток (первичные — почек хомяка, куриных и утиных эмбрионов, перевиваемые — <i>BHK-21</i> , <i>PS</i> , СПЭВ, <i>Vero</i> , <i>BSC-1 HeLa</i>)	ЦПД, бляшкообразование, РГА	РТГА, РНГА, РН	РТГА, РН, РСК, РРГ, РИФ	РНГА
Вирус крымской геморрагической лихорадки	Крымская геморрагическая лихорадка	Лихорадка	Кровь, моча, секционный материал	Новорожденные белые мыши	Параличи, смерть	РСКА, РНГА, РДПА, РН	РСК, РДПА	—
Вирус mosquitoной лихорадки	Москитная лихорадка (папатачи)	Лихорадка	Кровь	Новорожденные белые мыши	Параличи, смерть	РН	РСК	—

Возбудитель	Нозологическая форма	Основной синдром	Материал для исследования	Выделение вирусного штамма			Серологическая диагностика	Экспресс-диагностика
				Живая система для выделения	Показатель размножения вируса	Идентификация вируса		
Аденовирусы человека (1-й — 36-й типы)	ОРВИ, конъюнктивит	Лихорадка, симптомы воспаления верхних отделов дыхательных путей, конъюнктивит	Смыв с конъюнктивы, из носоглотки, фекалии	Культуры клеток (первичные или диплоидные — почек человека, <i>HeLa</i>)	ЦПД по гроздевидному типу	РГА, РТГА, РН, РСК	РСК, РН, РТГА	ЭМ, ИЭМ, РИФ, ИФА
Вирус простого герпеса (1-й, 2-й типы)	Герпес	Лихорадка, везикулярные высыпания, конъюнктивит	Содержимое везикул, смывы и соскобы с конъюнктивы, роговницы, слюна, моча, кровь, ликвор, секционный материал	Культуры клеток (практически все известные культуры клеток, чаще <i>Detroit-6, KB, BSC-1, Vero, RAI</i> и др.)	ЦПД, внутриядерные включения, РИФ	РН, РИФ, ИФА	РСК, РН, РРГ	РИФ, ЭМ, цитоскопия (выявление внутриядерных включений), ПЦР
				Куриные эмбрионы Новорожденные белые мыши Кролики — заражение в переднюю камеру	Бляшкообразование на ХАО Судороги, параличи, смерть кератоконъюнктивит, паноптальмит, параличи,	РН РН		

Вирус ветряной оспы — опоясывающего лишая	Ветряная оспа, опоясывающий лишай	Лихорадка, везикулярная сыпь и резкая болезненность по ходу межреберных нервов	Содержимое везикул, смыв из носоглотки, кровь	глаза или скarifицированную роговицу Культуры клеток (первичные, диплоидные и перевиваемые штаммы человеческого и обезьяньего происхождения, чаще всего — <i>HeLa</i> , <i>Vero</i> , <i>BSC-1</i> и др.)	смерть ЦПД по типу синцития, внутриядерные включения, тельца Аррагао, ИФ	РИФ	РСК, РИФ	РИФ, ЭМ
Цитомегаловирус	Эмбрионпатия	Гидроцефалия и другие пороки развития	Смыв из носоглотки, кровь, моча, секционный материал; лейкоциты периферической крови; материал, полученный при биопсии	Культуры клеток (первичные — из фибробластов и легких эмбриона человека; перевиваемая — <i>Vero</i> ; диплоидная — <i>WI-38</i>)	ЦПД по типу синцития, внутриядерные включения	РН, РСК, РИФ	РСК, РН	РИФ, ЭМ, цитоскопия (выявление внутриядерных включений)

Возбудитель	Нозологическая форма	Основной синдром	Материал для исследования	Выделение вирусного штамма			Серологическая диагностика	Экспресс-диагностика
				Живая система для выделения	Показатель размножения вируса	Идентификация вируса		
Вирус натуральной оспы	Натуральная оспа	Лихорадка, пу-стulesная сыпь	Кровь, слюна, смыв из носоглотки, содержащее везикул и пустул, корочки оспин	Куриные эмбрионы Культуры клеток (<i>HeLa</i> , <i>KB</i> , <i>Vero</i> , <i>BSC-1</i> и др.)	Бляшкообразование на ХАО, РГА ЦПД, включения (тельца Гварниери), РГадс	РПГ, РСК РТГадс, РППГ	РТГА, РСК, РН, ИФА	ЭМ, РИФ
Гепадна-вирус	Гепатит В**	Желтуха, лихорадка, нарушение функции печени	Кровь	Методы, доступные для применения в практической лаборатории, не разработаны			РИФ, ИФА, РИМ, РНГА	ВИЭФ, РПГ, РОНГА, ИФА, РИМ, ПЦР

Примечание. * Тогавирусы включают α -вирусы (венесуэльского, восточного и западного американского энцефаломиелиита лошадей, О'Ньонг-ньонг, Майяро, Пиксуна, Семлики, Синдбис, УНА), флавивирусы (комплексы вирусов клещевого и японского энцефалитов, желтой лихорадки, лихорадки Денге). ** Применяются дополнительные лабораторные тесты: определение уровня сывороточных аминотрансфераз и количества глобулинов.



Рис. 1. Возбудитель чумы в мазке крови, окрашенном метилновым синим

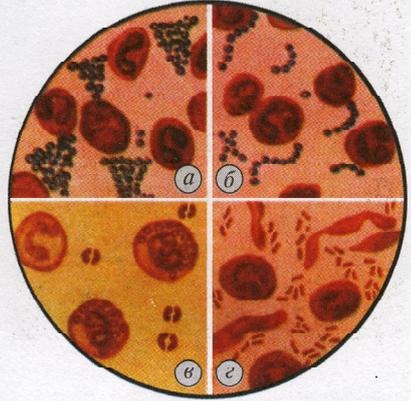


Рис. 2. Бактерии, окрашенные по Граму:

a — стафилококки; *б* — стрептококки;
в — гонококки; *г* — эшерихии

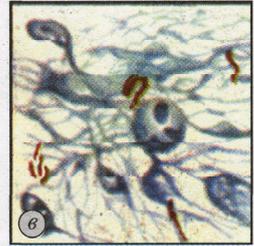
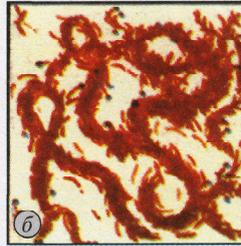
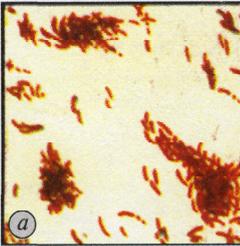
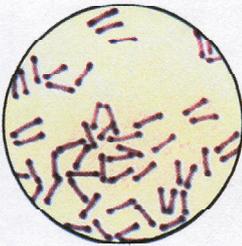
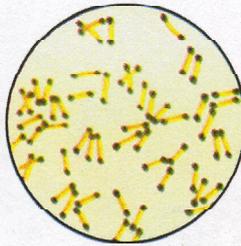


Рис. 3. Микобактерии туберкулеза, окрашенные по Цилю—Нильсену:

a — в чистой культуре; *б* — в микрокультуре (расположение в виде кос); *в* — в мокроте



a



б

Рис. 4. Коринебактерии дифтерии, окрашенные уксусно-кислым метиловым фиолетовым (*a*) и по Нейссеру (*б*)

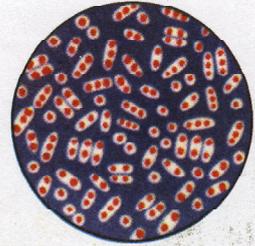


Рис. 5. Пневмококки при окраске по Бурри—Гинсу

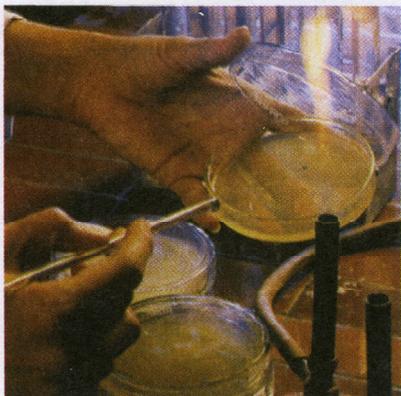


Рис. 6. Посев петлей по поверхности питательного агара в чашке Петри для выделения чистой культуры



Рис. 7. Колонии на дифференциально-диагностической среде Мак-Конки: а — эшерихий; б — сальмонелл; в — энтерококков; г — стафилококков

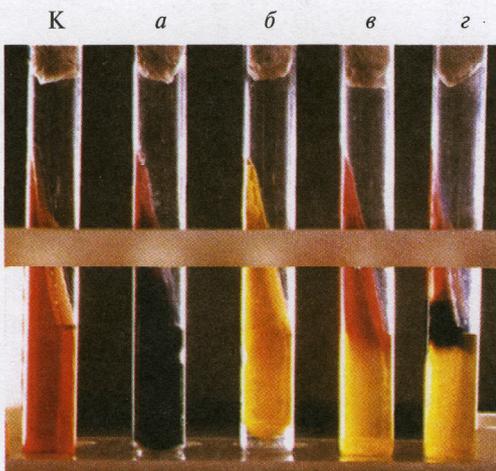


Рис. 8. Рост протеев (а), эшерихий (б), шигелл (в), сальмонелл (г) на комбинированной среде (трехсахарном железосодержащем агаре); К — контрольная среда

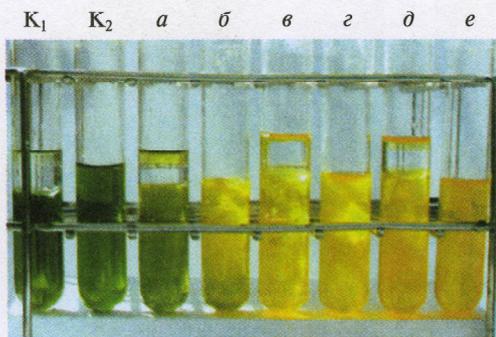


Рис. 9. Рост псевдомонад (а, б) и эшерихий (в—е) на среде Хью—Лейфсона в аэробных и анаэробных условиях (тест ОФ); К₁, К₂ — контрольная среда

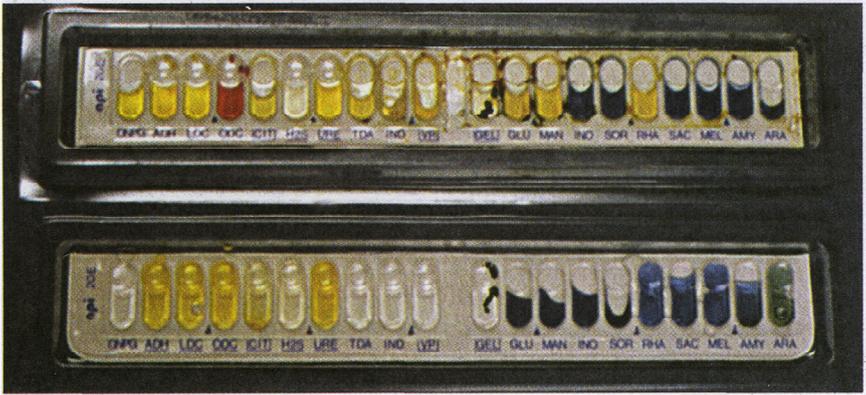


Рис. 10. Мультимикротесты для идентификации энтеробактерий



Рис. 11. Анаэробный бокс для культивирования анаэробов в бескислородной атмосфере



Рис. 12. Определение количества фаговых частиц методом агаровых слоев (на фоне сплошного роста индикаторной культуры видны «негативные колонии» фага)

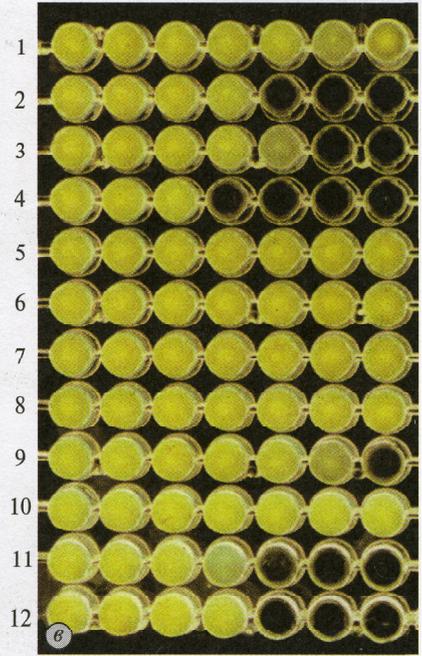
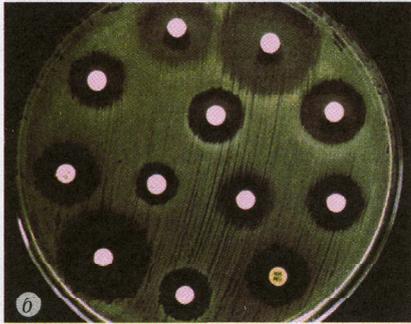
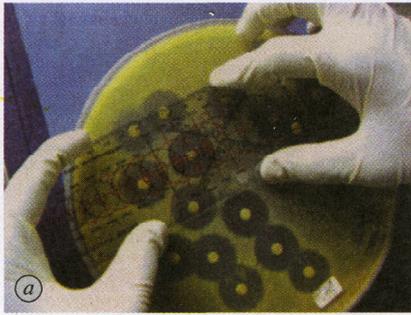


Рис. 13. Определение чувствительности к антибиотикам:

a, б — диско-диффузионный метод: видны разного диаметра зоны задержки роста (на среде Мюллера — Хинтона в чашке Петри диаметром 150 мм); *в* — микрометод серийных разведений в лунках планшета (концентрация антибиотиков убывает слева направо; 1—12 — номера культур)

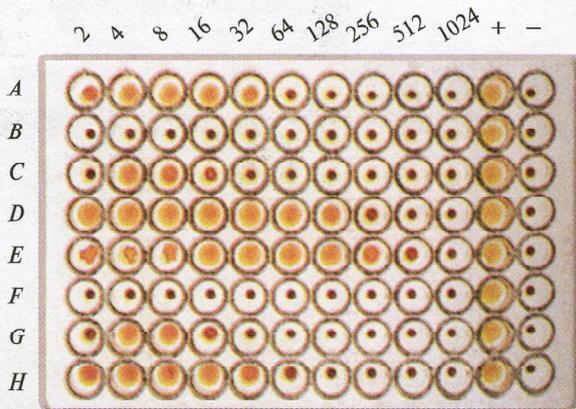


Рис. 14. Реакция непрямого гемагглютинации (микрометод):

в рядах лунки *A—H* находятся 2-кратные разведения (от 1/2 до 1/1024) 8-ми испытуемых сывороток (в предпоследней лунке заведомо «положительная» сыворотка, в последней «отрицательная»); в рядах *B* и *F* реакция отрицательна, в рядах *A* и *H* — РНГА положительна в титре 1/32, *C* и *G* — 1/16, *D* — 1/128, *E* — 1/256; некоторые сыворотки (*C* и *G*) дают так называемый эффект прозоны

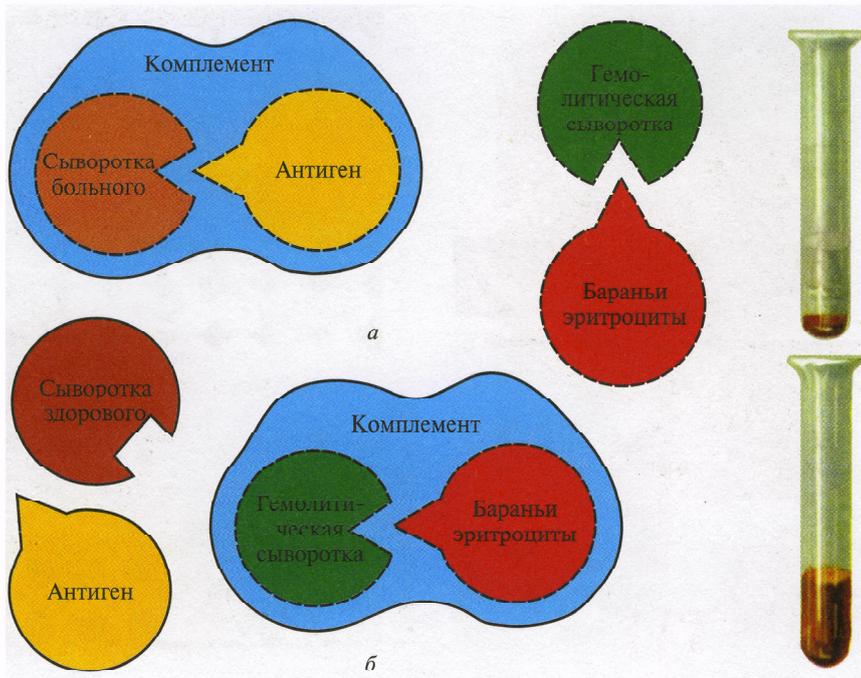


Рис. 15. Реакция связывания комплемента:
a — положительная; *б* — отрицательная

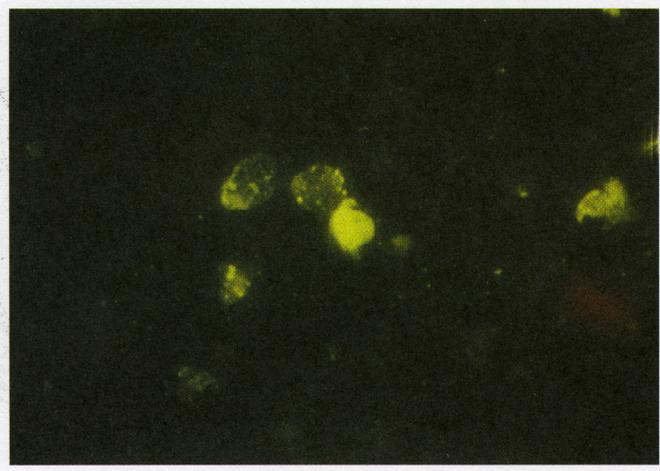


Рис. 16. Пораженные вирусами парагриппа эпителиальные клетки в смыве из носоглотки больного (непрямая РИФ)



Рис. 17. CAMP-тест:
 вертикальный штрих — культура *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; горизонтальные штрихи: вверху — положительный результат; в середине — отрицательный результат; внизу — инверсированная реакция (угнетение гемолиза)

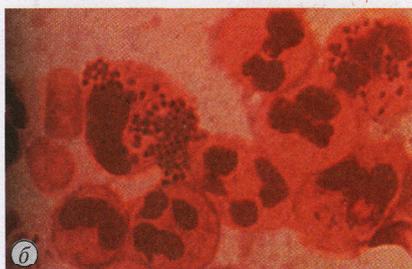
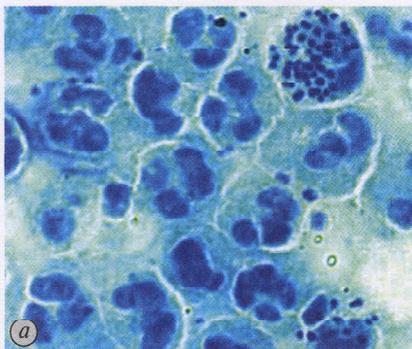


Рис. 18. Гонококки в отделяемом из уретры больного острой гонореей:
 а — окраска метиленовым синим;
 б — по Граму

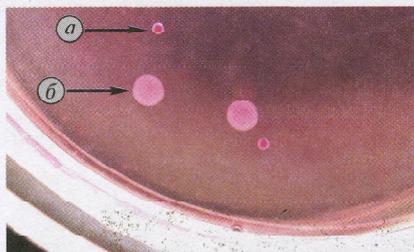


Рис. 19. Колонии энтеропатогенных нерсиний (а) и серраций (б) на селективном агаре CIN

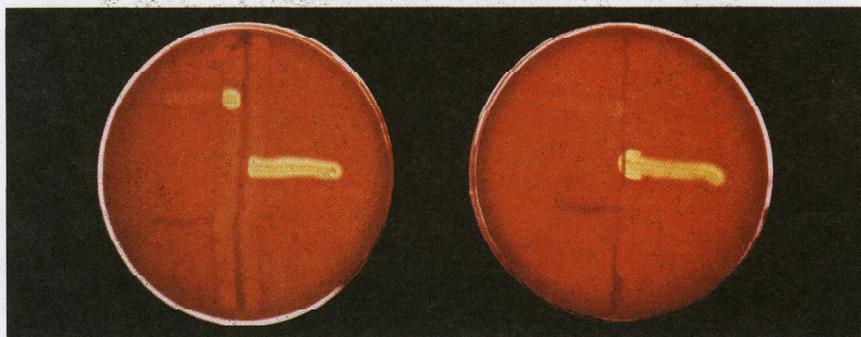


Рис. 20. Гемолитические реакции листерий в CAMP-тесте со стафилококком (левая чашка) и родококком (правая чашка):
 горизонтальные штрихи: справа — *Listeria ivanovii*; слева вверху — *Listeria monocytogenes*; слева внизу — *Listeria innocula*; вертикальные штрихи: на левой чашке — *Staphylococcus aureus*; на правой — *Rhodococcus equi*

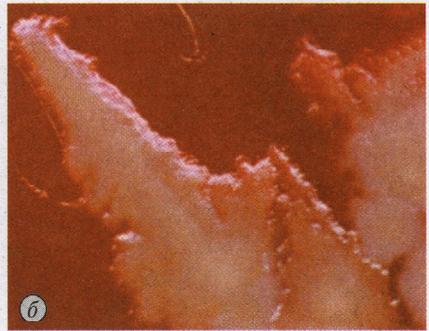


Рис. 21. Колонии сибирезвенных бацилл (а) и *Bacillus cereus* (б) на кровяном агаре

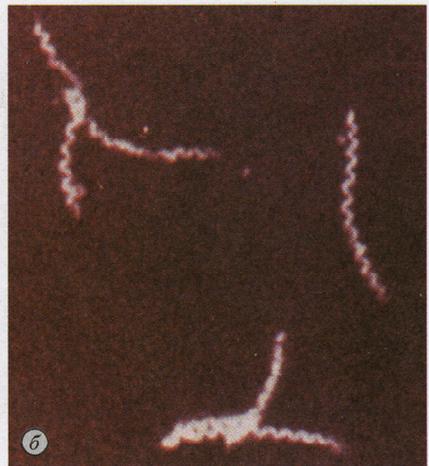


Рис. 22. Проявление сифилиса и его возбудитель:

а — твердый шанкр; б и в — бледная трепонема в отделяемом шанкра при темнопольной микроскопии



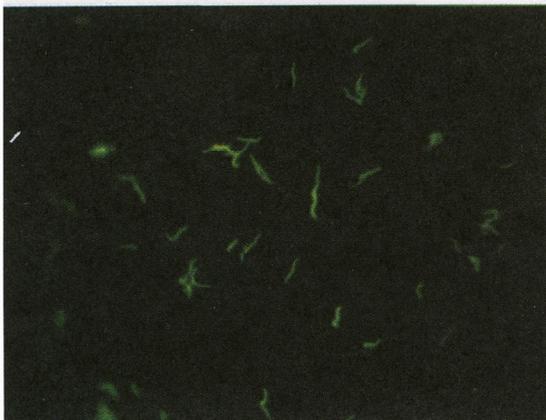


Рис. 23. Непрямая РИФ при серодиагностике сифилиса (видно специфическое свечение трепонем штамма Никольса)

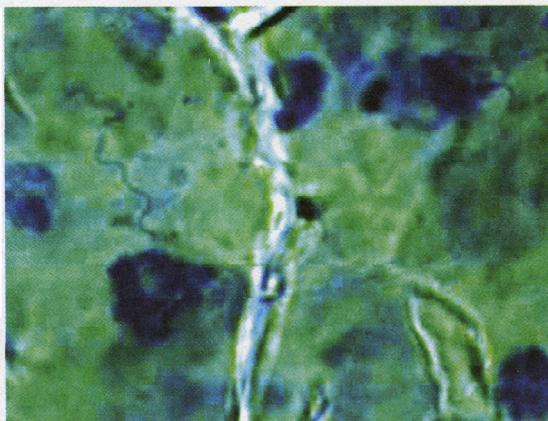


Рис. 24. Боррелии в крови больного эпидемическим возвратным тифом (окраска по Романовскому — Гимзе)

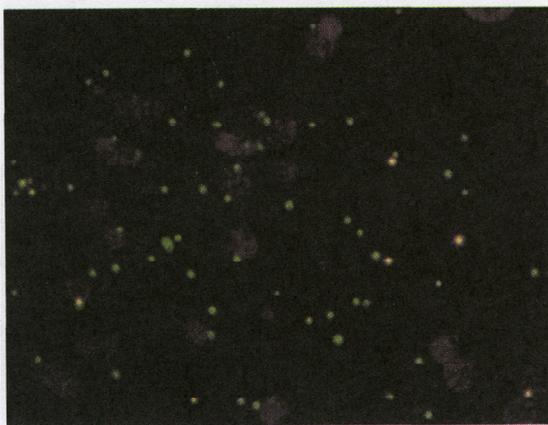


Рис. 25. Элементарные тельца *Chlamydia trachomatis* в исследуемом материале (прямая РИФ на основе люминесцирующих моноклональных антител)

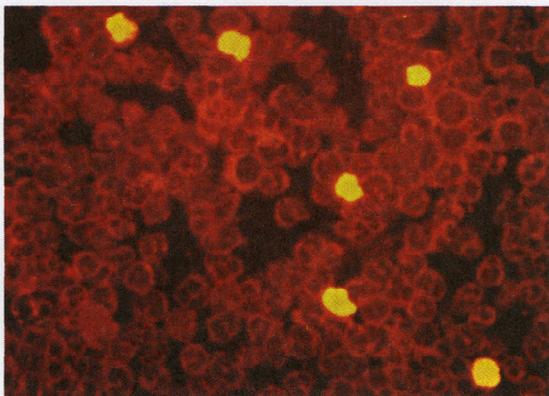


Рис. 26. Выявление антигена pp65 цитомегаловируса в лейкоцитах периферической крови больного с помощью меченых моноклональных антител (прямая РИФ)

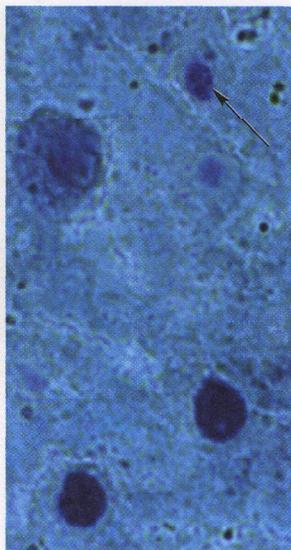


Рис. 27. Тельца Бабеша—Негри в нейронах головного мозга (окраска по Муромцеву)

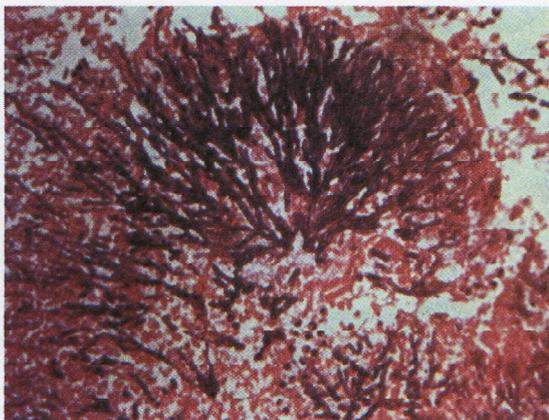


Рис. 28. Плесневые грибы *Aspergillus* spp. в срезе легкого при инвазивном аспергиллезе (видны дихотомически разветвляющиеся гифы гриба; окраска гематоксилин-эозином)

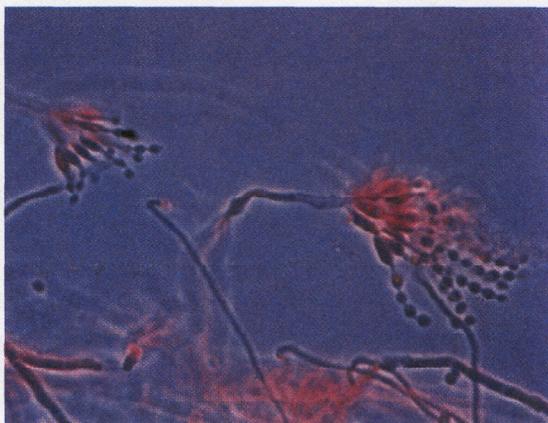


Рис. 29. Грибы *Penicillium marneffei* в чистой культуре

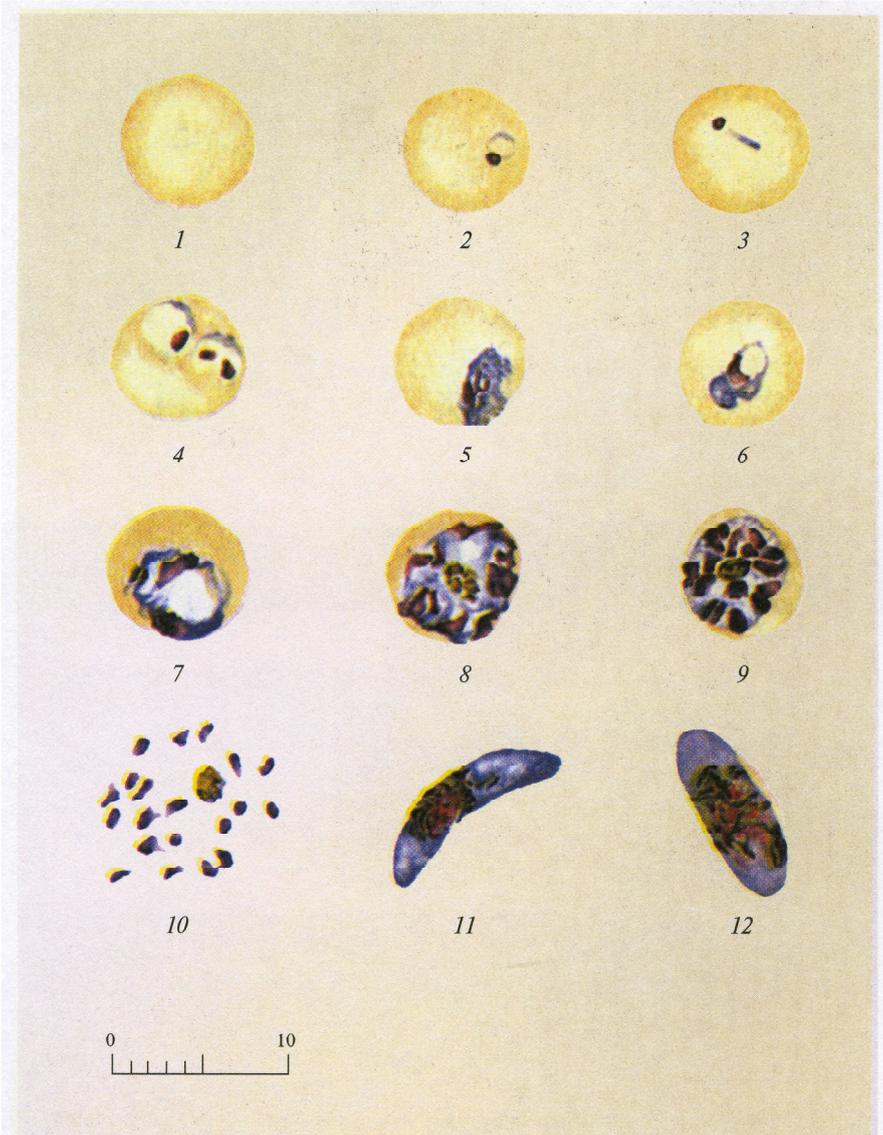


Рис. 30. Морфология *Plasmodium falciparum* в тонком мазке крови, окрашенном по Романовскому — Гимзе (последовательно развивающиеся формы):

1 — непораженный эритроцит; 2—4 — молодые трофозоиты; 5, 6 — зрелые трофозоиты; 7—10 — созревающие и зрелые шизонты; 11 — зрелая макрогамета (женский гаметоцит); 12 — зрелая микрогамета (мужской гаметоцит)

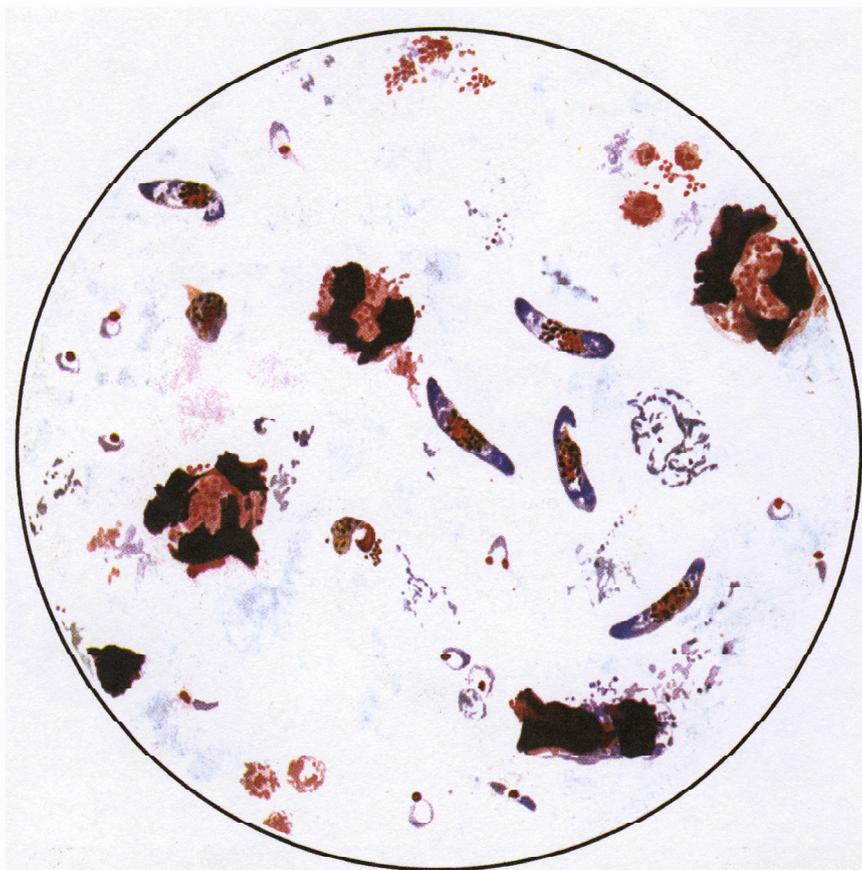


Рис. 31. Морфология *Plasmodium falciparum* в толстой капле крови, окрашенной по Романовскому — Гимзе (схема)

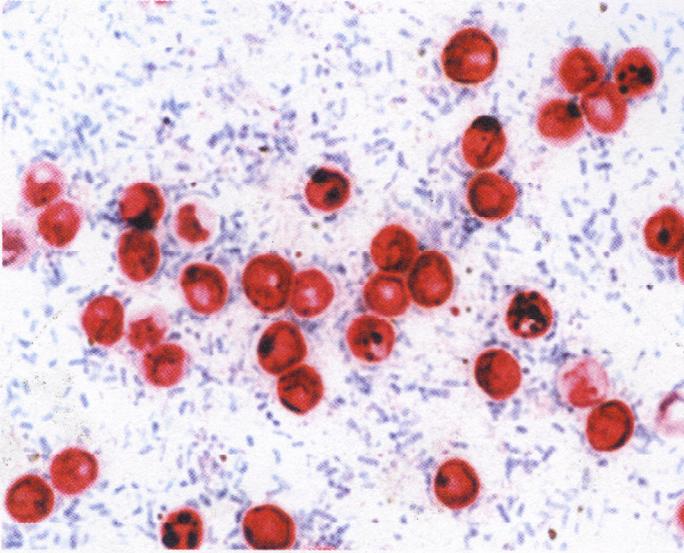


Рис. 32. Криптоспоридии (*C. parvum*) при окраске по Цило — Нильсену (видны округлые ооцисты красного цвета)

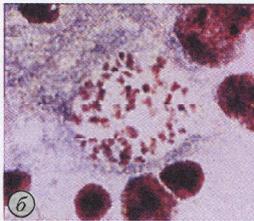


Рис. 33. *Toxoplasma gondii*:

а — тахизоиты; *б* — циста со спорозитами (окраска по Романовскому — Гимзе);
в — спорулированные ооцисты (нативный препарат)

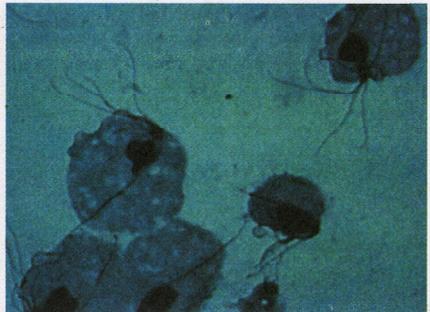
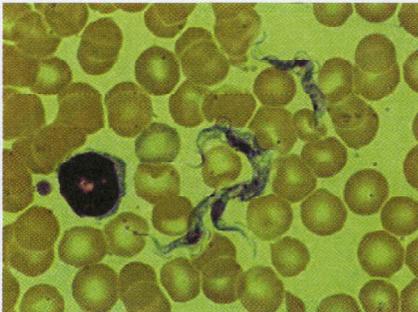


Рис. 34. *Trypanosoma gambiense*
(окраска по Романовскому — Гимзе)

Рис. 35. *Trichomonas vaginalis*
(окраска по Романовскому — Гимзе)



Рис. 36. Морфология *Entamoeba histolytica*:

a — форма *tagna* с эритроцитами в цитоплазме; *б* — трофозоит при контрастировании иодом; *в* — циста

Рис. 37. *Balantidium coli*:

a — в препарате при контрастировании иодом; *б* — в гистологическом срезе ткани, окрашенном гематоксилин-эозином

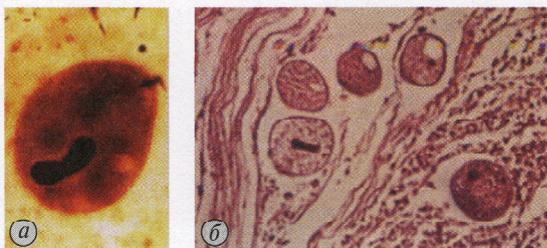


Рис. 38. Яйца трематод:

a — *Fasciolopsis buski*; *б* — *Heterophyes heterophyes*; *в* — *Clonorchis sinensis*; *г* — *Paragonimus westermani*

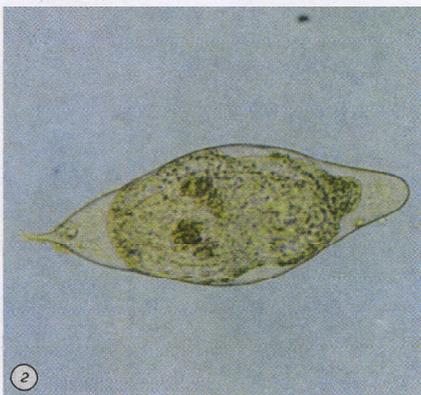
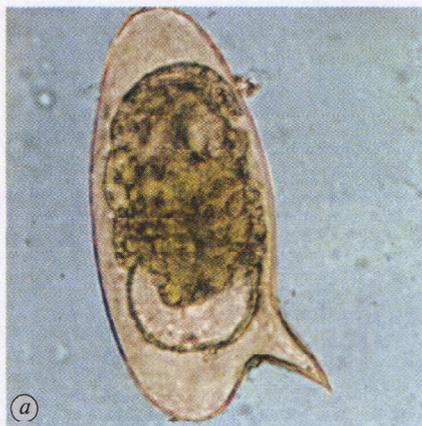


Рис. 39. Яйца шистосом:

a — *Schistosoma mansoni*; *б* — *Schistosoma japonicum*; *в* — *Schistosoma haematobium*;
г — *Schistosoma intercalatum*



Рис. 40. Яйца цестод:

a — *Taenia* spp. и *Echinococcus* spp. (морфологически неразличимы); *б* — *Hymenolepis nana*



a



1



2



3

б

Рис. 41. Яйца нематод:

a — *Enterobius vermicularis*; б — *Ascaris lumbricoides*;
1 — оплодотворенное, 2 — без белковой оболочки,
3 — неоплодотворенное

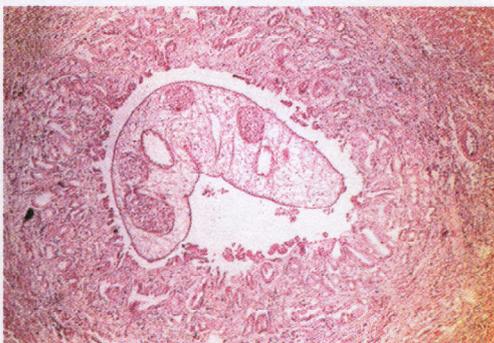


Рис. 42. Взрослая особь *Clonorchis sinensis* в желчном протоке человека (окраска гематоксилин-эозином)

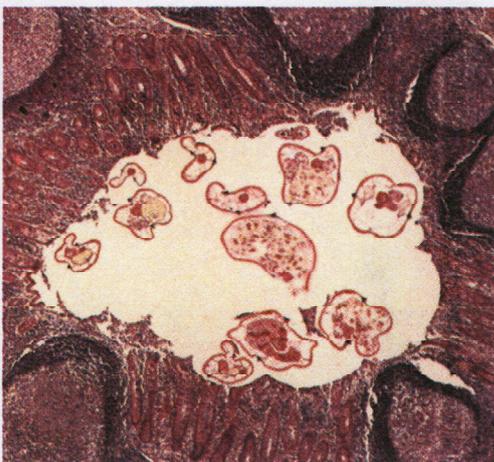


Рис. 43. Взрослые особи *Enterobius vermicularis* в просвете аппендикса человека (окраска гематоксилин-эозином)

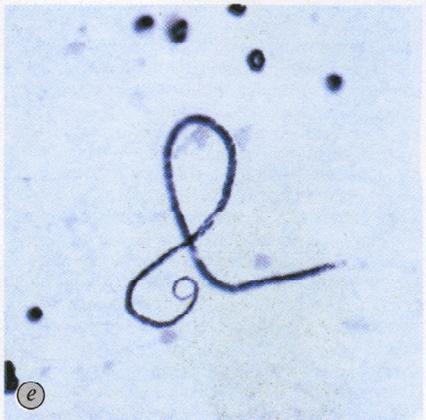


Рис. 44. Тканевые гельминты (микрофилярии):
a — *Wuchereria bancrofti*; *б* — *Brugia malaya*; *в* — *Loa loa*; *г* — *Onchocerca volvulus*;
д — *Diplotalonia perstans*; *е* — *Mansonella ozzardi* (окраска гематоксилином)