

МИНИСТЕРСТВО ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ УКРАИНЫ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

К 200-летию НФаУ

МИКРОБИОЛОГИЯ

РУКОВОДСТВО К ЛАБОРАТОРНЫМ ЗАНЯТИЯМ

*Учебное пособие
для студентов высших учебных заведений*

Под редакцией
доктора медицинских наук, профессора И. Л. Дикого

Харьков
Издательство НФаУ
«Золотые страницы»
2002

УДК 373.167.1
ББК 52.64
М59

Рекомендовано Министерством образования и науки Украины
(письмо № 14/18.2-1151 от 03.06.2002).

Авторы: И. Л. Дикий, И. И. Сидорчук, И. Ю. Холупяк,
Н. Е. Шевелева, М. М. Великая, Н. А. Волкова, Л. Ф. Силаева,
М. Ю. Стегний, О. П. Стрилец, О. Г. Гейдерих, В. Е. Литаров.

Рецензенты: А.Я. Цыганенко, профессор Харьковского государственного медицинского университета;

Г.П. Палий, доктор медицинских наук, профессор Винницкого государственного медицинского университета.

М59 **Микробиология:** Руководство к лаборатор. занятиям: Учеб. пособие для студентов высш. учеб. заведений / И. Л. Дикий, И. И. Сидорчук, И. Ю. Холупяк и др. — Х.: Изд-во НФАУ: Золотые страницы, 2002. — 444 с.

ISBN 966-615-133-2
ISBN 966-8032-45-4

В пособии представлены современные методы лабораторных исследований в области микробиологии, вирусологии, паразитологии и иммунологии. Изложены методы идентификации возбудителей инфекционных болезней.

Издание рассчитано на студентов и преподавателей фармацевтических и медицинских вузов, врачей-бактериологов, вирусологов и иммунологов.

УДК 373.167.1
ББК 52.64

ISBN 966-615-133-2
ISBN 966-8032-45-4

© Дикий И. Л., Сидорчук И. И., Холупяк И. Ю.,
Шевелева Н. Е., Великая М. М., Волкова Н. А.,
Силаева Л. Ф., Стегний М. Ю., Стрилец О. П.,
Гейдерих О. Г., Литаров В. Е., 2002
© НФАУ, 2002

ВВЕДЕНИЕ

Современная фармация — это интенсивно развивающаяся, многофункциональная отрасль естествознания и народного хозяйства, объединяющая наряду с разработкой и производством лекарственных препаратов фундаментально-прикладные достижения химических, фармацевтических, биологических, медицинских и инженерных наук.

В соответствии с этим Национальная фармацевтическая академия Украины, определяя перспективы развития отечественной фармации и обеспечения ее соответствующими кадрами, проводит подготовку специалистов новой формации по специальностям: классическая фармация, промышленная фармация, биотехнология, технология производства косметических средств, клиническая фармация, ветеринарная фармация, лабораторная диагностика.

Применительно к дисциплине «Микробиология» такая разноплановость специальностей в системе фармацевтического образования требует принципиального пересмотра действующей учебной программы, адаптации ее к новым специальностям, углубленного изучения и освоения не только классических, но и инновационных методик и технологий бактериологических, вирусологических и иммунологических исследований.

Созданное с учетом этих требований руководство по микробиологии состоит из двух разделов — общей и специальной микробиологии, в которых соответственно излагаемой тематике в полном объеме представлен информационно-методический и справочный материал, определены вопросы для самоподготовки, сформулированы задания и описан ход выполнения лабораторных работ.

Руководство рассчитано на студентов высших фармацевтических учебных заведений, врачей-лаборантов, представляет научно-практический интерес для бактериологов, вирусологов, иммунологов и биотехнологов.

УСТРОЙСТВО МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ И ПРАВИЛА РАБОТЫ В НЕЙ

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

Лабораторию оборудуют водопроводом, канализацией, центральным отоплением, обеспечивают электроэнергией, горячим водоснабжением и газифицируют.

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

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

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

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

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

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

Выполняя микробиологические исследования, необходимо соблюдать следующие правила:

- ✓ с инфицированным материалом работать только с помощью инструментов (пинцеты, петли, корнцанги и пр.);
- ✓ запрещается прикасаться руками к исследуемому материалу и конденсату в засеянных чашках;
- ✓ перед работой тщательно проверять целостность стеклянной посуды, проходимость игл и надежность поршней шприцев;
- ✓ при посеве материала делать надпись на пробирках, чашках Петри, колбах, флаконах с названием номера анализа (культуры) и даты посева;
- ✓ в пробирки и чашки Петри материал высевать вблизи от огня горелки с обжиганием петли, шпателя, краев пробирки;
- ✓ во время работы все чашки с посевами помещать в кюветы или на подносы, пробирки — в штативы;
- ✓ растворы, содержащие патогенные микроорганизмы, набирать пипеткой с помощью резинового баллона;
- ✓ нельзя насыщать ртом или переливать растворы из сосуда в сосуд через край;
- ✓ по окончании работы запрещается оставлять на рабочих столах нефиксированные мазки, чашки Петри, пробирки и другую посуду с инфицированным материалом.

Доставлять инфицированный материал в лабораторию и переносить его из одной лаборатории в другую на территории учреждения нужно в специально приспособленной посуде (металлических биксах, ящиках, баках).

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

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

Центрифугирование инфекционного материала проводит специально обученный персонал. Если в процессе центрифугирования

разбивается пробирка, содержащая инфекционный материал, центрифугу отключают от сети, дезинфицируют, а загрязненные места очищают.

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

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

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

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

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

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

- ✓ использованные при лабораторных исследованиях предметные стекла, пипетки, шпатели погружают на сутки в банки с дезинфицирующим раствором, затем моют и кипятят;
- ✓ отработанные чашки Петри и пробирки с посевами патогенных культур, посуду с использованным материалом, взятым от инфекционных больных, собирают в банки с крышками и стерилизуют паром под давлением;
- ✓ трупы зараженных животных помещают в сосуд с дезинфицирующим раствором и по окончании рабочего дня сжигают в специальных печах (крематориях) или автоклавируют в течение часа при температуре 120 °С;
- ✓ поверхности рабочих столов обрабатывают дезинфицирующим раствором;

- ✓ помещения боксов дезинфицируют с помощью бактерицидных ламп и путем обтирания оборудования, стен и столов дезинфицирующим раствором, бактерицидные лампы включают только в отсутствие персонала;
- ✓ руки обмывают дезинфицирующим раствором с последующим мытьем с мылом.

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

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

В лаборатории должна быть укомплектованная аптечка для экстренной профилактики и оказания медицинской помощи. В аптечке необходимо иметь: этиловый спирт, настойку йода, сухой марганцовокислый калий, перевязочные средства, сухие навески протаргола и азотнокислого серебра, а также необходимый набор антибиотиков.

Часть I

**Общая
микробиология**



Раздел 1.

МОРФОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Тема: ВИДЫ МИКРОСКОПИИ. НАЗНАЧЕНИЕ И ПРИНЦИПЫ ПРИМЕНЕНИЯ

Цель: Ознакомиться с принципами и методами изучения морфологии микроорганизмов.

Микроорганизмы можно увидеть при помощи оптического прибора — микроскопа. Микроскоп (от греч. *micro* — малый и *scopos* — смотрю) служит для изучения малых объектов, невидимых невооруженным глазом. В микробиологии микроскоп используется для исследования как живых, так и убитых микробов в окрашенном или неокрашенном виде. В микробиологической практике, в зависимости от целей объектов исследования, применяют различные виды микроскопии: светопольную, темнопольную, фазово-контрастную, аноптральную, люминесцентную, электронную.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Виды микроскопии: светопольная, темнопольная, фазово-контрастная, аноптральная, люминесцентная, электронная.
2. Устройство светопольного микроскопа и правила работы с ним. Иммерсионная система увеличения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Елинов И.И., Заикина И.А., Соколова И.П.* Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. — М.: Медицина, 1988. — С. 9–35.

СВЕТОПОЛЬНАЯ МИКРОСКОПИЯ. УСТРОЙСТВО СВЕТОПОЛЬНОГО МИКРОСКОПА И ПОРЯДОК РАБОТЫ С НИМ

Обычная светопольная (или световая) микроскопия предназначена для изучения окрашенных микроскопических препаратов, которые интенсивно поглощают свет.

На рис. 1 изображен светопольный биологический микроскоп. Его механическая часть состоит из основания (или штатива), коробки с микромеханизмом, предметного столика, тубусодержателя, бинокуляра, револьвера с объективами.

В штативе различают нижнюю часть (или ножку) и верхнюю часть (или колонку). К колонке, которая служит ручкой для переноса микроскопа, прикреплен подвижный предметный столик, на который помещается исследуемый объект. Он имеет центрировку и при помощи винтов передвигает препарат в двух взаимно перпендикулярных направлениях. Отсчет перемещения в обоих направлениях может производиться по шкалам и нониусу с точностью до 0,1 мм.

К верхней части колонки присоединяется труба микроскопа — тубус. Тубус является подвижной трубкой, к которой прикрепляются линзы, служащие для увеличения исследуемого объекта. Тубус приводится в движение вверх и вниз двумя системами винтов: макровинтом и микровинтом для тонкой фокусировки.



Рис. 1. Светопольный биологический микроскоп:

1 — окуляр (бинокуляр); 2 — тубус; 3 — головка для крепления тубуса и револьвера; 4 — револьвер; 5 — объектив; 6 — предметный столик; 7 — тубусодержатель; 8 — микрометрический винт; 9 — макрометрический винт; 10 — конденсор с диафрагмой; 11 — основание; 12 — осветитель

Для грубой наводки служит зубчатка, или кремальера, приводимая в движение макрометрическим винтом. Этим винтом пользуются при

малых, а также при больших увеличениях для грубой первоначальной установки. Перемещение тубуса рукояткой макровинта возможно в пределах 50 мм.

Для более точной установки служит микрометрический винт. На правой рукоятке тонкой фокусировки закреплен барабан со шкалой, разделенной на 50 частей. Цена одного деления шкалы барабана 0,002 мм. Один оборот барабана соответствует перемещению тубуса на 0,1 мм. Общая величина перемещения тубуса от упора до упора равна 2,2–2,4 мм. Микрометрический винт является одной из наиболее хрупких частей микроскопа, и обращение с ним требует особой осторожности.

Передвигая тубус при помощи этих двух винтов, его устанавливают так, чтобы получить наиболее ясную микроскопическую картину; это достигается, когда расстояние от рассматриваемого объекта до объектива равно фокусному расстоянию этого объектива.

Верхняя часть тубусодержателя заканчивается головкой, служащей для крепления револьвера и тубуса. В верхней части тубуса расположен окуляр, а к нижней части его прикреплен револьвер, в гнезда которого ввинчиваются объективы. Револьвер вращается вокруг своей оси, что позволяет поставить тот или другой объектив при желании получить большее или меньшее увеличение.

Оптическая часть микроскопа состоит из объективов, окуляра и осветительного устройства.

Осветительное устройство находится под предметным столиком и состоит из зеркала и конденсора с диафрагмой. Зеркало служит для отражения световых лучей по направлению к объективу и через него внутрь микроскопа. Одна сторона зеркала плоская, другая — вогнутая. Плоским зеркалом пользуются при дневном рассеянном свете, а вогнутым — при искусственном освещении.

Конденсор представляет собой двояковыпуклую линзу, прикрепляемую снизу предметного столика с таким расчетом, чтобы линза конденсора располагалась под отверстием предметного столика. Конденсор служит для собирания (конденсации) пучка световых лучей, что обеспечивает наибольшее освещение исследуемого предмета.

При микроскопировании с дневным светом конденсор необходимо поднять до уровня предметного столика; при искусственном освещении конденсор опускают до тех пор, пока при малом увеличении изображение источника света не появится в плоскости препарата. При микроскопии неокрашенных препаратов конденсор следует также опустить.

Между зеркалом и конденсором помещается диафрагма, которая регулирует объем лучей, падающих на объектив. Она состоит из стальных лепестков и при помощи рычага может менять свой диаметр. Окрашенные препараты следует рассматривать при открытой диафрагме; при изучении неокрашенных препаратов необходимо уменьшить отверстие диафрагмы.

Объективы представляют собой систему двояковыпуклых линз, заключенных в металлическую оправу. Передняя (фронтальная) линза объектива является главной, производящей увеличение. Лежащие за ней линзы корректируют изображение и поэтому называются коррекционными.

Степень увеличения исследуемого объекта зависит от кривизны линзы используемого объектива. Чем меньше кривизна линзы, тем меньше увеличение и, наоборот, чем больше кривизна линзы, тем больше увеличение. Обычно объективы микроскопа имеют цифровое обозначение длины фокусного расстояния, которое зависит от кривизны линзы: чем более выпукла поверхность линзы, тем меньше фокусное расстояние и тем больше получаемое увеличение.

Характеристика объектива включает его собственное увеличение, фокусное расстояние, числовую апертуру. Чем меньше фокусное расстояние, тем сильнее объектив, больше его собственное увеличение. На корпусе объектива выгравированы обозначения собственного увеличения ($\times 8$, $\times 20$, $\times 40$, $\times 90$) и числовая апертура. Числовая апертура — произведение показателя преломления среды на синус половины отверстия угла — для объектива характеризует угол, под которым еще может входить в объектив наклонный луч. Кроме этих обозначений, на корпусе объективов-апохроматов пишется «апохр» и на иммерсионных «ОИ» или «МИ» — объектив иммерсионный (масляный) или «ВИ» — водная иммерсия.

Объективы бывают двух систем: ахроматы и апохроматы. Ахроматы устроены проще, но имеют ряд недостатков, которые устранены в более сложных апохроматических объективах. При применении объективов-апохроматов достигается полная ясность изображения и устраняется хроматическая абберация. Последнее особенно важно при микроскопии цветных объектов. Все объективы (ахроматы и апохроматы) разделяются на сухие и иммерсионные. Если между объективом и рассматриваемым препаратом находится воздух, то подобный объектив называется сухим. Если же объектив погружен в жидкость, заполняющую пространство между его фронтальной линзой и препаратом, то подобный объектив называется погруженным, или иммерсионным

(immersio — погружаю). При исследовании микробов применяется исключительно иммерсионная, или погружная, система объективов.

Иммерсионные объективы имеют преимущество перед сухими. Сравнительный ход световых лучей в сухой и иммерсионной системах представлен на рис. 2. При микроскопии с помощью сухой системы световые лучи, идущие от зеркала через конденсор в объектив, проходят через неоднородные среды, различающиеся показателями преломления. Так, из воздуха (показатель преломления 1,0) пучок световых лучей попадает в стекло (показатель преломления 1,5), затем опять в воздух и, наконец, во фронтальную линзу объектива. При каждом из этих переходов часть лучей, преломляясь на границе разнородных сред, отклоняется в сторону и не попадает в объектив. В результате поле зрения освещается недостаточно, что особенно важно при пользовании сильными увеличительными системами, где очень малы фронтальные линзы. Чтобы избежать этого, объектив погружают в каплю жидкости (иммерсионное масло, вода), показатель преломления которой близок к показателю преломления стекла. Вторую каплю этой же жидкости наносят на конденсор. Таким образом, конденсор, жидкость, препарат и объектив представляют собой единую систему, не вызывающую отклонения светового луча.

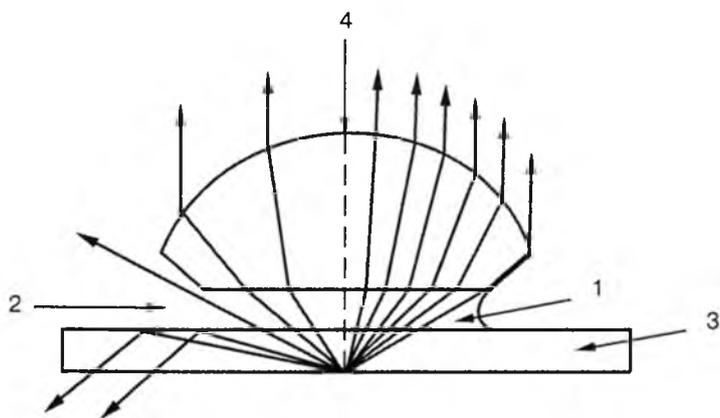


Рис. 2. Ход световых лучей в сухой и иммерсионной системах:
1 — иммерсионное масло; 2 — воздух; 3 — предметное стекло;
4 — фронтальная линза иммерсионного объектива

Окуляр (от лат. слова *oculus* — глаз) состоит из двух плосковыпуклых линз (собирающей и глазной). Он увеличивает изображение, получаемое с помощью объектива, в 7, 10 или 15 раз. Такие простые

окуляры обычно применяют с ахроматическими объективами. При работе с апохроматами нужно использовать специальные, так называемые компенсационные, окуляры. В них линзы подобраны таким образом, что они дают хроматическую ошибку, обратную остаточному хроматизму апохромата и потому ее компенсирующую. Следует иметь в виду, что увеличивает объект только объектив, окуляр же увеличивает не исследуемый предмет, а только его изображение, получаемое в объективе.

Общее увеличение микроскопа равняется произведению увеличения объектива на увеличение окуляра. Так, например, комбинация иммерсионного объектива $\times 90$ с окуляром $\times 10$ дает увеличение объекта в 900 раз.

Качество микроскопа зависит не только от увеличения исследуемого объекта, но и определяется его разрешающей силой. Под последней следует понимать то наименьшее расстояние между двумя точками препарата, изображения которых можно отчетливо различить под микроскопом. Чем меньше это расстояние, тем больше разрешающая сила.

Разрешающая сила биологического микроскопа с иммерсионной системой равна 0,2 мкм. Следовательно, при пользовании таким микроскопом пределом видимости являются объекты размером не меньше 0,2 мкм.

Нужно помнить, что иммерсионный объектив требует особого, бережного обращения с ним. Опускать этот объектив нужно осторожно, чтобы не раздавить стекло препарата, что влечет за собой порчу фронтальной линзы. Погружать иммерсионный объектив в каплю масла на предметном стекле надо под контролем глаза, наблюдая сбоку, причем глаз должен находиться на уровне предметного столика. После погружения объектива в каплю масла, глядя в окуляр, при помощи макрометрического винта осторожно опускают тубус микроскопа, пока не находят в поле зрения контуры препарата. Затем с помощью микрометрического винта устанавливают точное изображение объекта.

По окончании микроскопирования поднимают тубус микроскопа, а затем снимают препарат; фронтальную линзу осторожно вытирают мягкой тряпочкой, иногда смачивая ее спиртом, разведенным водой 1:1.

Освещение. При работе с конденсором Аббе независимо от источника света нужно пользоваться только плоским зеркалом.

Осветительное устройство (или осветительный аппарат Аббе) составляют зеркало, ирис-диафрагма и конденсор. Зеркало, благодаря тому, что его оправа вмонтирована в специальной вилке, может вращаться в двух взаимно перпендикулярных направлениях. Одна из отражающих поверхностей зеркала плоская, другая — вогнутая.

Современная ирис-диафрагма, сокращаясь по типу зрачка, позволяет регулировать величину светового пучка, поступающего в конденсор. Это важно потому, что светосила (апертура) конденсора всегда должна быть немного меньше, чем у объектива.

Конденсор представляет собой систему линз, вмонтированных в коническую металлическую оправу. Чем больше линз, тем больше светосила конденсора. Для получения отчетливого изображения необходимо, чтобы препарат оказался в фокусе конденсора. С этой целью конденсор передвигается в вертикальном направлении в пределах 20 мм.

Ход лучей. Пучок света, отраженный зеркалом, через диафрагму попадает в конденсор. Преломившись в его линзах, лучи попадают на препарат в виде конуса, вершина которого обращена к препарату. Пройдя сквозь препарат, лучи вновь расходятся в виде конуса и попадают в объектив. Преломившись в линзах объектива, лучи на выходе из него дают увеличенное, но обратное изображение. Это изображение строится лучами на некотором расстоянии от задней линзы объектива, на уровне диафрагмы окуляра, т. е. в финальной плоскости глазной линзы. Из окуляра лучи проходят в глаз, и на его сетчатке возникает мнимое, увеличенное, обратное изображение. Таким образом, объектив увеличивает рассматриваемый предмет, а окуляр увеличивает изображение. Следовательно, способность микроскопа к увеличению есть сумма увеличений, обеспечиваемых объективом и окуляром. Большинство объективов дает наилучшее изображение при длине тубуса 160 мм, а окуляры, как правило, рассчитаны на расстояние 250 мм, что соответствует расстоянию нормального невооруженного глаза от читаемого текста.

Общее увеличение микроскопа (V) может быть определено с учетом этих данных по формуле:

$$V = \frac{160}{F_{об}} \cdot \frac{250}{F_{ок}},$$

где $F_{об}$ — фокусное расстояние объектива;

$F_{ок}$ — фокусное расстояние окуляра.

Хорошее освещение достигается при установке света по методу Келлера. Для этого устанавливают осветитель на расстоянии 30–40 см от микроскопа и, перемещая патрон с лампочкой или весь осветитель, добиваются четкого изображения нити накала лампы на закрытой полностью диафрагме конденсора так, чтобы это изображение полностью заполняло отверстие конденсора. Закрыв диафрагму осветителя, открывают диафрагму конденсора и, перемещая конденсор, добиваются

резкого изображения диафрагмы осветителя в поле зрения микроскопа. С помощью зеркала изображение отверстия диафрагмы устанавливают в центре поля зрения, а диафрагму осветителя открывают так, чтобы было освещено все видимое поле зрения. Раскрывать больше диафрагму не нужно, так как это не усилит освещенности, а лишь уменьшит контрастность за счет рассеянного света.

Общие правила работы с микроскопом. Современный микроскоп — это оптический прибор, требующий строгого соблюдения ряда правил при работе с ним. Они касаются обращения с прибором и ухода за ним, а также применения правильного освещения, выбора в каждом конкретном случае наилучшего варианта оптической системы (окуляр — объектив — конденсор) и т. п.

Для защиты от пыли микроскоп нужно хранить под чехлом. Время от времени следует проверять чистоту и состояние оптики и протирать ее, но только снаружи. Для чистки оптики применяют волосяную кисточку или мягкую ткань, смоченные этиловым спиртом, разбавленным водой (1:1), но ни в коем случае не применяют бензин или ксилол во избежание расклеивания линз. Механические трущиеся части протирают ксилолом или бензином, а затем смазывают маслом.

ТЕМНОПОЛЬНАЯ МИКРОСКОПИЯ

Движение бактерий и спирохет можно наблюдать в темнопольном микроскопе, который отличается от обычного светового способом освещения препарата. В этом случае применяют боковое освещение, в силу чего получается изображение светящегося объекта на темном фоне. Принцип темного поля основан на том, что падающие сбоку световые лучи отклоняются плотными частицами (в частности, микробами) и последние благодаря этому представляются глазу наблюдателя ярко светящимися. Боковое освещение в микроскопе можно получить, заменив обычный осветитель специальным конденсором с затемнением в центре. Такой конденсор задерживает все центральные лучи света и пропускает лишь периферические. Вместо специального конденсора для темного поля можно пользоваться обычным осветителем, между двумя линзами которого вставляют кружок черной бумаги несколько меньшего диаметра, чем линза. Работать надо с сильным источником света. Техника исследований заключается в следующем. На предметное стекло наносят каплю материала и осторожно накрывают покровным стеклом, чтобы не было пузырьков газа. Затем на поверхность конденсора помещают каплю воды или кедрового масла, и предметное стекло с препаратом кладут на эту каплю.

Препарат рассматривают либо через сильную сухую систему (объектив $\times 40$), либо через иммерсионную систему. В последнем случае на покровное стекло также наносят каплю кедрового масла, а к иммерсии привинчивают маленькую муфточку — диафрагму, чтобы сузить диаметр просвета объектива.

При микроскопии этим методом лучи, освещающие объект, не попадают в объектив микроскопа, поле зрения остается темным, а объект на его фоне кажется светящимся (см. цв. вкл. 1). Эффект темного поля создается при помощи специального конденсора (параболоид или кардиоид) или обычного конденсора с прикрытой кружком черной бумаги центральной частью.

Для наблюдения в темном поле свет устанавливают и центрируют, как для светлого поля, и, заменив конденсор специальным, прибавляют свет до максимума, раскрыв до отказа диафрагму и включив реостат осветителя.

Препараты для исследования в темном поле должны быть приготовлены на очень чистых предметных и покровных стеклах определенной толщины: предметные — не более 1,2 мм, покровные — 0,17 мм. Готовят препарат по типу «раздавленной» или «висячей» капли (рис. 3).

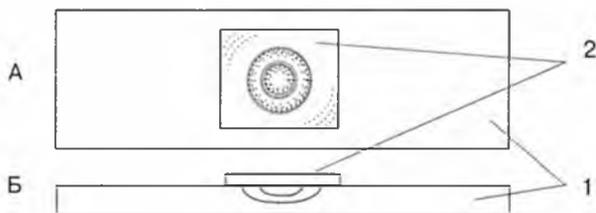


Рис. 3. Схема препарата «висячая капля»:

1 — предметное стекло с лункой; 2 — покровное стекло; А — вид сверху; Б — вид сбоку

Между препаратом и конденсором помещают иммерсионное масло (каплю его наносят на верхнюю линзу конденсора). После этого, поднимая и опуская конденсор, добиваются появления в поле зрения светлого пятна, которое с помощью специальных регулировочных винтов конденсора выводят в середину поля зрения. Затем с помощью нужного увеличения переходят к наблюдению.

ФАЗОВО-КОНТРАСТНАЯ И АНОПТРАЛЬНАЯ МИКРОСКОПИЯ

Фазово-контрастный микроскоп значительно повышает контрастность объектов, проницаемых для света, и используется для изучения

нативных препаратов. С помощью этого метода могут быть исследованы без предварительной обработки бесцветные, прозрачные объекты, детали, строение которых оптически мало различается между собой (см. цв. вкл. II).

Окрашенные препараты частично поглощают свет. Пучок света, проходящий через такой препарат, теряет свою интенсивность, т. е. уменьшается амплитуда световой волны, и это легко улавливается глазом исследователя. Такие препараты контрастны даже в обычном микроскопе и называются «амплитудными». Препараты, не поглощающие свет, прозрачны. Пучок света, проходящий через такой препарат, не теряет своей интенсивности. Амплитуда световой волны не изменяется, а лишь изменяется фаза колебания, что не регистрируется человеческим глазом. Такие объекты называются фазовыми. К ним относятся живые, неокрашенные препараты. Чтобы повысить контрастность изображения, необходимо превратить фазовые изменения в амплитудные. Это достигается путем помещения в объективы фазовой пластинки в форме кольца и применением кольцевой диафрагмы. Каждому объективу соответствует своя диафрагма. Изображение этой диафрагмы совпадает с кольцом фазовой пластинки соответствующего объектива. Метод фазовых контрастов может быть положительным и отрицательным. В первом случае на светлом фоне поля наблюдается темное изображение объекта, а во втором — фон темный, а объект светлый. Наилучшие результаты наблюдаются в случае положительного контраста.

Распространение световых волн в прозрачных однородных объектах не сопровождается потерей интенсивности света. Меняется только скорость прохождения светового потока через объект по сравнению со скоростью распространения света в окружающей среде. Она будет большей или меньшей в зависимости от того, будет ли показатель светопреломления объекта соответственно меньше или больше, чем в окружающей среде. Эти изменения, называемые иначе фазовыми, так как при них меняется только фаза колебаний прошедшего света, характерны для большинства биологических объектов (живых клеток, срезов тканей и т. п.).

Человеческий глаз хорошо определяет изменения интенсивности света, наступающие при прохождении через окрашенные (амплитудные) препараты, когда меняется амплитуда колебаний света. Однако глаз не способен воспринимать фазовые изменения света. Поэтому прозрачные неконтрастные (фазовые) объекты при обычном микроскопическом исследовании остаются невидимыми.

Для работы по методу фазового контраста нужно, кроме обычного биологического микроскопа, иметь еще специальное устройство. Уста-

новку устройства производят следующим образом. Конденсор и объектив заменяют фазовыми. Фазовый конденсор поворотом револьверного диска устанавливают на 0. Это положение соответствует обычному светопольному конденсору. Затем, поместив на предметный столик препарат и сфокусировав его, приступают к наладке освещения. При исследовании методом фазового контраста основным условием является оптимальная освещенность, которая достигается установкой света по Келеру. После этого устанавливают револьверный диск на то число, которое соответствует выбранному объективу; например, при объективе $\times 40$ в окошечке также устанавливают цифру 40. Вынув окуляр, на его место устанавливают вспомогательный микроскоп и настраивают его на изображение двух колец (кольцевая диафрагма конденсора и фазовая пластинка). Центровочным устройством конденсора добиваются совмещения колец. Заменяв вспомогательный микроскоп окуляром, можно производить исследование препарата.

Метод аноптрального контраста является усовершенствованием метода фазового контраста. Теоретические обоснования и конструктивные особенности аноптрального устройства в основном не отличаются от обычной фазово-контрастной установки. Принцип его устройства заключается в следующем. На верхнюю поверхность предпоследней линзы иммерсионного объектива наносится кольцо из сажи, пропускающей лишь около 10 % проходящего света. В передней фокальной плоскости конденсора помещается кольцевая диафрагма, изображение которой должно полностью совпадать с кольцом сажи на объективе. Препарат освещается полным конусом лучей, проходящих через кольцевую диафрагму конденсора. При отсутствии объектов (например, микроорганизмов в препарате) в объектив попадают только недифрагированные лучи, амплитуда которых, после того как они пройдут через кольцо сажи, уменьшится на 90 %. В то же время амплитуда лучей, дифрагированных частицами объекта, которые пройдут мимо кольца из сажи, не изменится и поэтому фон поля будет темный, а частицы объекта светлыми. Преимуществом метода аноптральной микроскопии является большая разрешающая способность объективов и возможность выявления минимальных оптических разностей плотности в неокрашенных препаратах. Чем больше оптическая плотность объекта, тем светлее его изображение. Методика использования устройства не отличается от фазово-контрастного. При помощи аноптрального микроскопа можно изучать морфологию и локализацию нуклеоидов, наблюдать за изменениями морфологии бактерий в процессе нормального роста и размножения.

ЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ

Люминесценция, т. е. свечение вещества, возникает в результате превращения энергии, поглощаемой веществом, в видимое излучение. Люминесценцией (или флуоресценцией) называют такое явление, когда некоторые вещества под влиянием падающего на них света испускают лучи с другой (обычно большей) длиной волны. Кроме того, вещества, имеющие определенный цвет при обычном освещении, при освещении ультрафиолетовыми лучами приобретают совершенно иной цвет. Объект, не видимый в ультрафиолетовом свете, может приобрести яркий блеск после обработки его флуоресцирующим веществом. В таком препарате люминесцирующие объекты светятся различным цветом в темном поле зрения (см. цв. вкл. III). Сила их света бывает различной, но чаще всего она невелика, поэтому люминесцентную микроскопию следует проводить в затемненном помещении.

Разница между микроскопией в проходящем свете и флуоресценцией заключается в том, что в последнем случае препарат рассматривается в излучаемом им свете. При этом химический состав клеток и тканей влияет на качество люминесценции, и люминесцентная микроскопия в определенной мере является гистохимическим исследованием. Существует первичная и вторичная флуоресценция. При первичной флуоресценции в самом объекте находятся вещества, способные флуоресцировать. Вторичная флуоресценция — наведенная, возникает при специальной обработке объекта веществами, способными флуоресцировать. Эти вещества называются флуорохромами (акридин оранжевый, флуоресцеин, родамин и др.).

Для люминесцентной микроскопии применяется целый ряд устройств и микроскопов. Основной частью этих устройств является осветитель, имеющий лампу ультрафиолетового света, и система фильтров к нему. В зависимости от того, используется ли ультрафиолетовый или синий цвет для возбуждения люминесценции, между источником света и объектом помещаются соответствующие фильтры. Так как люминесценция микроскопического объекта энергетически слабее, чем возбуждающий свет, то она улавливается лишь в том случае, если излишек лучей, идущих от источника света, отсекается желто-зеленым фильтром, помещенным на окуляре микроскопа. Эффект люминесценции наиболее полно выражен в том случае, когда фильтр на окуляре микроскопа полностью отсекает лучи, идущие от источника света. При этом при отсутствии люминесцирующего препарата получается темное поле зрения.

Установка для люминесцентной микроскопии в видимых лучах состоит из яркого источника света и биологического микроскопа. Между зеркалом микроскопа и источником света устанавливается синефиолетовый светофильтр (УФС-3, ФС-1 и т. п.). Желтый светофильтр (ЖС-3 или ЖС-18) надевают на окуляр микроскопа. С помощью этих светофильтров на препарат падает сине-фиолетовый свет, возбуждающий люминесценцию. Однако этот свет мешает видеть возбуждаемое им свечение препарата и поэтому по пути к глазу наблюдателя отсекается желтым светофильтром.

Установку освещения производят по методу Келера за одним исключением: диафрагма конденсора должна быть полностью открыта. Очень важно применение нефлуоресцирующего иммерсионного масла. С целью гашения собственной флуоресценции к кедровому или другому иммерсионному маслу добавляют на 1 г от 2 до 10 капель нитробензола.

Люминесцентная микроскопия находит широкое применение в микробиологии. Ее преимуществами являются: 1) цветное изображение; 2) высокая степень контрастности самосветящихся объектов на черном фоне; 3) возможность исследования как прозрачных, так и непрозрачных живых объектов; 4) возможность исследования различных жизненных процессов в динамике их развития; 5) обнаружение и установление локализации отдельных микробов; 6) развитие тончайших методов цито- и гистохимии; 7) экспресс-диагностика инфекций.

ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

В 1932 г. был изобретен электронный микроскоп, в котором вместо световых лучей использован поток электронов, излучаемый особым источником, так называемой электронной пушкой. Оптические линзы в этом микроскопе заменены электромагнитными.

В электронном микроскопе имеются следующие электромагнитные линзы: конденсорная, объективная и проекционная. Исследуемый объект, помещенный на пути электронов, отражается на люминесцирующем экране, воспринимающем поток электронов в виде густой тени, соответствующей контурам объекта.

Препараты из исследуемых микроорганизмов готовят на тончайших коллоидных пленках и помещают в приемную камеру микроскопа. Конечную картину наблюдают на люминесцирующем экране. В электронном микроскопе можно рассматривать объекты, размеры которых в 50–100 раз меньше видимых в световом микроскопе (вирусы, ультраструктура клеточных форм микроорганизмов) (см. цв. вкл. IV–VIII).

Возможности оптических микроскопов ограничиваются не числом линз, а слишком большой длиной волны видимого света (600 нм). Объекты, диаметр которых меньше этой величины, или линии, разделенные расстоянием менее 200 нм, находятся за пределами разрешающей способности светового микроскопа. Применение вместо световых волн потока движущихся электронов позволило создать электронный микроскоп. Электронный поток вызывает свечение флуоресцирующего экрана. Если же на пути электронов поместить какой-либо объект, то в зависимости от его плотности электроны будут больше или меньше задерживаться, а соответствующие места на экране или фотопластинке окажутся более или менее затемненными. Этот простой принцип в современном электронном микроскопе дополнен принципом отклонения электронных лучей в магнитном поле подобно тому, как световые лучи отклоняются стеклянными линзами.

Источником электронного потока служит катодная лампа с вольфрамовой нитью, которая разогревается до 2500 °С. Освобождающиеся при этом электроны летят в вакууме с большей или меньшей скоростью по направлению к аноду. В этом движении скорость определяет напряжение, существующее между анодом и катодом. Чем больше напряжение, тем выше разрешающая способность электронного микроскопа. Анод имеет в центре отверстие, через которое электроны летят в направлении к конденсору. Возле катода расположен отрицательно заряженный цилиндр, как бы сужающий пучок электронов, которые, будучи отрицательно заряжены, отталкиваются от стенок цилиндра в середину.

Все это устройство в микроскопах большинства систем расположено наверху, и пучок электронов направляется вниз. Объект исследования находится на их пути и отклоняет электронный луч тем сильнее, чем толще и плотнее его структура. При напряжении около 200 000 В, если препарат тонкий, можно обнаружить самые нежные структуры, получить увеличение до 200 000 раз и увидеть объекты размером 0,002 мкм.

Путь электронного пучка от объекта до фотографической пластинки лежит вне электрических или магнитных полей, которые, подобно линзам в световом микроскопе, концентрируют и направляют электронные лучи. Наконец, после ряда увеличений, которое претерпевает изображение объекта, оно воспринимается на фотографической пластинке. Все виды фотопластинок чувствительны к электронному лучу. По пути прохождения электронного пучка он дважды может быть перехвачен и отброшен на поверхность экрана-пластинки, покрытой сульфидом цинка, где изображение объекта можно увидеть невооруженным глазом.

В некоторых системах электронных микроскопов имеются дополнительные приспособления для стереоскопической микроскопии, для наблюдения в темном поле зрения. Различные системы дают разное увеличение — от 1000 до 500 000 раз. Установки эти пока еще сложны и требуют квалифицированного обслуживания (рис. 4).



Рис. 4. Электронный микроскоп

Тема: МЕТОДЫ ПРИГОТОВЛЕНИЯ И ОКРАСКИ ПРЕПАРАТОВ

Цель: Ознакомиться с принципами и методами изучения морфологии микроорганизмов; освоить технику микроскопического исследования и окраски микроорганизмов.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Основные этапы приготовления микроскопических препаратов живых клеток (препараты «висячая и раздавленная капли»).

2. Основные этапы приготовления микроскопических препаратов фиксированных клеток (приготовление мазка, высушивание, способы фиксации).

3. Виды красителей, их классификация.

4. Методы прижизненной окраски микробов.

5. Простые методы окраски.

6. Дифференциально-диагностический метод окраски по Граму.

7. Методы окраски спор, капсул, жгутиков.

8. Методы, используемые для окраски риккетсий, хламидий, микоплазм, спирохет, простейших.

9. Методы микроскопического исследования актиномицетов и грибов.

10. Микроскопия вирусов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дикий И.Л., Холуляк И.Ю., Шевелева Н.Е., Стегний М.Ю. Микробиология.— Х.: Прапор: Изд-во УкрФА, 1999.— С. 18–50.

2. Елинов Н.П., Заикина Н.А., Соколова И.П. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии.— М.: Медицина, 1988.— С. 9–35.

ПОДГОТОВКА ПРЕДМЕТНЫХ И ПОКРОВНЫХ СТЕКОЛ

Предметные и покровные стекла, употребляемые для приготовления препаратов, должны быть чистыми и хорошо обезжиренными. Это может быть достигнуто разными способами. Стекла кипятят 15 мин в 1 % растворе соды (или мыльной воде), споласкивают водой, кладут

в слабую хлористоводородную кислоту и хорошо промывают водой. Или же сначала выдерживают стекла 2 ч в концентрированной серной кислоте, затем моют их в воде, кипятят в щелочи, вновь промывают водой. Стекла можно также обрабатывать жидкостью следующего состава (по Цеттнову): Kalii bichromici 20 г, Acidi sulfurici crudi 20 г, воды 200 мл. После 10 мин кипячения в этой смеси стекла промывают 5 мин в слабом растворе щелочи, а затем промывают водой и, наконец, спиртом. Хранят стекла в сосудах (банках) с притертыми пробками в смеси равных количеств спирта и эфира или в 96° спирте, либо промытыми и вытертыми досуха.

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В ЖИВОМ СОСТОЯНИИ

Исследование микроорганизмов в живом состоянии применяется, главным образом, для изучения формы и подвижности бактерий, реже при реакции агглютинации. Для этих целей готовят препараты «раздавленная капля» и «висячая капля».

Препарат «раздавленная капля». При приготовлении «раздавленной» капли жидкость с исследуемым материалом наносят на предметное стекло и сверху накладывают покровное. Капли материала надо брать такой величины, чтобы они заполняли все пространство между покровным и предметным стеклами и не выступали за края покровного.

Препарат «висячая капля». Для «висячей» капли необходимо иметь предметное стекло с луночкой. На покровное стекло предварительно наносят каплю жидкости с исследуемой культурой микроорганизмов. Затем на покровное стекло накладывают предметное стекло с луночкой посередине, края которой предварительно смазаны вазелином. Предметное стекло слегка прижимают к покровному, в результате чего оба стекла склеиваются. После этого препарат перевертывают покровным стеклом кверху. Получается герметически закрытая камера, в которой капля долго не высыхает.

Для предотвращения быстрого высыхания препараты рекомендуется помещать во влажную камеру (чашку Петри), на дно которой положено 2–3 влажных кружка фильтровальной бумаги, покрытых двумя сухими.

При изучении препаратов «раздавленная» и «висячая капля» под световым микроскопом край капли сначала отыскивают со слабым увеличением и при суженной диафрагме, а потом исследуют препарат при помощи более сильного увеличения. Более удобными для их микроскопического изучения представляются такие виды микроскопии, как темнопольная, фазово-контрастная и аноптральная.

ПРЕПАРАТЫ ФИКСИРОВАННЫХ ОКРАШЕННЫХ КЛЕТОК. ПРИГОТОВЛЕНИЕ МАЗКА И ФИКСАЦИЯ ПРЕПАРАТА

Исследование бактерий в окрашенном препарате дает возможность не только изучить их морфологию, но и получить представление о некоторых деталях их химического строения. Это достигается применением специальных методов.

Техника приготовления препаратов. В зависимости от характера исследуемого материала при его заборе используют бактериологическую петлю, пастеровскую пипетку или иглу. Петлю делают из платиновой или нихромовой нити длиной 5–6 см, закрепляют в петледержателе или вплавляют в стеклянную палочку. Конец проволоки сгибают в виде плотно замкнутой петли размером 1×1,5 или 2×3 мм. Петлю держат, как карандаш. Рабочую часть петли прожигают в пламени горелки в вертикальном положении, сначала конец петли, затем постепенно всю металлическую часть. Обезжиренное предметное стекло прожигают в пламени горелки. Пробирку с изучаемой культурой микроорганизмов держат между указательным и большим пальцами левой руки. Бактериологическую петлю берут правой рукой и прожигают ее в пламени горелки. Не выпуская петли из правой руки, мизинцем прижимают пробку к ладони и вынимают из пробирки. Во время манипуляции с пробиркой пробка находится в руке. Прожигают пробку и горло пробирки в пламени горелки. Вводят петлю в пробирку. Охлаждают петлю о стенку пробирки, чтобы горячая петля не убила выросшую культуру. Захватывают петлей культуру и выводят ее из пробирки, не касаясь стенок. Держа петлю с культурой, закрывают пробирку пробкой над пламенем горелки. Ставят пробирку в штатив. Из жидких культур каплю материала наносят на предметное стекло бактериальной петлей и равномерно распределяют по центру предметного стекла. Из культуры микроорганизмов на плотной среде бактериальной петлей делают забор микробной массы и размещают в заранее нанесенной на предметное стекло капле водопроводной воды. Остатки культуры на петле сжигают в пламени горелки. Мазок должен быть тонким, равномерно растертым и небольшим. Мазок высушивают на воздухе при комнатной температуре.

Приготовление мазка из гноя или мокроты

Материал забирают стерильной пипеткой или петлей и наносят на середину предметного стекла. Затем вторым предметным стеклом покрывают первое так, чтобы остались свободными треть первого и

второго стекол. Стекла раздвигают в стороны и получают два отдельных больших мазка.

Приготовление мазков из крови

Каплю крови наносят на границу между левой и средней третью предметного стекла. Затем краем второго специально отшлифованного стекла прикасаются к капле крови, располагая стекло под углом в 45° . Прижимая отшлифованное стекло к предметному, продвигают его. Хорошо сделанный мазок имеет желтоватый цвет и просвечивает.

Приготовление мазков-отпечатков из внутренних органов трупов и пищевых продуктов твердой консистенции

Раскаленным скальпелем прижигают поверхность органа или пищевого продукта и из этого участка вырезают кусочек материала. Разрезанной поверхностью прикасаются к стеклу в 2–3 местах.

Фиксация мазка

После полного высыхания мазки фиксируют, чем достигается умерщвление микробов и прочное прикрепление их к стеклу. Фиксация резко улучшает окрашиваемость микробов, которые в живом виде слабо воспринимают краски. Самый простой и распространенный способ — фиксация жаром. Держа стекло мазком вверх, его трижды проводят через пламя газовой или спиртовой горелки (мазком вверх). Во избежание перегрева препарата время фиксации не должно превышать 5–6 с, а время прямого воздействия пламени — 2 с. Кроме жара, для фиксации могут быть применены следующие вещества:

1. Этиловый 95° спирт. Время фиксации 10–15 мин.
2. Смесь равных объемов абсолютного спирта и эфира (по Никифорову) — 10–15 мин.
3. Метиловый спирт — 5 мин.
4. Ацетон — 5 мин.
5. 1 % раствор сулемы — 10–15 мин и затем промывание препарата раствором NaCl и водой.
6. 10 % раствор AgNO_3 — 10 мин.
7. Жидкость Буэна: формалина неразбавленного 10 мл, ледяной уксусной кислоты 2 мл и насыщенного водного раствора пикриновой кислоты 30 мл.
8. Жидкость Карнуа: ледяной уксусной кислоты 10 мл, хлороформа 30 мл и 96° спирта 60 мл.

ОКРАСКА ПРЕПАРАТОВ

Способность микроорганизмов к окрашиванию различными красителями определяет их тинкториальные свойства.

Методы окраски микробов разнообразны и многочисленны. В бактериологической работе наиболее употребительны приводимые ниже рецепты красок и способы окраски препаратов, которые в основном можно разделить на две группы: ориентировочные простые окраски и окраски дифференциальные, выявляющие химические и структурные особенности бактерий.

ВИДЫ КРАСИТЕЛЕЙ

Красители, применяемые для бактериологических исследований, относятся к группе так называемых анилиновых. Они разделяются на «основные» и «кислые». Термины «кислые» и «основные» только определяют сродство краски к определенной части клетки. Основными красками хорошо окрашиваются ядерный хроматин и микробы. Кислые краски окрашивают микробов слабее, при окраске же тканей они окрашивают протоплазму клеток. Наиболее употребительны следующие краски: метиленовый синий, тионин (синие краски), основной фуксин, сафранин и эозин (красные), бисмарк-браун, или везувин (коричневая), метилгрюн (зеленая), метилвиолет, генцианвиолет, кристаллвиолет (фиолетовые). Из них только эозин — кислая краска; она употребляется для некоторых специальных целей. Все эти краски продаются в виде аморфных или кристаллических порошков, из которых готовят красящие растворы.

Приготовление красящих растворов. Исходным материалом почти для всех необходимых рабочих красок являются насыщенные спиртовые растворы, которые следует иметь в запасе и сохранять в склянках с притертыми пробками. Насыщенные спиртовые растворы готовят следующим образом: 10 г сухой краски насыпают во флакон с притертой пробкой, наливают 100 мл 96° спирта (ректификата) и дают настояться в течение нескольких дней, каждый день взбалтывая раствор. Из таких насыщенных растворов готовят спиртово-водные растворы, пригодные для окраски микробов. Наиболее часто употребляются следующие растворы:

Карболовый фуксин (фуксин Циля)

10 мл насыщенного спиртового раствора фуксина

90 мл 5 % карболовой кислоты

Разведенный фуксин

10 мл карболового фуксина

90 мл дистиллированной воды

Щелочной метиленовый синий

30 мл насыщенного спиртового раствора метиленового синего

100 мл дистиллированной воды

1 мл 1 % раствора щелочи

Карболовый генцианвиолет

10 мл насыщенного спиртового раствора генцианвиолета

90 мг 5 % карболовой кислоты.

Растворы генцианвиолета дают осадок при окрашивании. Вместо генцианвиолета можно пользоваться насыщенными спиртовыми растворами метиленвиолета или кристаллвиолета. Растворы карболовой кислоты можно брать 1 %, а не 5 %. Кроме того, для окраски по Граму можно пользоваться 0,25 % водным раствором метиленвиолета или кристаллвиолета без карболовой кислоты. Раствор стоек и осадка не дает.

По методу Синева вместо раствора генцианвиолета применяют кусочки фильтровальной бумаги, предварительно пропитанные спиртовым раствором краски и затем высушенные. Для этого листы фильтровальной бумаги погружают на 1–2 мин в 1–2 % раствор краски в 96° спирте, бумагу высушивают и разрезают на кусочки величиной 2×4 см. Такие бумажки сохраняются в банках с притертой пробкой неограниченное время.

МЕТОДЫ ОКРАСКИ

ПРИЖИЗНЕННАЯ (ВИТАЛЬНАЯ) ОКРАСКА МИКРООРГАНИЗМОВ

Окрашивание живых микроорганизмов позволяет изучить характер и степень их подвижности. Применение этих методов ограничивается слабой восприимчивостью живых клеток к анилиновым красителям и нестойкой окраской препаратов. Следует также учесть, что при таких методах окраски микробы сохраняют жизнеспособность, и препараты могут являться инфекционным материалом.

Окраска метиленовым синим

Техника. Чистое предметное стекло смачивают кипящим насыщенным водным раствором метиленового синего. Когда краска на стекле высохнет, его протирают сухой тряпочкой до нежно-голубой окраски. На подготовленное таким образом стекло наносят каплю исследуемой культуры, покрывают покровным стеклом и микроскопируют.

Микроскопическая картина. Микробы постепенно окрашиваются в бледно-голубоватый цвет.

Окраска нейтральным красным

Приготовление красителя: насыщенный на холоду водный раствор нейтральрота разводят физиологическим раствором хлористого натрия 1:100.

Техника. Каплю исследуемого материала смешивают на предметном стекле с каплей разведенного нейтральрота. Препарат покрывают покровным стеклом и микроскопируют с иммерсией.

Микроскопическая картина. Микробы постепенно окрашиваются в розоватый цвет.

Негативный способ окраски живых бактерий

Для окраски используют тушь, негрозин, конго красный. Тушь чертежную разводят дистиллированной водой в соотношении 1:10. Конго красный используют в виде 3 % водного раствора.

Метод Бурри

Техника. Каплю исследуемой культуры смешивают на предметном стекле с каплей туши, затем с помощью другого стекла, поставленного к первому под углом в 45°, делают тонкий мазок по принципу приготовления мазков из крови. Мазок высушивают на воздухе и микроскопируют нефиксированным.

При использовании раствора конго рот после высушивания мазок обрабатывают 1 % раствором соляной кислоты в абсолютном алкоголе, затем высушивают и микроскопируют.

Микроскопическая картина. На окрашенном фоне ясно видны неокрашенные светлые микробные клетки.

ОКРАСКА ФИКСИРОВАННЫХ ПРЕПАРАТОВ МИКРООРГАНИЗМОВ

В микробиологической работе наиболее употребительны способы окраски фиксированных микроскопических препаратов, которые в основном можно разделить на две группы: ориентировочные, или простые, и дифференциальные, выявляющие химические и структурные особенности того или иного вида микроорганизма.

ПРОСТЫЕ МЕТОДЫ ОКРАСКИ МИКРОБОВ

Простые методы окраски препаратов предполагают использование одного анилинового красителя и позволяют изучить такие морфологические признаки микроорганизма, как форма, размеры, расположение

в мазке. Для этих целей используется ряд красителей: метиленовый синий, фуксин и др.

Окраска спиртово-водным раствором метиленового синего

Приготовление раствора: красителя 1 г, 95° спирта 10 мл, дистиллированной воды 100 мл.

Техника. Нанести на фиксированный мазок на 3–5 мин.

Микроскопическая картина. Все клетки окрашиваются в синий цвет.

Окраска водным раствором метиленового синего

Приготовление раствора: красителя 1 г, дистиллированной воды 1000 мл.

Техника. Нанести на фиксированный мазок на 5–10 мин.

Микроскопическая картина. Окраска дает нежные отчетливые препараты клеток, окрашенных в синий цвет.

Окраска щелочным метиленовым синим (синим Леффлера)

Приготовление щелочного раствора метиленового синего: 1) дистиллированной воды 100 мл, 10 % раствора едкого калия 2 капли, насыщенного (7 %) раствора метиленового синего 30 мл или 2) метиленового синего 3 г, 95° спирта 20 мл, 1 % раствора едкого калия 1 мл, дистиллированной воды 100 мл. Это стойкий и хорошо красящий раствор.

Техника. Нанести на фиксированный мазок на 3–10 мин.

Микроскопическая картина. Дает окраску в синий цвет различной интенсивности для разных видов микроорганизмов и тканевых элементов (см. цв. вкл. IX–X).

Окраска разведенным карболовым фуксином

Техника. На зафиксированный мазок наносят фуксин Циля, разведенный непосредственно перед окраской дистиллированной водой в соотношении 1:10. Выдерживают 1–2 мин, после чего смывают водопроводной водой, высушивают и микроскопируют.

Микроскопическая картина. Все клетки равномерно окрашиваются в розово-красный цвет.

**ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ОКРАСКА ПРЕПАРАТОВ
ДЛЯ ЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ**

Препараты для люминесцентной микроскопии готовят так же, как для световой. Это относится и к их фиксации. Окраска препаратов отличается тем, что для люминесцентной микроскопии применяют специальные красители — флуорохромы. Их отличительная особен-

ность — способность светиться под воздействием ультрафиолетовых и сине-фиолетовых лучей. Среди флуорохромов встречаются самые разнообразные органические вещества. Для окраски микроскопических препаратов применяют слабо концентрированные (1:500—1:100000) растворы флуорохромов. Растворы готовят на дистиллированной воде, изотоническом растворе хлорида натрия или буферных смесях и хранят в темной склянке, избегая действия света.

СЛОЖНЫЕ ИЛИ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ОКРАСКИ МИКРОБОВ

Дифференциально-диагностический метод окраски по Граму

Наиболее употребительной среди дифференциальных методов является окраска по Граму. При этом методе выявляется способность бактерий удерживать краситель (грамположительные бактерии) или обесцвечиваться в спирте (грамотрицательные бактерии), что связано с различиями в химическом составе и структуре их клеточных стенок.

Для выполнения окраски по Граму надо приготовить следующие растворы.

Карболовый раствор генцианового фиолетового или кристаллического фиолетового: 1) красителя 1 г, 96° спирта 10 мл, кристаллической карболовой кислоты 2 г, дистиллированной воды 100 мл (растирают в ступке краситель с карболовой кислотой до консистенции кашицы, прибавляют небольшими порциями спирт и окончательно разводят водой, сливают в бутылку, оставляют на сутки, затем фильтруют) или 2) насыщенного (4,8 %) спиртового раствора красителя 10 мл, 2 % карболовой воды 100 мл.

Фуксин Пфейффера. См. разведенный фуксин.

Раствор Люголя (в модификации Грама): йодида калия 2 г, дистиллированной воды 10 мл, йода кристаллического 1 г. Смесь хорошо укупоривают, оставляют на сутки, после чего добавляют дистиллированной воды 300 мл.

Техника. На фиксированный мазок накладывают кусочек фильтровальной бумаги и на нее наливают карболовый раствор генцианового фиолетового на 0,5—1 мин. Сливают краситель и, не смывая, наливают раствор Люголя на 1 мин. Сливают раствор Люголя и прополаскивают препарат в 95° спирте в течение 0,5—1 мин, пока не перестанет отходить краситель. Промывают водой. Дополнительно окрашивают разведенным фуксином в течение 0,5—1 мин. Краситель сливают, препарат промывают и высушивают.

Видоизменение окраски Грама по А.И. Синеву

Заготавливают полоски фильтровальной бумаги, пропитанной 1 % спиртовым раствором кристаллического фиолетового и высушенной.

Техника.

1. На фиксированный мазок наносят полоску фильтровальной бумаги, приготовленной по методу Синева, и несколько капель воды на 1–2 мин.

2. Затем снимают пинцетом бумагу. Не промывая препарат водой, сливают краску и наносят раствор Люголя на минуту до полного почернения.

3. Сливают раствор Люголя, не промывая водой, погружают препарат в стаканчик с 96° спиртом на 20–30 с до отхождения фиолетовых струй краски.

4. Препарат тщательно промывают водой для удаления спирта.

5. Докрашивают фуксином Пфейффера в течение 3 мин. Краску смывают водой, препарат высушивают и микрофотографируют.

Микроскопическая картина. Грамположительные бактерии окрашиваются в фиолетовый цвет, грамотрицательные — в розово-красный (см. цв. вкл. X–XI).

ОКРАСКА КИСЛОТО- И СПИРТОУСТОЙЧИВЫХ МИКРОБОВ

В связи с высоким содержанием липидов эта группа бактерий плохо прокрашивается обычными растворами анилиновых красителей, поэтому для их окраски используют либо концентрированные красители при условии прогревания мазка, либо флуорохромы. В последнем случае для изучения препарата используют люминесцентную микроскопию.

Окраска по Цилю — Нильсену

Наиболее употребительный метод окраски микобактерий туберкулеза. Для увеличения степени проницаемости бактериальной клетки препарат окрашивают фуксином Циля при подогревании. Окрашенные кислотоустойчивые микроорганизмы затем не обесцвечиваются слабыми растворами минеральных кислот и спиртами.

Техника.

1. Фиксированный мазок покрывают фильтровальной бумагой и наливают фуксин Циля. Затем, удерживая препарат пинцетом, подогревают его в пламени горелки до отхождения паров. Повторяют манипуляцию 2–3 раза, добавляя по мере необходимости краску. После охлаждения снимают бумагу и промывают водой.

2. Препарат обесцвечивают 5 % раствором серной кислоты, затем тщательно промывают водой.

3. Окрашивают водно-спиртовым раствором метиленового синего в течение 3–5 мин, промывают водой, высушивают и микроскопируют. Мазок, окрашенный по Цилю — Нильсену, вместо докраски метиленовым синим можно протравливать насыщенным раствором пикриновой кислоты (по Шпенглеру).

Микроскопическая картина. Кислотоустойчивые бактерии окрашиваются в розово-красный цвет, другие формы приобретают синюю окраску (см. цв. вкл. XII).

Флуорохромирование аурамином

Техника. Фиксированный препарат окрашивают смесью аурамина (0,12 г), карболовой кислоты (5 мл), дистиллированной воды (до 100 мл). Краситель наливают на мазок, подогревают на пламени до появления паров. Через 10 мин препарат промывают водой и обесцвечивают 15 с солянокислым спиртом. Препарат промывают и подсушивают на воздухе.

Микроскопическая картина. Туберкулезные микобактерии флуоресцируют золотисто-желтым цветом.

Окраска акридиновым оранжевым

Техника. Мазки, фиксированные 3–5 мин метиловым спиртом, погружают в раствор (1:10000) красителя, к 10 мл которого добавлено 3–5 капель 10 % раствора аммиака. Через 24 ч препарат обесцвечивают 3 % солянокислым спиртом (дважды по 10 с), промывают и высушивают.

Микроскопическая картина. Туберкулезные микобактерии флуоресцируют желто-оранжевым цветом.

Флуорохромирование акридиновым желтым

Техника. Мазок на 30 с помещают в водный раствор (1:5000) флуорохрома, затем промывают. Дифференцируют солянокислым спиртом 15 с, вновь промывают и высушивают.

Микроскопическая картина. Туберкулезные микобактерии флуоресцируют желтым цветом.

ОКРАСКА СПОР

Бактериальные споры, отличающиеся от вегетативных клеток многослойной липидосодержащей оболочкой, пропитанной депиколатом кальция, не поддаются окраске простыми методами и по Граму. Для

окраски спор разработаны специальные методы, направленные на увеличение их проницаемости с использованием растворов кислот, концентрированных красителей и подогрева.

Способ Пешкова

Техника. На мазок, фиксированный жаром (над пламенем!), наливают синий Леффлера и подогревают стекло до закипания краски. Дают 15–20 с покипеть, а затем (после того как стекло остынет!) промывают водой и докрашивают препарат 30 с 0,5 % водным раствором нейтрального красного. Вновь промывают, сушат и микроскопируют.

Микроскопическая картина. Споры окрашиваются в голубой цвет, клетки — в розовый.

Способ Ганзена

Техника. Препарат, приготовленный обычным способом, при нагревании окрашивают 1–2 мин карболовым фуксином Циля, промывают водой и обесцвечивают, погружая стекло в 2 % раствор азотной кислоты в спирте или в 1 % водный раствор серной кислоты. Обесцвечивать надо так, чтобы на препарате не было видно следов красителя. Затем промывают водой и докрашивают водным раствором метиленового синего.

Микроскопическая картина. Споры окрашиваются в красный цвет.

Метод Ожешки

Техника. На нефиксированный мазок наливают 0,5 % раствор хлористоводородной кислоты и подогревают 1–2 мин. С препарата сливают кислоту, промывают его водой и после высыхания фиксируют на пламени. Фиксированный препарат красят по способу Циля — Нильсена.

Микроскопическая картина. Тела бактерий окрашиваются в синий цвет, споры — в красный (см. цв. вкл. XIII).

Метод Виртца в модификации Саватеева

Приготовление растворов. К насыщенному водному раствору (около 5 %) малахитового зеленого добавляют 5 % глицерина, пропитывают смесью полоски фильтровальной бумаги и высушивают их (лучше при 50 °С). Затем готовят 0,5 % водный раствор сафранина, которым смачивают другие полоски фильтровальной бумаги, и высушивают.

Техника. На фиксированный над пламенем мазок наносят 2–3 капли дистиллированной воды и накладывают полоску фильтровальной

бумаги, окрашенной малахитовым зеленым. Препарат нагревают над пламенем горелки до появления паров (3–4 раза), приблизительно в течение минуты. При испарении воды ее добавляют. После остывания препарата краску с бумажкой смывают струей воды (полминуты) и сейчас же на мокрую поверхность препарата кладут бумажку, окрашенную сафранином. Через 30–40 с мазок промывают водой, высушивают и микроскопируют.

Микроскопическая картина. Свободно лежащие споры — зеленовато-голубого цвета, споры внутри микробных клеток — темно-зеленые, вегетативные формы микробов — красные.

Модификация Шеффлера и Фултона

Техника. На препарат, фиксированный жаром, наносят на 30–60 с 5 % водный раствор малахитового зеленого и нагревают до появления паров 3–4 раза. Мазок промывают и докрашивают 0,5 % водным раствором сафранина в течение 30 с. Промывают водой, высушивают через фильтровальную бумагу.

Микроскопическая картина. Споры — зеленые, а вегетативные клетки — красные.

Окраска по Биттеру

Техника. Нефиксированный мазок, обработанный 10 % раствором формалина (10 мин), промытый водой и высушенный, красят аммиачным метиленовым синим (20 мл насыщенного спиртового раствора метиленового синего, 3 мл крепкого раствора NH_4OH и 80 мл дистиллированной воды) 3 мин, нагревая стекло до закипания жидкости. После промывания водой и высушивания докрашивают мазок везувином или сафранином 3–5 мин. Вновь промывают, высушивают и микроскопируют.

Микроскопическая картина. В мазке бактериальные тела — красные или буро-желтые (в зависимости от краски, примененной для докрашивания), споры — синие.

ОКРАСКА КАПСУЛ

Окраска капсул микробов может иметь диагностическое значение. Бактериальные капсулы представляют собой слизистый слой, состоящий из разбухших в воде в виде геля полисахаридов или полипептидов.

В мазках из органов или из тканей капсулы можно обнаружить при помощи простой окраски щелочным или другими растворами метиле-

нового синего. Однако специальные окраски дают более четкие препараты.

Для их выявления в мазке можно использовать негативные методы окраски, при которых окрашивают фон препарата и клетки, окруженные бесцветными капсулами.

Метод Бурри — Гинса

Техника. На середину предметного стекла наносят капельку туши и смешивают ее петлей с каплей культуры. Делают мазок ребром покровного стекла, дают высохнуть и микроскопируют. На черном фоне видны неокрашенные микробы, капсулы.

Мазок, окрашенный тушью по Бурри, фиксируют сулемой, метиловым спиртом или на пламени. После промывания водой красят 5–10 мин карболовым раствором тионина или фуксина и вновь промывают, а затем высушивают.

Микроскопическая картина. Бактерии — фиолетовые или красные. Фон черный. Капсулы неокрашенные (см. цв. вкл. XIV).

Способ Михина

Техника. Фиксированный мазок окрашивают метиленовым синим Лесффлера в течение 2–3 мин при подогревании (до появления паров). Затем краску быстро смывают водой и мазок высушивают фильтровальной бумагой.

Микроскопическая картина. Капсулы — светло-розовые, бактерии — темно-синие.

Способ Ольта

Техника. Мазок окрашивают 2–3 % водным раствором сафранина в течение 1–3 мин с последующим быстрым смыванием водой. Раствор сафранина готовят перед употреблением, растворяя краску в горячей воде с последующим фильтрованием. На мазок наносят каплю воды, накрывают покровным стеклом, а на него помещают каплю иммерсионной жидкости.

Микроскопическая картина. Капсулы — бледно-желтого, а бактерии — коричневого цвета.

Способ Кауфмана

Техника. Мазок окрашивают метиленовым синим Лесффлера в течение 2–3 мин. Краску смывают водой и мазок погружают в 0,25 % водный раствор протаргола или 0,5 % раствор азотнокислого серебра на

3–4 мин, затем окрашивают карболовым раствором фуксина, разведенным 1:20, в течение 5–10 с, промывают водой и высушивают.

Микроскопическая картина. Капсулы — темно-красные, бактерии — темно-синие.

Способ Ребигера

Техника. Препарат фиксируют формалином, причем фиксация происходит одновременно с окраской. Для этого готовят раствор: 15–20 г генцианвиолета растворяют в 100 мл 40 % формалина; дают раствору постоять несколько часов и фильтруют. Окрашивают нефиксированный мазок указанным раствором в течение 15–20 с, быстро промывают водой и высушивают.

Микроскопическая картина. Капсулы — красновато-фиолетовые, бактерии — темно-фиолетовые.

Способ Ионе

Техника. Фиксированный мазок окрашивают 2 % водным раствором метилвиолета (или генцианвиолета) в течение 1–2 мин при подогревании. Краску быстро смывают небольшим количеством воды, мазок в течение 10 с обрабатывают 2 % раствором уксусной кислоты, промывают водой и высушивают.

Микроскопическая картина. Капсулы — розовато-фиолетовые, бактерии — темно-фиолетовые.

Окраска по Антони

Техника. Мазок красят (без фиксации!) на холоду 1 % водным раствором кристаллического фиолетового 2 мин. Затем промывают 20 % водным раствором серной кислоты и высушивают фильтровальной бумагой.

Микроскопическая картина. Бактерии окрашиваются в темно-синий цвет, капсулы — в сине-фиолетовый.

Окраска по Гиссу

Техника. Препарат, фиксированный любым способом, кроме жара, красят 5 % водным раствором генцианового фиолетового, подогревая до появления паров. Мазок промывают 20 % водным раствором медного купороса и сушат.

Микроскопическая картина. Бактерии и капсулы окрашиваются в фиолетовый цвет различной интенсивности.

ОКРАСКА ЖГУТИКОВ

Это одна из наиболее трудных процедур в бактериологической технике, так как жгутики очень легко повреждаются при приготовлении препарата. Поэтому здесь требуется особая тщательность в работе. Стекла для препаратов должны быть абсолютно чистыми и обезжиренными. Обычно работают с новыми покровными стеклами, которые предварительно кипятят в течение 10 мин в хромовой смеси (двуххромовокислого калия 20 г, воды 200 мл, серной кислоты 20 мл; приливать в указанном порядке). После кипячения стекол хромовую смесь сливают, промывают стекла 5 мин в слабом растворе едкого натра, после чего обильно промывают водой, ополаскивают спиртом и хранят в спирте (во время промывания не касаться стекол руками). Перед употреблением стекла вынимают из спирта чистым пинцетом и удаляют спирт обжиганием (ничем не вытирать!).

Исследуемая культура должна быть не старше 12–18 ч. Материал берут осторожным прикосновением петли к культуре и вносят в пробирку с несколькими миллилитрами водопроводной воды, погружая петлю в воду и держа ее неподвижно некоторое время. Повторяют это 2–3 раза, пока не получится тонкая, лишь слегка опалесцирующая взвесь. Полученной взвеси дают постоять 15–20 мин в термостате для равномерного распределения микробов в воде. Затем платиновой петлей переносят каплю на покровное стекло. Если стекло достаточно чистое, капля принимает правильную круглую форму, легко расплывается и быстро высыхает на воздухе без подогревания. Препараты фиксируют на огне и окрашивают специальными способами, причем перед окраской обрабатывают протравой, которая усиливает действие краски.

Метод Леффлера

Техника. За 1–2 сут до употребления готовят протраву, состоящую из 1 мл насыщенного спиртового раствора основного фуксина, 10 мл 20 % водного раствора танина, 5,5 мл насыщенного на холоду водного раствора сульфата закисного аммиачного железа (соль Мора). Перед употреблением фильтруют. Препарат, приготовленный на покровном стекле, фиксируют и помещают на часовое стекло. Наливают протраву и 30–50 с подогревают до отхождения паров. Дав стеклу остыть, его промывают водой и, поместив на другое часовое стекло, красят фуксином. Целя 2–3 мин при слабом подогревании. После тщательной промывки и высушивания препарат готов для микроскопирования.

Микроскопическая картина. Жгутики окрашиваются в розово-красный цвет.

Серебрение по Морозову

Готовят 3 реактива: 1) 1 мл ледяной уксусной кислоты, 2 мл имеющегося в продаже формалина, 100 мл дистиллированной воды; 2) 5 г танина, 1 мл жидкой карболовой кислоты, 100 мл дистиллированной воды; 3) 5 г кристаллического нитрата серебра растворяют в 100 мл дистиллированной воды, отливают 20 мл в другой сосуд, к оставшимся 80 мл раствора по каплям добавляют раствор аммиака, пока не растворится образующийся осадок и не останется легкая опалесценция: если аммиака будет добавлено слишком много, то из отлитых в другой сосуд 20 мл раствора серебра надо добавлять по каплям до получения нужной слабой опалесценции. Для окраски препарата раствор серебра разводят дистиллированной водой 1:10.

Техника. Наливают на 1 мин первый реактив, сливают, промывают препарат водой, наливают второй реактив, подогревают на легком пламени до отхождения паров (1 мин), тщательно промывают водой, 1–2 мин при подогревании обрабатывают препарат третьим реактивом до появления темно-коричневой окраски мазка, тщательно промывают водой, высушивают. Рассматривают с иммерсионной системой.

Микроскопическая картина. Жгутики окрашиваются в буро-черный цвет (см. цв. вкл. XV).

Метод Грея

Растворы, составляющие протраву, смешивают за сутки до употребления. Растворы состоят из: 1) насыщенного водного раствора калийных квасцов $K_2SO_4 \cdot 12H_2O$ — 5 мл, 20 % водного раствора танина — 2 мл и насыщенного водного раствора двухлористой ртути — 2 мл; 2) насыщенного спиртового раствора основного фуксина — 0,4 мл.

Техника. Протраву наливают на препарат на 8–10 мин, затем промывают его дистиллированной водой и окрашивают 5 мин карболовым фуксином Циля. Вновь промывают водой, сушат на воздухе и микро копируют.

Микроскопическая картина. Жгутики окрашиваются в красный цвет.

Окраска по Шенку

Протраву, состоящую из двух растворов, готовят за 7–10 дней до употребления. Первый раствор состоит из 30 мл насыщенного водного раствора танина и 10 мл 5 % водного раствора полторахлористого железа, второй — из 1 мл анилина и 4 мл 95° спирта.

Техника. На препарат наносят 8 капель первого и 1 каплю второго раствора. После того как избыток протравы сливают, на препарат нано-

сят краску (без промывания). Красить можно 1 % сафранином в 50° спирте или метиленовым синим Леффлера. Хорошие результаты можно получить, применив для окраски смесь 30 мл метиленового синего Леффлера и 8 мл второго раствора протравы.

Микроскопическая картина. Жгутики приобретают синий цвет (см. цв. вкл. XVI).

Метод Петрука

Техника. Метод Петрука — модификация метода Грея. Вместо карболового фуксина применяют нитрат серебра, раствор которого готовят следующим образом: 1 г AgNO_3 растворяют в 2 мл дистиллированной воды, к нему по каплям добавляют 5 % раствор аммиака до растворения образовавшегося осадка и появления легкой опалесценции. Этот исходный раствор разбавляют в 10 раз дистиллированной водой и применяют для окраски. Препарат с нанесенным на него раствором нитрата серебра слегка подогревают над пламенем.

Микроскопическая картина. Жгутики окрашиваются в желто-коричневый цвет (см. цв. вкл. XVII).

ОКРАСКА ВКЛЮЧЕНИЙ В БАКТЕРИЯХ

ОКРАСКА МЕТАХРОМАТИЧЕСКИХ ЗЕРЕН (ВОЛЮТИНА)

Волютин является запасным полифосфатом у некоторых видов бактерий. Его наличие и расположение в клетке может иметь диагностический характер, например, у коринебактерий дифтерии (тельца Бабеша — Эрнста).

Метод Нейссера

Способ 1.

Приготовление краски Нейссера: а) метиленового синего 0,1 г, 95° спирта 2 мл, ледяной уксусной кислоты 5 мл, дистиллированной воды 100 мл; б) раствор хризоидина, или везувина, или бисмарк-браун красителя 1 г, дистиллированной воды 300 мл. Краситель растворяют в кипящей воде и фильтруют через бумагу.

Техника. Препараты выдерживают по 1 мин в растворе метиленового синего и в растворе Люголя. Промывают водой. Докрашивают раствором хризоидина (или везувина, или бисмарк-браун) 1–3 мин. Промывают водой.

Микроскопическая картина. Тела бактерий окрашиваются в светло-желтый цвет, зерна Бабеша — Эрнста — в темно-синий.

Способ 2.

Приготовление растворов. Готовят основные растворы:

Раствор 1:

метиленового синего — 0,1 г;

этилового спирта 95° — 2 мл;

ледяной уксусной кислоты — 5 мл;

дистиллированной воды — 100 мл.

Раствор 2:

кристаллвиолета — 1 г;

этилового спирта 95° — 10 мл;

дистиллированной воды — 300 мл.

Для окраски смешивают две части раствора 1 с одной частью раствора 2.

Техника окраски. На фиксированный мазок наливают смесь растворов 1 и 2, через минуту краску сливают и мазок обрабатывают раствором Люголя в течение минуты, затем промывают водой, докрашивают в течение 2–3 мин раствором хризоидина (1 г краски в 300 мл дистиллированной горячей воды), промывают водой и высушивают.

Микроскопическая картина. Тела бактерий окрашиваются в светло-желтый цвет, зерна волютина (Бабеша — Эрнста) — в темно-синий (см. цв. вкл. XVIII).

Метод Пью

Техника. К 2 мл этилового спирта добавляют 0,2 г толуидинового синего, а затем 100 мл 5 % раствора уксусной кислоты (5 мл ледяной уксусной кислоты + 95 мл воды). На фиксированный мазок наливают краску и нагревают 1–2 минуты, до появления паров. Дают остыть, смывают водой и высушивают.

Микроскопическая картина. Тела палочек — синего цвета, метакроматические зерна — красновато-фиолетовые.

Окраска по Мейеру

Техника. Одновременно из исследуемых бактерий готовят два одинаковых препарата и фиксируют жаром или в течение 5–15 мин в жидкости Карнуа. Красят оба мазка 10 мин метиленовым синим Леффлера и затем один из них помещают в 1 % водный раствор серной кислоты, другой — в 4 % водный раствор карбоната калия. Через 5 мин препараты сушат фильтровальной бумагой (не промывать). Препарат, обработанный кислотой, докрашивают 0,25 % раствором светлого зеленого

(лихтгрюн) с 2–3 каплями крепкой уксусной кислоты или хризоидином.

Микроскопическая картина. Бактерии окрашиваются в зеленый или коричневый цвет, зерна волютина — в вишнево-красный. В препарате, обработанном щелочью, волютин обесцвечен — пустоты на фоне слабо окрашенных бактерий.

Флуорохромирование волютина корифосфином

Техника. 2 мл основного раствора корифосфина 1:1000 на дистиллированной воде, 6 мл уксусной кислоты, до 50 мл дистиллированной воды. Препарат фиксируют метиловым спиртом 8 с, промывают водой, высушивают. На 10 мин наливают рабочий раствор корифосфина, сливают, вновь промывают водой и высушивают на воздухе.

Микроскопическая картина. Бактерии — желто-зеленые, зерна волютина — оранжево-красные.

Окраска по Раскиной

Техника. На препарат наливают краситель, состоящий из карболового фуксина Циля — 4 мл, насыщенного раствора метиленового синего — 4 мл, ледяной уксусной кислоты — 5 мл, 95° спирта — 95 мл, дистиллированной воды — до 200 мл. Препарат подогревают на пламени до сгорания спирта, а затем промывают водой и высушивают.

Микроскопическая картина. Бактерии окрашиваются в светло-красный цвет, зерна волютина — в черно-синий.

ОКРАСКА НА ГРАМОФИЛЬНУЮ ЗЕРНИСТОСТЬ

Метод Муха

Окраску применяют для выявления зернистой формы туберкулезных микобактерий (зерен Муха).

Техника. В смеси 10 мл насыщенного спиртового раствора метилового фиолетового и 100 мл 2 % водного раствора карболовой кислоты препарат выдерживают сутки. Затем его 1–2 мин обрабатывают раствором Люголя, 1 мин — 5 % раствором азотной кислоты и 10 с — 3 % раствором хлористоводородной кислоты. После дифференцирования в смеси, состоящей из равных объемов спирта и ацетона, до прекращения отхождения краски промывают водой, докрашивают фуксином Пфейффера, вновь промывают водой и высушивают.

Микроскопическая картина. Микобактерии окрашиваются в фиолетовый цвет.

Метод Козлова

Метод применяют для выявления зернистой формы туберкулезных микобактерий.

Техника. Красят 45 мин в смеси: 1 г генцианового фиолетового, 6 г карболовой кислоты, 40 мл глицерина и 100 мл дистиллированной воды. Генциановый фиолетовый и карболовую кислоту предварительно растирают в ступке, после чего прибавляют глицерин и дистиллированную воду. Перед употреблением краску разводят 3 частями дистиллированной воды и фильтруют. После промывания препарата водой его 20 с обрабатывают раствором Люголя, промывают водой, 2–3 с окрашивают 0,1 % раствором сафранина, вновь промывают водой и сушат.

Микроскопическая картина. Кислотоустойчивые бактерии окрашиваются в фиолетовый цвет.

ВЫЯВЛЕНИЕ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ БАКТЕРИЙ

При обычных методах окраски мазков клеточная стенка не окрашивается, поэтому применяют специальные методы с протравами.

Метод Пешкова

Техника. Препарат фиксируют 15 мин в жидкости следующего состава: 90° спирта 60 мл, хлороформа 30 мл и уксусной эссенции 10 мл. Протравливают 2–5 мин в 10 % водном растворе танина. Затем препарат промывают водой, красят 30–60 с фуксином Пфейффера и, не промывая, сушат и микроскопируют.

Микроскопическая картина. Клеточная стенка окрашивается в розово-красный цвет.

Метод Гутштейна

Техника. Препарат, 1–2 ч фиксированный в жидкости Буэна, 2–3 мин подвергают действию протравы (5–10 % водный раствор танина), ополаскивают водой и микроскопируют в капле 0,01 % водного раствора кристаллического фиолетового.

Микроскопическая картина. Клеточная стенка приобретает фиолетовый цвет.

Метод Кнази

Техника. Препарат, фиксированный жаром, обрабатывают 3–5 мин протравой, состоящей из 70 мл насыщенного водного раствора калийных квасцов и 30 мл 20 % водного раствора танина. На мазок, промытый

водой, наносят каплю карболового фуксина, закрывают покровным стеклом и микроскопируют, не удаляя краску.

Микроскопическая картина. Клеточная стенка окрашивается в красно-фиолетовый цвет.

ОБНАРУЖЕНИЕ НУКЛЕОИДА БАКТЕРИЙ

Окраска ядерных элементов. Метод Романовского

Техника. Препарат фиксируют метиловым спиртом, спирт-формолом, жидкостью Карнуа или смесью Никифорова. Окрашивают рабочим раствором красителя (2 капли красителя Гимза на 1 мл дистиллированной воды) 10–20 мин. Промывают дистиллированной водой и после просушивания микроскопируют. Дистиллированная вода, применяемая для разведения красителя, должна иметь нейтральное значение pH, так как от этого в высокой степени зависят результаты окрашивания. Реакция дистиллированной воды, кроме обычно применяемых с этой целью способов, может быть проверена путем прибавления к ней кристаллика гематоксилина или нескольких капель его спиртового раствора. Вода пригодна, если в течение 2 мин не появляется розовая окраска; в противном случае она кислая и должна быть подщелочена 1 % раствором бикарбоната натрия.

Микроскопическая картина. При микроскопировании ядерные элементы имеют красно-фиолетовый цвет, цитоплазма — слабо-розовый.

Метод Пикарского

Техника. Препарат обрабатывают 1 N раствором HCl 7 мин при подогревании до 60 °С. После промывания мазок окрашивают по Романовскому.

Микроскопическая картина. Ядерные элементы — темно-красные, цитоплазма — розовая.

ОКРАСКА РИККЕТСИЙ

Метод Романовского — Гимза

Окраска по Романовскому — Гимза является одним из основных методов при изучении морфологии риккетсий, хламидий, спирохет, простейших, а также при исследовании форменных элементов крови.

Техника. Краситель Романовского — Гимза состоит из азура, эозина и метиленового синего. Непосредственно перед употреблением к 10 мл дистиллированной воды нейтральной реакции прибавляют 10 капель краски и тотчас же наливают на препарат, предварительно фиксированный жидким фиксатором, на 1 ч. Затем краску сливают, препарат

промывают водой, высушивают на воздухе и микроскопируют. Окрашивание происходит быстрее (30–40 мин), если препарат с краской поместить в термостат при 37 °С. К 10 мл дистиллированной воды нейтральной или слабо щелочной реакции непосредственно перед окраской препарата прибавляют 10 капель краски и тотчас же наливают на фиксированный препарат (или погружают препарат в стаканчик с краской). Через 1 ч краску сливают, препарат промывают водой, высушивают на воздухе и исследуют. Если поместить препарат с краской в термостат при 37 °С, то окрашивание происходит быстрее (30–40 мин).

Результаты окрашивания зависят от свойства воды, поэтому следует проверять ее реакцию.

Микроскопическая картина. Риккетсии окрашиваются в розово-красный цвет, ядра эукариотических клеток — в красно-фиолетовый, а цитоплазма — в голубой.

Метод Здродовского

Техника. Препарат тонким слоем наносят на стекло, фиксируют на пламени и окрашивают разведенным карболовым фуксином (10–15 капель фуксина на 10 мл дважды дистиллированной воды) в течение 5 мин; затем препарат слегка обесцвечивают погружением на 1–3 с в слабую (0,01 %) соляную кислоту, промывают водой и докрашивают в течение 30 с 1 % раствором водного метиленового синего. Тонкий мазок фиксируют на пламени горелки. Окраску производят разведенным карболовым фуксином (10–15 капель фуксина на 10 мл дистиллированной воды) в течение 5 мин. Окрашенный препарат промывают водой, а затем обесцвечивают в растворе органической или минеральной кислоты (0,5 % лимонная кислота, 0,01 % соляная кислота) в течение 2–3 с. Затем препарат промывают водой и докрашивают 0,5 % раствором метиленовой синьки в течение 0,5 мин.

Микроскопическая картина. Риккетсии окрашиваются в рубиново-красный цвет, в то время как клетки хозяина обесцвечиваются кислотой и дополнительно окрашиваются в голубой (протоплазма) или синий (ядра) цвет.

ОКРАСКА ХЛАМИДИЙ

Метод Романовского — Гимза

Техника (см. выше).

Микроскопическая картина. На разных стадиях развития способность воспринимать окраску у хламидий меняется:

- ✓ «Элементарные тельца» (инфекционные частицы) окрашиваются краской Гимза в пурпурный цвет.
- ✓ «Первоначальные тельца» (неинфекционные частицы) окрашиваются по Гимза в синий цвет.

Полностью сформировавшиеся зрелые внутриклеточные включения окрашиваются краской Гимза в пурпурный цвет (см. цв. вкл. XIX–XX).

Метод Грама

Техника (см. выше).

Микроскопическая картина. Окраска по Граму дает переменные результаты, поэтому не имеет диагностического значения.

Окраска водным разбавленным раствором Люголя

Придает внутриклеточным формам хламидий коричневый цвет из-за гликогенподобной оболочки частиц.

ОКРАСКА МИКОПЛАЗМ

Метод Романовского — Гимза

Техника. Окрашивают препарат из культуры после агаровой фиксации: кусочек среды с колонией помещают на предметное стекло и накрывают покровным стеклом с каплей спиртового раствора метиленового синего и азура, затем препарат высушивают.

Микроскопическая картина. Цитоплазма окрашивается в бледно-сиреневый, а ядерный материал — в сине-фиолетовый.

ОКРАСКА СПИРОХЕТ

Методы окраски спирохет делятся на две группы: *методы позитивной окраски*, когда окрашивается сама клетка, и *методы негативной окраски*, когда окрашивается фон препарата, а спирохета остается бесцветной.

Из методов позитивной окраски наиболее употребителен метод Романовского — Гимза.

Метод Романовского — Гимза

Техника (см. выше). Особенностью техники окрашивания препаратов спирохет является длительность окраски — в течение 12–15 ч.

Микроскопическая картина. Трепонемы окрашиваются в бледно-розовый, лептоспиры — в розово-красный, а боррелии — в сине-фиолетовый цвет (см. цв. вкл. XXI).

Ускоренная модификация Шерешевского

Техника. 15–20 капель красителя Романовского — Гимза разводят в 10 мл 0,5–1 % раствора глицерина в воде, разливают в 4–5 пробирок, каждую из которых последовательно нагревают на пламени горелки. Горячий раствор красителя наливают на препарат на 2 мин, после чего краситель сливают и препарат заливают свежей порцией горячего раствора из следующей пробирки. Вся окраска занимает 8–10 мин.

Микроскопическая картина. См. метод Романовского — Гимза.

Окраска разведенным фуксином

Используется для окраски боррелий.

Техника. Реактив: фуксин Циля разводят 1:4 или 1:5. Краситель наносят на фиксированный мазок на 1–2 мин.

Микроскопическая картина. В мазках крови боррелии окрашиваются в розово-красный цвет, эритроциты — в ярко-красный.

Серебрение по Морозову

Техника (см. выше).

Микроскопическая картина. Спирихеты окрашиваются в буро-черный цвет (см. цв. вкл. XXII).

Для негативной окраски спирихет используют несколько методов.

Негативный метод Бурри

Техника (см. выше).

Микроскопическая картина. На темно-сером тушевом фоне — бесцветные клетки.

Негативная окраска колларголом

Этот метод отличается простотой, доступностью и хорошей эффективностью.

Техника. На фиксированный мазок наливают на 3 мин 2 % раствор колларгола. После этого препарат ставят в наклонное положение (водой не смывают) и подсушивают.

Микроскопическая картина. На золотисто-оранжевом фоне отчетливо контурируется бесцветная спирихета.

ОКРАСКА ПРОСТЕЙШИХ

Метод Романовского — Гимза

Техника (см. выше).

Микроскопическая картина. Клеточная цитоплазма окрашивается в голубой цвет, а ядра клеток и жгутики — в красно-фиолетовый цвет (см. цв. вкл. XXIII—XXIV).

Метод Райта

Техника. Реактивы. Способ приготовления: 1 % раствор щелочного метиленового синего на 0,5 % растворе двууглекислого натрия наливают в сосуд таким образом, чтобы высота слоя жидкости не превышала 6 см, и нагревают при 100 °С в течение часа. Затем жидкость охлаждают и фильтруют. Охлажденный фильтрат в тонком слое при искусственном освещении должен иметь пурпурно-красный оттенок. К 100 мл фильтрата добавляют 500 мл 0,1 % водного раствора эозина. При смешивании обеих жидкостей образуется обильный осадок; последний отфильтровывают и высушивают. Полученный таким образом краситель растворяют в ступке в метиловом спирте в соотношении 0,1:60,0.

На сухой нефиксированный мазок наливают несколько капель красителя. Спустя 1 мин прибавляют столько же капель дистиллированной воды. Через 2–3 мин препарат промывают в воде около 0,5 мин, пока он в тонком слое не приобретет розоватого оттенка.

Микроскопическая картина. Ядра простейших окрашиваются в вишнево-красный цвет, цитоплазма — в голубоватый, жгутики — в красный цвет.

Метод Хайденхайна

Техника. Реактивы. 1) Жидкость Шаудина: делают смесь 1 объема 96° этилового спирта с 2 объемами насыщенного раствора сулемы; к этой смеси непосредственно перед употреблением приливают ледяную уксусную кислоту в количестве 3–5 % к общему объему. Смесь употребляют слегка нагретой (до появления паров). 2) Спирт этиловый 70–96°. 3) Спирт-йод — 70° этиловый спирт, к которому добавлена настойка йода до красноватого цвета. 4) Железо-аммониевые квасцы, 2,5–4 % водный раствор. 5) Раствор гематоксилина: 1 г кристаллического гематоксилина растворяют в 10 мл 96° этилового спирта и доливают до 100 мл дистиллированной водой: настаивают на свету при комнатной температуре 2–3 нед.

Жидкость Шаудина наносят на нефиксированный мазок на 2–5 мин. Затем мазок помещают в 70° этиловый спирт на 2 мин, смесь этилового спирта с йодом на 2 мин и снова в этиловый спирт на 2 мин. Мазок промывают дистиллированной водой в течение 2 мин и помещают

в раствор железо-аммониевых квасцов на сутки. Через сутки мазки быстро ополаскивают дистиллированной водой, дают стечь воде и переносят в раствор гематоксилина на сутки. После этого мазки промывают водопроводной водой в течение 5 мин и далее дифференцируют 2 % раствором квасцов.

Дифференцирование является наиболее трудным моментом. Его цель — удаление излишка краски для выявления структуры простейших. Оно проводится под контролем микроскопа. С препарата осторожно удаляют осадок краски и наливают раствор квасцов. Дифференцирование прекращают, когда протоплазма отдаст излишек краски и появятся четкие контуры клеток. После этого препарат промывают проточной водой и подсушивают.

Микроскопическая картина. На серо-лиловом фоне цитоплазмы клеток отчетливо видны черные хроматиновые элементы ядер (см. цв. вкл. XXV).

Окраска йодом и йод-эозином

Используется для окраски нативных мазков амёб и их цист.

Техника. Для приготовления мазка используют раствор Люголя, приготовленный следующим образом: в 100 мл дистиллированной воды сначала растворяют 2 г йодистого калия, а затем 1 г кристаллического йода. Жидкость хранят в склянке из темного стекла.

Йод-эозин (по Дональдсону): смешивают равные объемы насыщенного раствора кристаллического йода в 5 % водном растворе йодистого калия и насыщенного водного раствора желтого (водорастворимого) эозина.

Микроскопическая картина. Цисты и вегетативные клетки приобретают четкие контуры коричневого оттенка.

Негативная окраска по Бурри

Используется для выявления амёб и их цист.

Техника (см. выше).

Микроскопическая картина. На темно-сером тушевом фоне видны бесцветные клетки и цисты.

МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИНОМИЦЕТОВ

Простые методы окраски (см. выше)

Техника (см. выше).

Микроскопическая картина. Клетки приобретают цвет примененного красителя (см. цв. вкл. IX).

Метод Грама

Техника (см. выше).

Микроскопическая картина. Клетки окрашиваются грамположительно (в сине-фиолетовый цвет) (см. цв. вкл. XXVI).

Микроскопическое исследование патогенных грибов

Исследуемый материал помещают на предметное стекло в каплю 10–20 % едкой щелочи (или смеси спирта с глицерином), закрывают покровным стеклом и исследуют сразу после приготовления и через 20 мин (см. цв. вкл. XXVII–XXX).

ОСНОВНЫЕ КРАСИТЕЛИ

Наиболее часто применяемые в микологической практике красители для контрастного окрашивания мицелия — метиленовый синий, метиловый фиолетовый, генциановый фиолетовый, раствор Люголя.

Метиленовый синий применяют в виде спиртовых, водных, щелочных растворов: 1) спиртовый раствор: к 100 мл 96° спирта добавляют 3 г краски, взбалтывают, оставляют отстояться на несколько суток, фильтруют; перед употреблением разводят в 5–10 раз; раствор прочный; 2) водный раствор: к 100 мл воды добавляют 2 г краски, отстаивают 2 сут; периодически взбалтывают.

Окраска метиленовым синим

Техника. На зафиксированный мазок наносят водно-спиртовый раствор метиленового синего на 5–10 мин.

Микроскопическая картина. Клетки окрашиваются в синий цвет (см. цв. вкл. XXXI).

Дифференциальное окрашивание мицелия

Техника. Готовят смесь Судана 3, хлопчатобумажного синего и йода в молочной кислоте (1:1:1).

Микроскопическая картина. В гифах жир окрашивается в ярко-оранжевый цвет, гликоген — в буро-красный, а протоплазма — в синий.

Окрашивание амилоидной оболочки

Применяют для большинства сумчатых и несовершенных грибов.

Техника. Краситель — раствор Люголя. Несколько капель раствора добавляют к готовому препарату на предметное стекло. Время окрашивания от нескольких секунд до 1 ч.

Микроскопическая картина. Амилоидные оболочки окрашиваются в синий цвет.

ОКРАШИВАНИЕ КЛЕТОЧНОЙ ОБОЛОЧКИ

Метод Пешкова

Применяют для дрожжей и низших грибов.

Техника. Препарат фиксируют в жидкости Карнуа и опускают на 2–5 мин в 10 % раствор танина, тщательно промывают и красят фуксином Пфейффера в течение 30–60 с, не промывая, микроскопируют.

Микроскопическая картина. Оболочки окрашиваются в синеватые цвета.

Окрашивание генциановым фиолетовым и конго красным

Применяют для всех видов грибов.

Техника. Препарат фиксируют любым способом, помещают в 0,5 % водный раствор генцианового фиолетового на 1,5–2 мин, промывают, помещают в 0,5 % водный раствор конго красного на 2–3 мин, промывают, подсушивают.

Микроскопическая картина. Оболочки окрашиваются в темно-синий или черный цвет.

ОКРАШИВАНИЕ ХИТИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ

Метод Висселинга

Техника. Препарат кипятят в концентрированной щелочи в течение часа, промывают, нейтрализуют серной кислотой до получения нейтральной реакции. Затем добавляют две капли раствора йода в йодистом калии и несколько капель разведенной серной кислоты.

Микроскопическая картина. Хитин окрашивается в ярко-фиолетовый цвет.

Определение хитина и хитозана в мицелии

Техника. Отфильтрованный мицелий помещают в аппарат Сосклетта для удаления жира эфиром и, если надо, пигмента. Пигмент удаляют спиртобензолом (1:4), затем отмывают до полного исчезновения спиртобензола, заливают 4–5 % едким натром и кипятят на водяной бане 3–4 ч, после чего проверяют на белок биуретовой реакцией.

Для этого к 5–6 мл раствора добавляют такое же количество 10 % раствора щелочи, хорошо взбалтывают, после чего добавляют 2–3 капли 3 % раствора сернокислой меди и слабо нагревают; белок окрашивается в фиолетовый цвет.

Если реакция отрицательная, то мицелий отмывают от щелочи до нейтральной реакции и обрабатывают 50 % едким натром при 140 °С в течение 1–2 ч. Проверяют наличие хитозана качественной реакцией со слабым раствором йода; хитозан окрашивается в фиолетовый цвет.

Далее препарат заливают 1–2 % уксусной кислотой, в которой хитозан растворяется. После окончательного растворения хитозана, о чем судят по исчезновению фиолетовой окраски, остается хитин, который окрашивается слабым раствором йода в интенсивный коричневый цвет. Для количественного определения полученный материал заливают абсолютным спиртом на 2–3 ч, высушивают в вакууме при 40 °С и гидролизуют концентрированной соляной кислотой. Затем определяют количество редуцирующих сахаров (методом Хагедорна — Йенсена).

ОКРАШИВАНИЕ ЯДЕРНОГО АППАРАТА

Метод Фельгена

Техника. Препарат фиксируют жидкостью Карнуа в течение 10–30 мин, промывают 80 % спиртом и проводят через нисходящие концентрации спиртов. Реакция проявляется только в гидролизованном материале. Последовательность гидролиза: препарат помещают на 2–3 мин в 1 N раствор соляной кислоты при комнатной температуре, затем на 5–6 мин в 1 N раствор соляной кислоты, нагретой до 60 °С, и снова в первый раствор на 1–2 мин, затем помещают в реактив Шиффа на 2–3 ч. Реактив Шиффа готовят следующим образом: 0,5 г основного фуксина растворяют в 90 мл кипящей дистиллированной воды, охлаждают до 50 °С, фильтруют и прибавляют 3 мл концентрированной соляной кислоты. Отдельно в 10 мл холодной воды растворяют 2 г безводного или 4 г кристаллического сульфата натрия. Полученный раствор сульфата приливают к раствору фуксина, охлажденному до 25 °С.

Второй способ приготовления раствора Шиффа: 1 г основного фуксина для фуксинсернистой кислоты растворяют в 200 мл кипящей дистиллированной воды, охлаждают до 50 °С, фильтруют и добавляют 20 мл 1 N соляной кислоты, охлаждают до 25 °С и добавляют 1 г метабисульфита натрия или калия. Реактив хранят на холоду в широкой склянке с притертой пробкой. Реактив считается пригодным, пока он сохраняет запах сернистого газа и цвет бледного чая (розовая окраска является цветом непригодности).

Препарат промывают по 15–20 мин в трех порциях сернистых вод и затем в дистиллированной воде. Способ приготовления сернистых вод: 1) к 200 мл дистиллированной воды добавляют 4 мл концентрированной соляной кислоты; отдельно в 25 мл дистиллированной воды растворяют 4 г безводного или 8 г кристаллического сульфата натрия, приливают этот раствор к подкисленной воде, взбалтывают и дают отстояться или 2) 0,5 г метабисульфита натрия или кали, 5 мл 1 N соляной кислоты помещают в колбу и доводят объем раствора до 100 мл дистиллированной водой. Для получения более контрастных препаратов их докрашивают 0,1–0,25 % раствором, лучше слабо подкисленным, светло-зеленого или водного голубого (вассерблау). Препарат промывают водой, высушивают, проводят через ряд спиртов восходящей концентрации до абсолютного, ксилол и помещают в бальзам.

Микроскопическая картина. Ядерные элементы окрашиваются в красно-фиолетовый цвет, протоплазма при докрашивании приобретает зеленый оттенок. Лучше всего окрашиваются конидии несовершенных грибов.

Трехцветное окрашивание по Флеммингу

Техника. Препарат фиксируют любым способом, помещают на 5–12 ч в 1 % раствор сафранина, который готовят смешиванием 1 % раствора водорастворимого сафранина и воды (1:1); промывают в воде, затем в спирте, снова трехкратно в воде по 15 мин, затем помещают в 2 % водный раствор генцианового фиолетового на 30 мин, промывают водой и помещают в 1 % водный раствор оранжевого на 1–3 мин, после чего промывают в гвоздичном масле.

Микроскопическая картина. Протоплазма окрашивается в розовый цвет, ахроматиновые элементы клетчатки — в фиолетовый, хроматиновые структуры — в красный.

Окрашивание гематоксилином Делафильда

Техника. Препарат фиксируют 35–50 % спиртом и помещают в краситель, для изготовления которого 1 г гематоксилина растворяют в 6 мл абсолютного спирта и этот раствор вливают по каплям в 100 мл насыщенного водного раствора аммонийных квасцов и оставляют стоять в течение недели, затем прибавляют по 25 мл глицерина и метилового спирта и фильтруют через 4 ч. Время окрашивания 3–30 мин. Препарат промывают в нескольких сменах воды 5–30 мин. Для дифференциации структур клетки к воде или спирту добавляют соляную кислоту (1 капля на 100 мл воды). После чего промывают 70 % спиртом и водой.

Микроскопическая картина. Ядра окрашиваются в красный цвет, протоплазма — в фиолетовый.

Окрашивание гематоксилином и эозином (или эритрозином)

Техника. Препарат окрашивают гематоксилином Делафильда и дифференцируют подкисленным спиртом. Срезы объекта погружают в 1 % спиртовой раствор эозина (или эритрозина) на 1–2 мин, проводят через крепкие спирты, промывают как обычно.

Микроскопическая картина. Ядро и клетчатка окрашиваются в пурпурный цвет, протоплазма — в розовый. Особенно хорошо окрашиваются ржавчинные грибы.

Окрашивание борным кармином

Применяется при изучении ядер, хромосом и т. д.

Техника. В 100 мл воды, нагретой до 50 °С, растворяют 4 г буры, добавляют 3 г кармина, а потом доливают 100 мл 70 % спирта и фильтруют. Препарат фиксируют любым способом, промывают, обезвоживают до 50 % проводкой через спирты, погружают в краситель на 1–3 дня, промывают 70 % спиртом, подкисленным 1–2 каплями соляной кислоты, 2–3 дня.

Микроскопическая картина. Ядра окрашиваются в яркий розовый цвет.

Окрашивание ацетокармином

Техника. Нефиксированный препарат помещают в краситель, приготовленный следующим образом: насыщают кармином 45 % (по объему) раствор уксусной кислоты при температуре кипения; после остывания, отстаивания и фильтрации на каждые 100 мл раствора прибавляют 1–2 капли 1–5 % раствора уксуснокислого железа. Время окрашивания — 1–24 ч.

Микроскопическая картина. Ядра окрашиваются в яркий розовый цвет.

Окрашивание пирокармином

Техника. Препарат фиксируют спиртом, промывают водой и помещают в краситель, приготовленный следующим образом: 1 г кармина растворяют в 50 мл воды с 50 мл крепкого аммиака, добавляют 50 мл насыщенного раствора пикриновой кислоты и оставляют в растворе красителя на 2–3 дня, затем фильтруют.

Микроскопическая картина. Ядра окрашиваются в яркий розовый цвет.

Окрашивание методом HCl-Гимза

Особенно хорошо окрашиваются ядра в гифах несовершенных грибов.

Техника. Препарат фиксируют метиловым спиртом, смесью спирта с формалином или жидкостью Карнуа по следующей схеме: фиксация жидкости Карнуа 10 мин; промывка в 96° спирте; выдерживание в 70° спирте 30 мин; промывка в дистиллированной воде; выдерживание в холодной соляной кислоте 6 мин; гидролиз 4–6 мин при 60 °С; промывка в холодной 1 N соляной кислоте и дистиллированной воде; выдерживание 15 мин в буферном растворе (фосфатный буфер, рН 6,9), затем 30–40 мин в растворе Гимза (исходный раствор и буфер (1:1) готовят непосредственно перед употреблением).

Приготовление раствора Гимза: 3,8 г азурэозина растворяют в 125 мл глицерина при 60 °С, добавляют 395 мл метилового спирта и фильтруют.

Микроскопическая картина. Ядра окрашиваются в синий цвет. При микрокопировании препарат помещают в глицерин.

МИКРОСКОПИЯ ВИРУСОВ

Как известно, вирусы не могут быть рассмотрены в световом микроскопе, поэтому в световом микроскопе изучают включения или ткани, пораженные вирусом. Изменения, происходящие в тканях, изучают с помощью методов и приемов гистологического исследования, которые рассматриваются в соответствующих руководствах.

Препараты для микрокопирования элементарных телец и включений готовят из мазков и отпечатков органов и тканей. Подготовленные мазки немедленно фиксируют. С этой целью применяют простые и сложные фиксаторы. Среди простых чаще других употребляют метиловый спирт, смесь Никифорова (спирта и эфира поровну), ацетон. Среди сложных фиксаторов нашли применение следующие: 1) смесь Дюбоска — Бразилия — Буэна: пикриновой кислоты 1 г, имеющегося в продаже (40 %) формалина 60 мл, спирта (80°) 150 мл и ледяной уксусной кислоты 15 мл; 2) сулемовые смеси: а) Шаудина: насыщенного раствора сулемы 2 части и абсолютного спирта 1 часть; б) Ценкера: сулемы 5 г, бихромата калия 2,5 г, сульфата натрия 1 г, ледяной уксусной кислоты 5 мл, дистиллированной воды 100 мл. Уксусную кислоту добавляют в смесь перед употреблением; в) Хелли — Максимова: сулемы 5 г, бихромата калия 2,5 г, имеющегося в продаже неразведенного формалина 10 мл, 2 % раствора осмиевой кислоты 10 мл, дистиллированной воды 100 мл. Формалин и осмиевую кислоту добавляют в смесь перед употреблением.

ОКРАСКА ПРЕПАРАТОВ

Окраска по Романовскому

Техника. Высушенные на воздухе препараты без фиксации опускают на 1–2 мин в раствор неразведенного красителя Романовского. Затем их промывают дистиллированной водой, высушивают на воздухе и микрофотографируют с иммерсионной системой.

Микроскопическая картина. Элементарные тельца, окрашиваемые этим способом, имеют синий цвет на голубом фоне препарата.

Окраска по Муромцеву

Техника. Влажные мазки или отпечатки фиксируют 1–2 ч в этиловом или метиловом спирте комнатной температуры или 15–20 мин в спирте, подогретом до 50–70 °С. После промывания дистиллированной водой красят 5–10 мин синим Менсона, разведенным в 40 раз.

Синий Менсона: в 10 мл кипящей воды растворяют 5–8 г химически чистой буры, добавляют 2 г метиленового синего. Окрашенный препарат, не промывая, дифференцируют 5–10 мин в водном растворе танина (5–10 %). После приобретения препаратом голубоватого оттенка его промывают дистиллированной водой и подсушивают фильтровальной бумагой. Препарат проводят через абсолютный спирт или 50 % смесь абсолютного спирта с ацетоном, после чего он готов для микрофотографирования.

Микроскопическая картина. В окрашенном препарате фон и цитоплазма клеток — бледно-голубые, тельца Бабеша — Негри резко очерчены, фиолетовые с розовым оттенком, ядра — синие, ядрышки — темно-синие, эритроциты — оранжево-красные.

Окраска по Морозову

Техника. Приготовление реактивов и порядок окраски см. выше.

Микроскопическая картина. Элементарные тельца имеют вид темно-коричневых, почти черных зерен на светло-коричневом фоне.

Окраска по Селлеру

Техника. Влажный мазок или отпечаток без фиксации 10 с окрашивают смесью из насыщенных растворов в метиловом спирте основного фуксина (3–5 мл) и метиленового синего (15 мл), а также чистого метилового спирта (25 мл). Промывают проточной водой и сушат на воздухе; препарат готов для микрофотографии.

Микроскопическая картина. Тельца Бабеша — Негри — пурпурно-красные, цитоплазма, ядра и ядрышки — синие, эритроциты — кирпично-красные (см. цв. вкл. XXXII).

Окраска по Пизгаревскому

Техника. Препарат, высушенный на воздухе в течение 10 мин и нефиксированный, окрашивают 1 мин смесью, состоящей из насыщенных растворов метилового зеленого (3,2 мл), пиридина (6 мл), оранжевого (1 мл) и дистиллированной воды (75 мл). После промывания проточной водой дальнейшая окраска, как по Селлеру (см. выше).

Микроскопическая картина. Цитоплазма клеток — сиреневого цвета, включения — ярко-красные.

ЗАДАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ЗАНЯТИЮ

1. Приготовление мазков и окраска культур кокковых и палочковидных бактерий простым методом.

2. Окраска смеси бактерий по Граму в модификации Синева.

3. Окраска спор *Bacillus subtilis* по методу Ожешко.

4. Приготовление негативного препарата по Бурри — Гинсу из капсульной культуры *Klebsiella pneumoniae*.

5. Изучение подвижности *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis* методом темнопольной микроскопии в препаратах «раздавленная» и «висячая» капля.

6. Окраска культуры дрожжеподобного гриба *Candida albicans* метиленовым синим.

7. Микроскопическое исследование плесневых грибов аспергилла, пеницилла и мукора в растворе едкого кали и в смеси глицерина со спиртом.

8. Изучение музейных макроколоний патогенных грибов.

9. Изучение демонстрационных препаратов возбудителей протозойных инфекций: лейшманиоза, трипаносомоза, лямблиоза, трихомониоза, амебиаза, малярии, токсоплазмоза.

10. Изучение риккетсий в демонстрационных препаратах по Здродовскому.

11. Микроскопическое изучение в демонстрационных препаратах элементарных тел Пашена и внутриклеточных включений Гварньери и Бабеша — Негри.

Раздел 2.

ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Тема: ПИТАНИЕ БАКТЕРИЙ. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ БАКТЕРИЙ. ИСКУССТВЕННЫЕ ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

Цель: Охарактеризовать принципы культивирования бактерий.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Химический состав микробной клетки.
2. Роль минеральных веществ и факторов роста в жизнедеятельности микроорганизмов.
3. Способы питания бактерий.
4. Механизмы питания бактерий.
5. Основные группы питательных сред, их состав и назначение.
6. Требования, предъявляемые к питательным средам.
7. Понятие о чистой культуре микроорганизмов и методы выделения.
8. Выделение чистых культур аэробных бактерий (1-й этап).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дикий И.Л., Холупяк И.Ю., Шевелева Н.Е., Стегний М.Ю. Микробиология. – Х.: Прапор: Изд-во УкрФА. 1999. – С. 50–56.
2. Елинов Н.П., Заикина Н.А., Соколова И.П. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. – М.: Медицина, 1988. – С. 36–45.

Питательные среды служат для выделения из исследуемого материала чистых культур микробов и изучения их свойств.

Питательные среды являются основой бактериологических работ, нередко определяя своим качеством результаты исследования.

В состав сред, применяемых для выращивания бактерий, входят необходимые для построения их структуры органогены: азот, углерод, кислород, неорганические соединения, содержащие фосфор, серу,

натрий, магний, железо, микроэлементы: кобальт, йод, марганец, бор, медь и др.

Все неорганические элементы должны находиться в питательной среде в удобоусвояемых для данного микроорганизма соединениях. Потребность в кислороде и водороде бактерии удовлетворяют за счет поступающей в клетки воды.

По характеру усвоения азота патогенные микроорганизмы делятся следующим образом: одни из них извлекают его из простых аммонийных соединений, другие нуждаются в аминокислотах, третьи расщепляют высокомолекулярные вещества — пептоны, представляющие собой продукты ферментации белков. Облигатные паразиты размножаются только в присутствии нативного, т. е. неизменяемого белка.

Потребность бактерий в неорганических элементах удовлетворяется прибавлением к питательной среде NaCl , K_2HPO_4 , K_2HPO_4 и т. д. Микроэлементы, выполняющие роль катализаторов химических процессов, поступают в питательную среду с пептоном, неорганическими солями и водой.

Кроме того, бактерии нуждаются в ростовых факторах, которые по своей роли соответствуют витаминам для животных. Источником факторов роста являются прибавляемые к питательной среде продукты растительного и животного происхождения, содержащие в своем составе никотиновую, парабензойную кислоты, витамины А, В, С и др.

Ряд микробов в процессе жизнедеятельности вырабатывают кислоты, сдвигающие рН в кислую сторону, вследствие чего может прекратиться их рост. Поэтому к питательным средам добавляют так называемые буфер-вещества, сохраняющие установленную реакцию среды (например, фосфорнокислые соли).

Правильный подбор состава среды обеспечивает возможность выделения микроорганизмов из мест их обитания, получения чистых культур, изучения их морфологии и биохимических особенностей, способствует быстрой и правильной диагностике инфекционных заболеваний, дает возможность получить биомассу полезных для народного хозяйства микроорганизмов. Питательные среды не могут быть универсальными для всех видов микробов, так как микроорганизмы обладают индивидуальными особенностями питания и проявляют свои характерные физиологические свойства в определенных условиях обмена. Поэтому на практике пользуются разнообразными питательными средами применительно к тому или иному виду микробов.

ТРЕБОВАНИЯ, ПРЕДЪЯВЛЯЕМЫЕ К ПИТАТЕЛЬНЫМ СРЕДАМ

Готовые питательные среды должны:

- ✓ удовлетворять потребностям обмена веществ микробной клетки;
- ✓ легко усваиваться бактериями;
- ✓ содержать необходимые соли (NaCl, K, Mg, Ca);
- ✓ быть стерильными;
- ✓ иметь оптимальный pH;
- ✓ иметь достаточную влажность (плотная среда должна иметь не меньше 60 % влаги);
- ✓ содержать факторы роста.

По составу питательные среды подразделяются на естественные, искусственные и синтетические.

Естественные среды состоят из натуральных продуктов животного или растительного происхождения. Основой таких сред являются молоко, яйца, овощи, животные ткани, желчь, сыворотка крови. На естественных средах хорошо развиваются многие микроорганизмы, так как в таких средах имеются все компоненты для их роста и размножения.

Синтетические среды — это такие среды, в состав которых входят только определенные, химически чистые соединения, взятые в точно указанных концентрациях. Синтетические среды могут иметь большой набор компонентов, но могут быть и простыми по составу. Эти среды удобны для исследования обмена веществ микроорганизмов. Зная точный состав и количество входящих в среду компонентов, можно изучить их потребление и превращение в соответствующие продукты обмена.

По консистенции среды бывают жидкие, полужидкие, плотные, сыпучие и сухие.

Жидкие среды применяют для изучения физиолого-биохимических особенностей микроорганизмов, для накопления биомассы или продуктов обмена микроорганизмов. Примером наиболее часто применяемой жидкой питательной среды является мясо-пептонный бульон (МПБ).

Для его приготовления сначала готовят мясной отвар. С этой целью свежее мясо (говядину, телятину) освобождают от костей и сухожилий, пропускают через мясорубку. 500 г такого фарша заливают 1 л водопроводной воды и оставляют на 24 ч для экстрагирования необходимых для питания микроорганизмов веществ. Затем мясо отжимают через марлю и полученный настой кипятят в течение 30 мин для свертывания

белка, который отделяют фильтрованием. Отфильтрованный настой стерилизуют. Стерильная мясная вода является основой для приготовления мясо-пептонного бульона. Для этого к 1 л мясной воды добавляют 10 г пептона и 5 г NaCl. Пептоны добавляют взамен свернувшегося белка. Они являются продуктами неполного разрушения белка, получаемыми кислотным или ферментативным гидролизом мяса или молочного казеина. Преимуществом этих источников аминокислот является то, что они легко усваиваются и при стерилизации не свертываются. Поэтому стерильный бульон остается прозрачным.

Рост микроорганизмов в таких средах легко отмечается визуально по появлению мутности. МПБ — богатая питательная среда, но в ней мало углеводов.

Плотные среды необходимы для выделения и изучения свойств чистых культур микроорганизмов, так как на них можно получить изолированный рост отдельных клеток. Плотные питательные среды (мясо-пептонный агар (МПА)) готовят из жидких посредством добавления к ним агар-агара. Агар-агар (по-малайски — желе) получают из водорослей. Это сложный полисахарид, который образует гель с точкой плавления 96–100 °С и температурой застывания 40 °С. Несколько циклов плавления и затвердевания не влияют на способность агара образовывать гель, поэтому агаровые среды можно несколько раз стерилизовать.

Плотные питательные среды получают, добавляя к жидким 1–2 % агар-агара. Среду с внесенным в нее агаром нагревают на водяной бане до расплавления последнего. Полученный горячий раствор фильтруют через гигроскопическую вату и разливают по чашкам Петри и пробиркам.

Сухие питательные среды изготавливаются в виде сухих порошков, которые хорошо растворяются в воде при комнатной температуре. Преимущество таких сред в их стандартности, стабильности, простоте приготовления и удобстве при транспортировке. Сухие питательные среды представляют собой гигроскопические порошки, хранящиеся в специальных флаконах. В лаборатории из порошков готовят соответствующие питательные среды по прописи, указанной на этикетке. Чаше всего применяют сухой питательный агар, среду Эндо.

По назначению среды подразделяются на обычные (простые), специальные, элективные, дифференциально-диагностические.

Обычные (простые) среды используют для культивирования большинства микроорганизмов. Это мясо-пептонный бульон (МПБ), мясо-пептонный агар (МПА).

Специальные среды — это среды, предназначенные для выявления тех или иных микроорганизмов или получения культуры микроорганизмов, обладающих особыми свойствами.

Среди специальных сред различают:

- ✓ **элективные** (избирательные);
- ✓ **дифференциально-диагностические** (индикаторные) среды.

Элективные среды (от лат. electus — избираю) подобраны таким образом, чтобы обеспечить оптимальные условия для выращивания определенных микроорганизмов. В них могут быть добавлены вещества, избирательно подавляющие развитие сопутствующей микрофлоры. При посеве материала, содержащего смесь различных микроорганизмов, раньше всего проявляется рост того вида, для которого данная среда будет избирательно пригодна.

Сопутствующие микроорганизмы или совсем не растут на таких средах, или развитие их задерживается. Такие среды применяют для выделения микробов определенных видов из объектов, содержащих постороннюю микрофлору.

Например, холерный вибрион может развиваться в присутствии относительно высокой концентрации щелочи (1 %), губительно действующей на сопутствующую микрофлору. Дифтерийная палочка опережает по скорости роста на свернутой кровяной сыворотке Леффлера сопутствующую микрофлору зева.

Дифференциально-диагностические среды применяются для изучения биохимических свойств и отличия (дифференцировки) одного вида микроорганизмов от другого по характеру их ферментативной активности. Их состав подбирается с таким расчетом, чтобы он позволил четко выявить наиболее характерные свойства данного вида. Это достигается введением в среды специальных красителей-индикаторов (нейтральный красный, феноловый красный, метиленовый синий). Изменяя окраску при различных значениях рН, индикатор указывает на наличие или отсутствие расщепления, окисления или восстановления вводимого в среду субстрата.

Примером таких сред является среда Эндо, применяемая для выделения и определения бактерий кишечной группы. В состав этой среды входит МПА, лактоза и основной фуксин, обесцвеченный сульфитом натрия. Исходная питательная среда окрашена в светло-розовый цвет. При сбраживании лактозы образуется ацетальдегид, который взаимодействует с сульфитом и окрашивает колонии кишечной палочки в красный с металлическим блеском цвет. Таким образом, на среде Эндо легко

отличить кишечную палочку от брюшно-тифозных и дизентерийных микроорганизмов, которые дают бесцветные колонии, так как не сбраживают лактозу. Однако индикатор не является обязательной составной частью сред, предназначенных для выявления ферментов. Так, наличие желатиназы и других протеолитических ферментов в культуре определяют по разжижению желатина, свернутого яичного или сывороточного белка.

По своему назначению дифференциально-диагностические питательные среды подразделяются следующим образом:

- ✓ Среды для выявления протеолитической и гемолитической способности микробов, содержащие в своем составе белковые вещества: кровь, молоко, желатин и т. д.
- ✓ Среды с индифферентными химическими веществами, которые служат источником питания для одних видов микробов и не усваиваются другими видами.
- ✓ Среды с углеводами и многоатомными спиртами для обнаружения соответствующих ферментов.
- ✓ Среды для определения редуцирующей способности микробов.

Засеянные среды выдерживают в условиях, обеспечивающих жизнедеятельность микроорганизмов. К таким условиям относятся температурный режим, влажность, аэрация, свет и другие специфические факторы.

Температура. Оптимальную для микроорганизмов температуру обеспечивают в специальных шкафах-термостатах. Термостат — прибор, в котором с помощью терморегуляторов поддерживается постоянная температура. За температурой в термостате следят по показаниям термометра. Используют термостат для выращивания микроорганизмов на питательных средах при оптимальной температуре. Для большинства патогенных микроорганизмов оптимальной температурой роста является температура +37 °С.

Влажность. Культивирование микроорганизмов возможно только во влажных условиях. Для бактерий необходима капельно-жидкая вода, так как питательные вещества проникают в клетку только в растворенном состоянии. Минимальное содержание свободной воды, при котором возможно развитие, для большинства бактерий равно 20 %. При культивировании в жидких средах проблема поддержания влажности отпадает. Плотные агаризованные среды всегда содержат некоторое количество капельно-жидкой воды. Она бывает заметна в виде конденсата на стенках пробирок. Однако при длительном хранении культур на плотных средах при комнатной температуре, и даже в холодильнике,

среды подсыхают, что может привести к гибели микроорганизмов. Поэтому необходимо производить регулярные своевременные пересевы культур, не допуская подсыхания сред.

Свет. Подавляющему большинству микроорганизмов свет не нужен. Прямые солнечные лучи отрицательно влияют на развитие многих микроорганизмов. В лабораторных условиях их культивируют в неосвещенных термостатах. Микроорганизмы, использующие в процессе обмена веществ энергию света, выращиваются при освещении. Для освещения обычно применяют лампы накаливания мощностью 75–100 Вт.

ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ

Чистая культура микроорганизма — это популяция клеток одного вида, выросшая на стерильной питательной среде. Чистую культуру выделяют путем получения потомства одной родительской клетки. Культура может расти в виде отдельных колоний на плотной питательной среде.

МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР АЭРОБНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Все методы выделения чистых культур из микробных смесей можно разделить на 2 группы:

1. Методы, основанные на принципах механического разделения микроорганизмов.
2. Методы, основанные на биологических свойствах микроорганизмов.

МЕТОДЫ, ОСНОВАННЫЕ НА ПРИНЦИПАХ МЕХАНИЧЕСКОГО РАЗДЕЛЕНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Рассев шпателем по Дригальскому

Берут 3 чашки Петри с питательной средой. На первую чашку петлей или пипеткой наносят каплю исследуемого материала и растирают шпателем по всей поверхности агара. Затем шпатель переносят во вторую чашку и втирают оставшуюся на шпателе культуру в поверхность питательной среды. Далее шпатель переносят в третью чашку Петри и аналогичным образом производят посев. На первой чашке вырастает максимальное количество колоний (сплошной рост), на третьей — минимальное в виде отдельно расположенных колоний.

Метод истощающего штриха

В целях экономии сред и посуды можно пользоваться одной чашкой, разделив ее на 4 сектора и последовательно засеив штрихом. Для этого материал берут петлей и проводят ею на расстоянии 5 мм друг от друга ряд параллельных штрихов сначала по поверхности первого сектора, а затем последовательно оставшимися на петле клетками засеивают все другие сектора. При каждом последующем штрихе происходит уменьшение количества засеваемых клеток. После посева чашки переворачивают вверх дном, чтобы конденсационная вода, образовавшаяся на крышке чашки Петри, не мешала получить изолированные колонии. Чашки выдерживают в термостате 1–7 сут, так как скорость роста различных микроорганизмов неодинакова.

Таким образом, в первых секторах получается сплошной рост, а вдоль последующих штрихов вырастают обособленные колонии, представляющие собой потомство одной клетки.

Метод прогревания

Позволяет отделить спорообразующие бактерии от неспоровых форм. Прогревают исследуемый материал на водяной бане при 80 °С 10–15 мин. При этом погибают вегетативные формы, а споры сохраняются и при посеве на соответствующую питательную среду прорастают, образуя колонии только спорообразующих бактерий.

Метод обогащения

Исследуемый материал засеивают на селективные питательные среды, способствующие росту определенного вида микроорганизмов.

Метод заражения лабораторных животных

Этот метод используется для выделения чистой культуры из патологического материала, загрязненного посторонней микрофлорой, или в том случае, когда в исследуемом материале очень мало патогенных микроорганизмов.

Для заражения подбирают наиболее восприимчивые к предполагаемому возбудителю инфекции виды животных. Например, для выделения пневмококка из мокроты заражают белую мышь. Это животное весьма чувствительно к данному микробу и резистентно к другим микробам, находящимся в мокроте. В связи с этим пневмококк быстро размножается в организме мыши, а другие микробы погибают. Через 18–20 ч после заражения мышь забивают и кровь, взятую из сердца, засеивают на питательную среду. Так как в крови содержится один пневмококк, то на питательной среде вырастает чистая культура.

МЕТОДЫ, ОСНОВАННЫЕ НА БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВАХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Биологические методы выделения чистых культур основаны на учете того или иного свойства выделяемого микроба, отличающего его от других, находящихся с ним в смеси.

Метод Шукевича

Применяется для выделения подвижных микроорганизмов. Исследуемый материал засевают в конденсационную воду скошенного агара, находящегося в пробирке. При размножении подвижные формы микробов из конденсационной воды распространяются по агару, как бы «вползают» на его поверхность. Из верхней части роста производят высев в конденсационную воду свежей питательной среды. Производя таким образом несколько пересевов, в конце концов получают чистую культуру подвижной бактерии.

Метод ингибирования

Основан на различном действии некоторых химических веществ и антибиотиков на микроорганизмы. Определенные вещества угнетают рост одних микроорганизмов и не оказывают влияния на другие. Например, небольшие концентрации пенициллина задерживают рост грамположительных микроорганизмов и не влияют на грамотрицательные.

ПЕРВЫЙ ЭТАП ВЫДЕЛЕНИЯ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ

1. Из исследуемого материала готовят мазок, окрашивают по Граму и микроскопируют.

2. Производят посев на чашки Петри с питательным агаром. Для этого исследуемый материал в случае необходимости разводят стерильным физиологическим раствором. Одну каплю приготовленного разведения наносят петлей на поверхность питательной среды в чашке Петри и тщательно втирают шпателем в среду, равномерно распределяя материал по всей ее поверхности. После посева чашку переворачивают дном вверх, подписывают и помещают в термостат при 37 °С на 18–24 ч.

3. Производят посев на элективную питательную среду.

4. Производят посев на дифференциально-диагностическую среду.

5. Заражают лабораторных животных исследуемым материалом.

ЗАДАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ЗАНЯТИЮ

1. Демонстрация коллекции питательных сред, применяемых в микробиологии (мясо-пептонный агар, мясо-пептонный бульон, среда Сабуро, сухие питательные среды).

2. Произвести посев *E. coli* на жидкую питательную среду.

Посевы производят так, чтобы в питательную среду не попали из воздуха посторонние микробы.

Все манипуляции, связанные с посевом микробных культур, производят над пламенем горелки. Бактериальную петлю прокаливают над пламенем непосредственно перед взятием материала, затем петлю остужают. Для этого при посеве микробной культуры из пробирки петлю погружают в конденсационную жидкость, а при посеве из чашек Петри прикасаются к поверхности питательной среды, свободной от микробного роста. Достаточно остуженная петля не вызывает шипения конденсационной жидкости и не растапливает агар при соприкосновении со средой.

При посеве в жидкую питательную среду петлю с находящимся на ней пересеваемым материалом вводят в пробирку до дна. Если материал вязкий и с петли не снимается, его растирают на стекле пробирки, а затем смывают жидкой средой.

3. Выделить чистую культуру путем посева смеси микроорганизмов на чашку Петри (посев штрихом).

При посеве смеси микробов на плотную питательную среду вначале отмечают секторы карандашом по дну чашки Петри.

Чашку Петри держат в левой руке, крышку приоткрывают настолько, чтобы в образовавшуюся щель свободно проходила петля. Небольшое количество исследуемого материала втирают бактериальной петлей в поверхность питательной среды у края чашки. Затем петлю прожигают, чтобы уничтожить избыток находящегося на ней материала. Линию посева начинают с того места, в котором находится материал. Бактериальную петлю кладут плашмя на питательную среду, чтобы не поцарапать ее поверхность, и проводят штрихи по секторам. Нужно стараться, чтобы штрихи, нанесенные петлей, располагались как можно ближе друг к другу, так как это удлиняет общую линию посева и дает возможность получить изолированные колонии микробов.

В результате бактерии равномерно распределяются на агаре, размножаются и дают скопление микробов в виде видимых невооруженным глазом отдельных колоний.

4. Выделить чистую культуру микроорганизмов методом прогревания.

Исследуемый материал прогреть в течение 10 мин при 80 °С на водяной бане, а затем произвести высев на чашку Петри. При этом погибают вегетативные формы, а споры сохраняются и при посеве на МПА прорастают в виде колоний.

Тема: РОСТ И РАЗМНОЖЕНИЕ БАКТЕРИЙ. КОЛОНИИ МИКРООРГАНИЗМОВ. ПИГМЕНТООБРАЗОВАНИЕ

Цель: Оценить основные признаки бактериальных колоний.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Рост и размножение бактерий.
2. Скорость и фазы размножения бактерий.
3. Колонии микроорганизмов.
4. Характеристика колоний.
5. Пигменты бактерий, биологическая роль, классификация.
6. Характер роста микроорганизмов на жидкой питательной среде.
7. Выделение чистых культур аэробных бактерий (2-й этап).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дикий И.Л., Холуяк И.Ю., Шевелева Н.Е., Стегний М.Ю. Микробиология. — Х.: Прапор: Изд-во УкрФА, 1999. — С. 58–60.
2. Елинов Н.П., Заикина Н.А., Соколова И.П. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. — М.: Медицина, 1988. — С. 50–53.

ХАРАКТЕР РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ НА ПЛОТНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

На поверхности плотной питательной среды отдельные бактериальные клетки, в том случае если они распределяются изолированно друг от друга, при размножении образуют скопления, называемые колониями. Каждая колония образуется в результате размножения одной или нескольких клеток.

Внешний вид колоний характерен для каждого бактериального вида и может служить (ориентировочно) его диагностическим признаком.

Различают поверхностные, глубинные и донные колонии в зависимости от того, где они развивались: на поверхности плотной питательной среды, в толще ее или на дне сосуда.

При описании колонии необходимо указывать возраст культуры, состав среды и температуру культивирования.

Выросшие на плотной питательной среде колонии просматриваются вначале невооруженным глазом или через лупу. Для более качественного исследования колоний используют микроскоп. Последний дает возможность рассмотреть колонию в проходящем и отраженном свете. При исследовании чашку помешают вверх дном на столик микроскопа, просматривают всю площадь и карандашом отмечают интересующую колонию.

Исследуемую колонию характеризуют по следующим признакам: размер, форма, консистенция, цвет, контуры края и внутренняя структура.

Размер колонии определяется ее диаметром. Различают точечные $d < 1$ мм, мелкие $d = 1-2$ мм, средние $d = 2-4$ мм, крупные $d = 4-6$ мм и более.

Размеры колоний варьируют у одного и того же вида. Это зависит от свойств самого микроба, а также от среды, в которой он находится. При посеве одного и того же штамма можно наблюдать типичные и атипичные по размерам колонии.

Форма колонии — округлая, неправильная, ризоидная. У большинства бактерий обнаруживаются чаще всего два типа колоний.

Гладкие S-колонии — круглые, выпуклые, имеют ровные края и гладкую блестящую поверхность. Они образуются в том случае, если микробные клетки после деления соприкасаются своими поверхностями. Свое название они получили от английского слова smooth — гладкий. Большинство патогенных микроорганизмов образуют S-колонии.

При посевах на жидкие питательные среды микроорганизмы, образующие S-колонии, вызывают равномерное помутнение среды.

Шероховатые R-колонии (от англ. — rough) характеризуются неправильной формой, зазубренными краями и морщинистой, шероховатой поверхностью. Формирование R-колоний обусловлено своеобразным делением бактерий, а именно наличием протоплазменных мостиков между разделившимися клетками и образованием цепочек, которые накладываются друг на друга.

В результате разделившихся бактерии имеют хаотическое расположение, что и создает неровные края и шероховатую поверхность.

При посевах на жидкие среды такие микроорганизмы дают зернистый осадок.

Структура колоний может быть аморфной, зернистой, ветвистой или рассыпчатой. У одного и того же вида бактерий структура колоний может изменяться в широких пределах и определяется характером расположения клеток после их деления. Если после деления микроорганизмы образуют петли из цепочек и нитей, то возникают разветвляю-

щиеся по поверхности среды колонии. Зигзагообразное перемещение клеток приводит к образованию складчатых колоний с неправильными краями.

Консистенцию колоний определяют, прикасаясь к ее поверхности бактериологической петлей. Колония может легко сниматься с агара, быть плотной, мягкой или растающей в агар, слизистой (прилипает к петле), тягучей, волокнистой (снимается целиком), хрупкой (легко ломается при прикосновении петлей).

Рельеф колонии характеризуется приподнятостью ее над поверхностью питательной среды. Различают куполообразные, конусовидные, плоские, кратерообразные колонии.

Характер края колонии определяют при рассмотрении ее под микроскопом. Различают ровные края в виде четко выраженной линии, неровные волнистые, зубчатые, бахромчатые.

ПИГМЕНТЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

Многие бактерии и грибы в процессе жизни выделяют красящие вещества-пигменты, придающие культурам разнообразный цвет и оттенки (белый, желтый, красный, розовый, золотистый, черный, зеленый, фиолетовый).

Образование пигмента для ряда микроорганизмов является стойким признаком вида, который используют при их идентификации.

Если пигмент растворим в воде, то питательная среда, в которой растут пигментирующие бактерии, также окрашивается в соответствующий цвет.

В зависимости от отношения к растворителям — воде, спирту, эфиру различают:

- ✓ пигменты, растворимые в воде (синий пигмент пиоцианин, выделяемый *Ps. aeruginosa*);
- ✓ пигменты, растворимые в спирте (красный пигмент — продигозан, выделяемый *B. prodigiosum*);
- ✓ пигменты, не растворимые ни в воде, ни в спирте (черный пигмент грибов). Пигменты у микробов играют защитную роль против действия солнечного света. Кроме того, они участвуют в процессе дыхания.

ХАРАКТЕР РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ НА ЖИДКИХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

Характер роста микроорганизмов на жидких питательных средах менее разнообразен, чем на плотных. Различают:

- ✓ *рост с равномерным (диффузным) помутнением жидкой среды* — характерен для факультативных анаэробов, обладающих подвижностью;
- ✓ *придонный рост* с образованием осадка на дне пробирки дают анаэробные микроорганизмы. Осадок отличается по консистенции. Он может быть вязким, слизистым, хрупким. Питательная среда над осадком может быть прозрачной или мутной. Цвет осадка и среды определяется наличием пигмента, продуцируемого культурой микробов. Если культура пигмента не образует, цвет среды не изменяется, а осадок, как правило, бывает белого или желтого цвета;
- ✓ *пристеночный рост* бактерий проявляется в том, что питательная среда, находящаяся в пробирке, остается совершенно прозрачной. Бактерии растут, образуя круглые или компактные зерна, прикрепленные к внутренней поверхности стенок сосуда, с которых в зависимости от вида бактерий снимаются легко или с трудом;
- ✓ *поверхностным ростом* отличаются аэробные микроорганизмы. Они образуют пленку различной плотности и консистенции на поверхности жидкой питательной среды. Цвет пленки, как и питательной среды, зависит от пигмента, вырабатываемого растущей культурой микробов.

ВТОРОЙ ЭТАП ВЫДЕЛЕНИЯ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ

1. Просматривают чашки Петри с посевом и изучают изолированные колонии, обращают внимание на их форму, величину, консистенцию и другие признаки.

2. Для определения морфологии клеток и их тинкториальных свойств из части исследуемой колонии готовят мазок, окрашивают его по Граму или другим методом и микроскопируют.

3. Для выделения и накопления чистой культуры одну изолированную колонию или несколько различных колоний пересевают в отдельные пробирки со скошенным агаром или какой-либо другой питательной средой.

4. Производят вскрытие зараженных лабораторных животных. Исследуют мазки-отпечатки различных органов. Производят посев крови животных на питательные среды.

ЗАДАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ЗАНЯТИЮ

1. Изучите характер роста *E. coli* на жидкой питательной среде (мясо-пептонном бульоне).

Отметьте:

- а) диффузное помутнение среды;
- б) осадочный рост;
- в) образование пленки;
- г) пристеночный рост.

2. Характеристика выросших колоний визуальным методом и с помощью микроскопа.

Чашку поверните дном к себе и рассмотрите колонии в проходящем свете. Найдите три разных типа колоний, пронумеруйте их и опишите.

Обратите внимание на следующие свойства:

- а) величину колоний;
- б) цвет колоний (наличие пигмента);
- в) форму колоний;
- г) поверхность;
- д) характер края колонии;
- е) консистенцию.

Данные исследования внесите в таблицу.

Таблица 1

Характеристика колоний

Но- мер	Колония						Морфология окраски по Граму
	Величи- на	Форма	Цвет	Поверх- ность	Край	Прозрач- ность	
1							
2							
3							

3. Приготовление мазков из разных колоний, окрашивание по Граму, микроскопия.

Обратите внимание на размер, форму бактерий и их окраску.

Сделайте зарисовки в альбом.

4. Пересев изученной колонии на скошенный агар для накопления чистой культуры.

При пересеве колонии на скошенный агар нужно бактериологической петлей брать культуру только из отмеченной, изученной ранее колонии, не задевая ближайших.

Засеянную пробирку подпишите и поставьте в термостат на 18–24 ч.

Оформите протокол.

**Тема: ФЕРМЕНТЫ БАКТЕРИЙ.
МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ
АКТИВНОСТИ БАКТЕРИЙ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ
ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ**

Цель: Охарактеризовать ферментативную активность микроорганизмов.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Классификация ферментов.
2. Конститутивные и адаптивные ферменты. Ферменты патогенности.
3. Биологическая роль ферментов в микробных клетках.
4. Идентификация бактерий по ферментативным признакам.
5. Применение ферментов в биотехнологии и медицине.
6. Выделение чистых культур аэробных бактерий (3-й этап).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Дикий И.Л., Холуцяк Н.Ю., Шевелева Н.Е., Стегний М.Ю.* Микробиология.– Х.: Прапор: Изд-во УкрФА, 1999.– С. 56–57.
2. *Елинов Н.П., Заикина Н.А., Соколова И.П.* Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии.– М.: Медицина, 1988.– С. 40–42, 48–50.

В жизнедеятельности микробов ферменты играют большую роль. Они являются обязательными участниками разнообразных биохимических реакций, лежащих в основе функций дыхания, питания, размножения.

Микроорганизмы обладают большим разнообразием ферментов. Они или просто связаны с клеточными структурами бактерий, или растворимы и легко извлекаются из клетки. Основной составной частью ферментов является белок.

Являясь биологическими катализаторами, ферменты обеспечивают течение в бактериальных клетках биохимических реакций, без которых невозможно их развитие. Кроме того, выделяясь во внешнюю среду, ферменты разлагают сложные органические вещества на более простые компоненты, удобные для усвоения бактериальной клеткой.

Выделяемые бактериями во внешнюю среду ферменты обуславливают биохимическую активность бактерий, причем качественная сто-

рона биохимической активности бактерий всегда строго специфична для данного вида.

Биохимическая активность микробов установилась под влиянием внешних условий в процессе их эволюционного развития. В связи с этим большей биохимической активностью обладают сапрофитные бактерии, приспособившиеся жить за счет мертвых органических субстратов внешней среды, для расщепления которых необходимы все группы ферментов.

Патогенные бактерии обладают меньшей биохимической активностью, имея в своем составе лишь строго определенные ферменты.

Каждый вид микроорганизмов продуцирует постоянный для него набор ферментов, одни из которых расщепляют в разной степени белки и углеводы, а другие вызывают окисление и восстановление различных субстратов.

Относительная стабильность ферментных систем бактерий позволяет использовать биохимические свойства бактерий в сочетании с их морфологическими, культуральными и другими постоянными признаками для определения видов и типов бактерий, выделяемых из организма больного при инфекционных заболеваниях.

В микробиологической практике для обнаружения ферментов исследуемую культуру микробов засевают на специальные диагностические среды (см. стр. 65).

В условиях практической микробиологической лаборатории наиболее часто производят изучение сахаролитических и протеолитических ферментов.

САХАРОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ МИКРОБОВ

Способность расщеплять различные углеводы с образованием кислот, альдегидов и газообразных продуктов характерна для значительного количества бактерий. Разнообразие ферментативных реакций у отдельных родов и видов бактерий используется в дифференциально-диагностических целях для идентификации исследуемых культур.

Свойство одних бактерий расщеплять данный углевод и его отсутствие у сравниваемых бактерий иногда является основным признаком, пользуясь которым возможно дифференцировать возбудитель заболевания.

Среды, используемые для определения сахаролитической активности бактерий, состоят из трех основных компонентов:

- 1) основного субстрата собственно питательной среды;
- 2) исследуемого углевода;
- 3) индикатора, указывающего на наличие или отсутствие расщепления данного углевода.

Для обнаружения сахаролитических ферментов исследуемую культуру бактерий засевают в питательные среды Гисса, называемые также «пестрым рядом».

Короткий «пестрый ряд» Гисса содержит 5 пробирок: с глюкозой, лактозой, маннитом, мальтозой и сахарозой.

Название «пестрый ряд» обусловлено тем, что под действием ферментов микроба одни углеводы остаются неизменными, и, следовательно, цвет питательной среды не меняется, в то время как микробы другого вида расщепляют сахара, образуя кислые продукты распада, которые изменяют цвет индикатора и, соответственно, цвет питательной среды.

Для обнаружения газов, являющихся конечными продуктами распада сахаров, в пробирки с жидкими средами Гисса опускают «поплавок» — трубочку диаметром 0,5–0,7 см, запаянную с одного конца. При образовании в среде газообразных продуктов поплавок всплывает на поверхность среды.

Данные свойства микроорганизмов широко используют для диагностики инфекционных болезней.

ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ МИКРОБОВ

Белковые молекулы, находящиеся в среде, не проникают внутрь бактериальной клетки. Естественно, что бактерии должны обладать механизмом, обуславливающим внеклеточное расщепление белка до более мелких молекул, пригодных для ассимиляции. Некоторые виды микроорганизмов продуцируют и выделяют во внешнюю среду протеолитические ферменты — *протеазы*, катализирующие расщепление белков. В результате расщепления молекулы белка образуются высокомолекулярные промежуточные продукты распада — *пептоны*, альбумозы и полипептиды. Под действием других протеолитических ферментов пептоны в свою очередь расщепляются на *полипептиды* (соединение двух или нескольких аминокислот и отдельные аминокислоты). Для выявления протеолитических ферментов исследуемую культуру микроба засевают в питательную среду, содержащую 10–20 % желатина. Посевы инкубируют при температуре 20–22 °С в течение нескольких дней. При наличии протеолитических ферментов бактерии разжижают столбик питательной среды с желатином, причем в зоне контакта образуется фигура, напоминающая воронку или елочку. Для патогенных микроорганизмов разжижение желатина является диагностическим признаком.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНДОЛА В КУЛЬТУРЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

Некоторые виды патогенных микробов с выраженной протеолитической активностью обладают способностью расщеплять белок и пептон до продуктов глубокого распада в виде индола и сероводорода.

Индол образуется при расщеплении сложной гетероциклической кислоты — триптофана. Для выявления индолообразования петлю исследуемой культуры засевают в среду Строгова. Тотчас после посева в пробирку вносят полоску индикаторной бумаги, пропитанную раствором шавелевой кислоты так, чтобы индикаторная бумага не касалась питательной среды. Для этого верхнюю треть бумажной полоски прижимают пробкой к стенке пробирки. Посевы инкубируют 24–28 ч при температуре 37 °С. Образование индола определяют по окрашиванию нижнего конца индикаторной бумаги в бледно-розовый цвет, хорошо заметный в проходящем свете.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СЕРОВОДОРОДА

Сероводород является конечным продуктом расщепления серосодержащих аминокислот: цистина, цистеина и метионина. Петлю исследуемой культуры микробов засевают в пробирку с мясо-пептонным бульоном. Тотчас после посева в пробирку вносят пропитанную ацетатом свинца полоску индикаторной бумаги. В положительных случаях образующийся в культуре сероводород вступает в соединение с бесцветным ацетатом свинца и превращается в сульфат свинца, который придает индикаторной бумаге черно-бурое окрашивание.

Окончательный учет результатов на образование индола и сероводорода проводят на 7–10 день после посева, так как процесс ферментативного расщепления белка и образование конечных продуктов распада происходит в течение длительного времени.

ТРЕТИЙ ЭТАП ВЫДЕЛЕНИЯ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ

1. Отмечают характер роста выделенной чистой культуры. Чистая культура характеризуется однородным ростом.

2. Микроскопия окрашенного мазка, приготовленного из такой культуры (в нем обнаруживаются морфологически и тинкториально однородные клетки).

3. Пересев на среды Гисса, изучение других биохимических признаков.

4. Изучение антигенных и вирулентных свойств выделенной культуры.

ЗАДАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ЗАНЯТИЮ

1. Изучите выросшую культуру на скошенном агаре, приготовьте мазок, окрасьте по Граму.

Визуально чистая культура характеризуется однородным ростом. При микроскопическом исследовании окрашенного мазка, приготовленного из такой культуры, в нем обнаруживаются морфологически и тинкториально однородные клетки. В случае выраженного полиморфизма, присущего некоторым видам бактерий, в мазках из чистой культуры наряду с типичными встречаются и другие формы клеток.

2. Посейте чистую культуру микроорганизмов на среды Гисса.

Пробирки с набором сред Гисса поставьте в штатив в один ряд. На каждой пробирке подпишите название сахара, содержащегося в среде. На первой пробирке каждого ряда, кроме названия сахара, укажите исследуемую культуру. Произведите посев.

3. Определите наличие протеолитической активности микробов на мясо-пептонном желатине.

Посев произведите уколом, погружая петлю с исследуемой культурой вглубь питательной среды до дна пробирки.

Там, где под действием протеолитических ферментов микробов произошло расщепление белков желатина, отмечается разжижение питательной среды.

4. Определите индолообразование выделенной культуры микроорганизмов.

Для выявления индолообразования петлю исследуемой культуры засейте в пробирку с мясо-пептонным бульоном. После посева в пробирку внесите полоску индикаторной бумаги, пропитанную раствором щавелевой кислоты, так, чтобы индикаторная бумага не касалась питательной среды. Посевы инкубируют в термостате 24–48 ч при температуре 37 °С. Образование индола определяют по окрашиванию бумаги в бледно-розовый цвет.

5. Определите способность изучаемой культуры микроорганизмов выделять сероводород.

Петлю исследуемой культуры засейте в пробирку с мясо-пептонным бульоном. Затем в пробирку внесите пропитанную ацетатом свинца полоску индикаторной бумаги. В положительных случаях образующийся в культуре сероводород вступает в соединение с бесцветным ацетатом свинца и превращается в сульфат свинца, который придает индикаторной бумаге черно-бурое окрашивание.

Тема: ДЫХАНИЕ БАКТЕРИЙ. БРОЖЕНИЕ. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР АНАЭРОБОВ

Цель: Освоить методы выделения чистых культур анаэробных микроорганизмов.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Типы дыхания микроорганизмов.
2. Сущность процесса дыхания микробов.
3. Особенность процесса брожения.
4. Принципиальное различие дыхания и брожения как энергетических процессов бактериальной клетки.
5. Питательные среды для культивирования анаэробов.
6. Методы культивирования анаэробов:
 - а) физический;
 - б) химический;
 - в) биологический.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дикий И.Л., Холуяк И.Ю., Шевелева Н.Е., Стегний М.Ю. Микробиология.– Х.: Прапор: Изд-во УкрФА, 1999.– С. 57–58.
2. Елинов Н.П., Заикина Н.А., Соколова И.П. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии.– М.: Медицина, 1988.– С. 41, 45–47.

Как отмечалось в разделе о питании бактерий, поступающие в микробную клетку питательные вещества трансформируются в составные части цитоплазмы, ядерные субстанции, оболочки клетки и т. д. Для этих сложных синтетических процессов необходима затрата определенного количества энергии, которую микробная клетка должна получать для поддержания своей жизнедеятельности также непрерывно, как и питательные вещества.

Затрата энергии необходима не только для синтетических процессов, но и для всех других многочисленных проявлений жизнедеятельности бактерий. Сюда относятся рост и размножение микробов, их движение, образование спор и капсул, выработка токсинов.

Микробные клетки всю необходимую энергию получают за счет экзотермических химических реакций, осуществляемых путем окисления различных химических соединений, обладающих большими запасами потенциальной энергии.

Совокупность биохимических процессов, в результате которых освобождается энергия, необходимая для жизнедеятельности клеток, называется *дыханием* или *биологическим окислением*. Бактериальные клетки, имея относительно простую структуру и чрезвычайно малые размеры, отличаются большим разнообразием типов дыхания.

В дыхании микроорганизмов определяющую роль играют окислительные ферменты, причем различные типы дыхания микробов связаны с определенным набором их ферментов.

В химизме дыхательных процессов всех типов дыхания микроорганизмов имеется много общего, однако по специфичности определенных стадий реакции выделяют аэробный, анаэробный и смешанный тип дыхания.

Во всех случаях первым этапом дыхания является отнятие водорода от субстрата с помощью специфических ферментов — дегидрогеназ. А так как в структуре атома водорода на орбите имеется один электрон, то процесс отнятия электрона водорода от субстрата расценивается как окислительный. Схема процесса: субстрат — H_2 + дегидрогеназа → окисленный субстрат + дегидрогеназа — H_2 .

Эта реакция является примером реакции окисления-восстановления. Сущность окисления состоит в потере электронов окисляющимся веществом, тогда как сущность восстановления состоит в присоединении электронов восстанавливаемому веществу.

В приведенной выше реакции фермент дегидрогеназа восстанавливается вследствие присоединения электронов водорода субстрата.

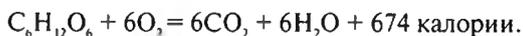
Последовательность биохимических реакций в протекании обменных процессов в бактериальной клетке возможна благодаря изменениям окислительно-восстановительного потенциала (μH_2), под которым понимают способность вещества отдавать или получать электроны.

Окислительно-восстановительный потенциал зависит от температуры, pH среды и других причин. Он может изменяться в зависимости от аэробно-анаэробно-факультативных анаэробов. Строгие анаэробы растут при μH_2 0–12, факультативные анаэробы — при 0–20, аэробы — при μH_2 14–20.

Бактерии в большинстве случаев получают необходимую энергию для своей жизнедеятельности путем окисления углеводов и некоторых органических кислот.

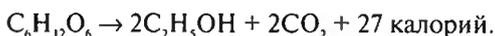
У аэробов процесс расщепления углеводов происходит путем окислительных реакций. При этом вещество разлагается до самых простых соединений — H_2O , CO_2 и др. с выделением большого количества тепловой энергии.

Процесс аэробного расщепления одной грамм-молекулы глюкозы можно представить следующим образом:

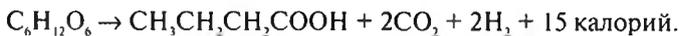


В анаэробных условиях расщепление вещества происходит за счет сложных внутримолекулярных химических превращений в бактериальной клетке, которое обеспечивается особой системой ферментов. Расщепление углеводов в анаэробных условиях называется процессом брожения. Пастер показал, что брожение в зависимости от видов микробов, которые его обуславливают, может быть спиртовым, маслянокислым, уксуснокислым. Это значит, что в процессе брожения образуется не только углекислый газ и вода, но и ряд более сложных продуктов: винный спирт, масляная или уксусная кислоты. Количество освобождающейся энергии в процессе брожения намного меньше, чем при аэробном дыхании.

Та же грамм-молекула глюкозы под действием дрожжевых клеток в анаэробных условиях расщепляется с освобождением всего лишь 27 калорий:



Маслянокислые бактерии расщепляют грамм-молекулу глюкозы с образованием 15 калорий:



Общность процессов аэробного дыхания и брожения выражается в том, что в обоих случаях расщепление углеводов до определенного момента идет по одному пути и сопровождается появлением одних и тех же промежуточных продуктов и лишь на конечных этапах в случаях анаэробных процессов распад углевода идет до спирта, молочной кислоты или других продуктов неполного окисления, а при аэробном — до полного окисления, т. е. до углекислоты и воды.

В энергетическом отношении аэробное дыхание целесообразнее анаэробного. Так, если при аэробном процессе окисление глюкозы до CO_2 и H_2O освобождается 674 калории, то при спиртовом брожении — 27 калорий, а при маслянокислом — всего лишь 15 калорий. Это объясняется тем, что конечные продукты, получаемые в результате анаэробного окисления, представляют собой сложные органические

соединения, имеющие большой запас энергии. Это приводит к тому, что значительная часть освобождающейся при анаэробном дыхании энергии улетучивается в виде тепла и только 30 % выделившейся энергии используется в процессах жизнедеятельности бактерий.

МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ АНАЭРОБНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Выращивание анаэробов более сложно, чем культивирование аэробных микроорганизмов.

Для выращивания анаэробов необходимо создать определенные условия, сущность которых заключается в удалении молекулярного кислорода из питательной среды и внешнего пространства.

Другим обязательным условием, обеспечивающим выделение анаэробов из исследуемого материала, является внесение большого количества посевного материала в питательную среду.

Для культивирования анаэробов применяют физические, химические и биологические методы.

ФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Кипячение среды — наиболее простой способ удаления растворенного в ней кислорода. Для этого непосредственно перед посевом материала пробирки с питательными средами кипятят на водяной бане в течение 10–20 мин, в результате чего из среды вытесняется воздух и, следовательно, удаляется кислород. Свежепрокипяченную среду быстро охлаждают под струей холодной воды, чтобы не произошло насыщение ее кислородом воздуха. Среду засевают материалом и заливают сверху вазелиновым маслом.

Посев в среды, содержащие редуцирующие и легко окисляемые вещества. В качестве редуцирующих веществ используют глюкозу, аскорбиновую кислоту, цистеин. Активно связываются с кислородом воздуха животные ткани паренхиматозных органов (печени, селезенки). Можно применять и ряд неорганических восстановителей: сульфиды, сероводород, цитрат титана. Редуцирующие вещества должны вводиться в концентрациях, не угнетающих рост микроорганизмов.

На свойстве животных клеток поглощать кислород основано применение сред:

Китта — Тароцци. Эта среда широко применяется для культивирования анаэробов. В ее состав входят: мясо-пептонный бульон, печень животного (обычно говяжья). Бульон сверху заливают слоем вазелинового масла и стерилизуют в автоклаве при 0,5 атм. 30 мин.

Среду Вильсона — Блера готовят из мясо-пептонного агара, к которому добавляют глюкозу, Na_2SO_3 , хлористое железо — FeCl_3 . На этой среде анаэробные микроорганизмы, возбудители газовой анаэробной инфекции, столбняка, ботулизма растут в глубине агара. При этом осуществляется восстановление сернистоокислого натрия до сернистого, последний же вступает в реакцию с хлорным железом, переводя его в сернистое железо, имеющее черный цвет. Наблюдается в пробирках и разрыв среды, свидетельствующий о газообразовании.

Метод Вейон — Виньяла заключается в том, что расплавленный в пробирке и охлажденный до 50°C питательный агар засевают исследуемым материалом, тщательно перемешивают и натягивают его в пипетку Пастера. После застывания среды запаивают пипетку с обоих концов или заливают концы парафином и помещают в термостат. Внутри трубки развиваются отдельные колонии анаэробов. Для выделения колонии трубку надрезают напильником, соблюдая правила асептики, на уровне колонии, ломают, а колонию захватывают стерильной петлей и переносят в пробирку с питательной средой для дальнейшего выращивания и изучения в чистом виде.

Создание вакуума в специальных аппаратах (анаэростатах)

Вакуумные условия для выращивания анаэробов создают в анаэростате. Анаэростаты — это воздушные эксикаторы, представляющие собой металлические цилиндрические сосуды с герметически закрывающейся крышкой. Они снабжены манометром, который показывает степень разреженности воздуха, и краном для присоединения к вакуумному насосу. Из анаэростата вакуумным насосом откачивается воздух. Анаэростаты способны сохранять высокое разрежение в течение длительного времени.

Пробирки и чашки Петри с анаэробными микроорганизмами сразу после посева помещают в анаэростат. Колонии анаэробов в вакуумных условиях растут на поверхности плотной питательной среды.

ХИМИЧЕСКИЙ МЕТОД

Метод Аристовского

Материал, исследуемый на наличие анаэробов, засевают на среде в чашки Петри и помещают их в эксикатор, на дно которого кладут химический поглотитель кислорода: гидросульфит натрия или пирогаллол. В расширенную часть сосуда устанавливают на подставке чашки с посевами. Прибор помещают в термостат при температуре 37°C на 24–48 ч.

БИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД

В почве, воде, человеческом и животном организме анаэробы постоянно встречаются с аэробами. При этом аэробы, поглощая необходимый для их жизни кислород, создают условия, благоприятствующие развитию анаэробных микроорганизмов. Тот же принцип лежит в основе биологических методов культивирования анаэробов в лабораторной обстановке. Для этого используют *метод Фортнера*. В чашку Петри наливают толстым слоем питательный агар. Когда агар застынет посредине чашки, стерильным скальпелем вырезают бороздку шириной 1–1,5 см. Затем одну половину среды засевают культурой аэроба, а другую — анаэробной культурой. Щель между дном и крышкой чашки промазывают вакуумной смазкой или заливают парафином. Затем чашку помещают в термостат. Быстрорастущие аэробы поглощают находящийся в чашке кислород и создают тем самым благоприятные условия для роста анаэробов.

ЗАДАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ЗАНЯТИЮ

1. Учите биохимическую активность микроорганизмов. Заполните таблицу.

Таблица 2

Биохимическая активность бактерий

Морфология бактерий	Окраска по Граму	Биохимические свойства								Вид культуры
		Сахаролитические ферменты					Протеолитические ферменты			
		1	2	3	4	5	1	2	3	
		Глюкоза	Лактоза	Сахароза	Мальтоза	Маннит	Желатин	Индол	Сероводород	

2. Приготовьте препараты из культуры анаэробов на среде Китта — Тарощи и молоке под маслом.

Приготовление мазков из культуры анаэробов со среды Китта — Тарощи и молока под маслом имеет свои особенности. Пробирку со средой наклоните под углом 30–35°. Возьмите стерильную пастеровскую пипетку, закройте указательным пальцем с тупого конца и отпустите под слой вазелинового масла в нижнюю часть среды, после чего

откройте пипетку, сняв с нее палец. Поднявшейся по капилляру жидкости будет достаточно для приготовления мазка. Не меняя наклона пробирки, выведите капилляр из среды. Мазок сделайте обычным способом. Окрасьте по Граму.

3. Приготовление мазков из кислого молока и квашеной капусты проведите обычным способом. Окрасьте по методу Грама. При микроскопии мазков обратите внимание на размер, форму бактерий и их окраску. Изучите, сделайте зарисовки в альбом.

4. Произведите посев почвенной суспензии на среду Китта — Тарощи и молоко под маслом.

Для этого наберите в пастеровскую пипетку 0,2–0,5 мл почвенной суспензии и внесите ее в пробирку со средой Китта — Тарощи (среда накопления), поместите в термостат на 18–24 ч при 37 °С. Учтите на следующем занятии изменения, произошедшие в среде, а именно: помутнение, газообразование. Оформите протокол.

Тема: КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ВИРУСОВ

Цель: Ознакомление с методами культивирования вирусов.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Охарактеризовать возможные типы взаимодействия вирусов с клетками.
2. Дать понятие о репродукции вирусов.
3. Этапы репродукции вирусов.
4. Привести примеры интегративного взаимодействия вирусов и клеток.
5. Дать понятие состояния вирогении.
6. Вирусы как облигатные паразиты, способы их культивирования.
7. Культивирование вирусов на лабораторных животных.
8. Куриные эмбрионы в культивировании вирусов.
9. Культивирование вирусов в клеточных культурах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дикий И.Л., Холупяк И.Ю., Шевелева Н.Е., Стегний М.Ю. Микробиология.— Х.: Прапор: Изд-во УкрФА, 1999.— С. 66–67.
2. Елинов Н.П., Заикина Н.А., Соколова И.П. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии.— М.: Медицина, 1988.— С. 53–56.

Вирусы, будучи своеобразной формой жизни, лишены собственного метаболизма и белоксинтезирующих систем, не размножаются на искусственных питательных средах. Их средой обитания являются клетки хозяина — от прокариотической бактериальной клетки до многоклеточного организма.

Поэтому для культивирования вирусов применяют лабораторных животных, куриные эмбрионы, клеточные культуры.

Большинство вирусов могут быть дифференцированы друг от друга на основании патогенности для различных видов животных (например, арбовирусы). Некоторые вирусы не представляется возможным культивировать ни в куриных эмбрионах, ни в культурах клеток, а только в организме восприимчивых животных.

Наиболее часто в вирусологических исследованиях используют белых мышей, крысят, морских свинок, собак, кошек. Иногда для опытов берут кур, уток, голубей, свиней, телят, овец, лошадей.

Отбирают здоровых животных одинакового возраста, веса, пола, упитанности. Затем животных маркируют с помощью красителей (пикриновой кислоты) или выстриганием шерсти, татуировки уха, пронумерованных бирок и др.

Заражение производится наиболее эффективным для данного вируса методом.

Например, для нейротропных вирусов (бешенства) лучшим является внутримозговое введение инфицированного материала, при работе с пневмотропными вирусами (грипп) производится заражение в нос или интратрахеально. Иногда подопытных животных заражают нанесением инфицированного материала на роговицу глаза или введением в семенники. Если при первичном заражении лабораторные животные не заболевают, необходимо провести 2–3 последовательных слепых пассажа. Для этого через 5–7 дней после заражения животных убивают, взятым от них материалом заражают следующую партию животных, от которых вновь отбирают материал для очередного заражения.

Лабораторные животные используются для идентификации вируса в рН, изучения биологических свойств вируса (инфекционности, иммуногенности), определения эффективности противовирусных препаратов.

В связи с тем что подопытные животные часто являются латентными вирусоносителями, в настоящее время все шире применяются в вирусологических исследованиях безмикробные животные — гнотобионты.

Гнотобионты являются уникальной моделью для выяснения значения нормальной микрофлоры в жизнедеятельности организма, изучения различных вопросов иммунитета, а также широко используются в биологической промышленности при изготовлении специфических гипериммунных сывороток.

Безмикробные животные более чувствительны к вирусным инфекциям, чем обычные. Особое положение среди гнотобионтов занимают СПФ-лабораторные животные (*Spezifisch pathogenfrei*), свободные от патогенных микроорганизмов. В их организме присутствует нормальная микрофлора.

В настоящее время получены СПФ-крысы, мыши, морские свинки, поросята и СПФ-птицы.

Применение данного метода культивирования вирусов ограничивается из-за невосприимчивости животных ко многим вирусам человека.

Широко используют для культивирования вирусов куриные эмбрионы с целью индикации вируса в РГА, определения инфекционного титра вируса, постановки реакции нейтрализации, для получения антигенов, вакцин и т. д.

В куриных эмбрионах могут размножаться вирусы с различным тропизмом, так как здесь имеются четыре субстрата для вируса: амнион, аллантоис, хорионаллантоисная мембрана и желточный мешок. Начиная с 4–5 дня, куриный эмбрион (КЭ) становится хорошо различимым при просмотре под овоскопом. При овоскопии яйца отмечают карандашом на скорлупе границы воздушного мешка, положение эмбриона, желточного мешка, намечают межсосудистый участок треугольной формы размером 5×5 мм. Эти отметки служат ориентиром при заражении.

Выбор метода заражения куриных эмбрионов зависит от биологических свойств исследуемого вируса.

Заражение на хорионаллантоисную оболочку производят при работе с дермотропными, нейротропными вирусами (оспы, осповакцины, герпеса и др.). Используют 10–12-дневные куриные эмбрионы с хорошо сформированной оболочкой, инкубированные в горизонтальном положении. Поверхность яйца над воздушным мешком и боковую поверхность с той стороны, где будет проводиться заражение, дезинфицируют спиртом, прожигают огнем, смазывают 2 % раствором йода, повторно прожигают. На скорлупе яйца напротив отмеченного бессосудистого участка выпиливают равнобедренный треугольник со сторонами 5–6 мм. Работу проводят осторожно, чтобы не повредить хорионаллантоисную оболочку. Треугольник вынимают пинцетом и помещают рядом с отверстием. Иглой надрывают подскорлупную оболочку. На обнаженную хорионаллантоисную оболочку пастеровской пипеткой наносят 0,1 мл вирусосодержащего материала. Одновременно в центре тупого конца яйца просверливают отверстие и через него резиновым баллончиком отсасывают воздух, в результате чего хорионаллантоисная оболочка отслаивается и на нее попадет вирусосодержащий материал. Треугольник берут пинцетом, слегка обжигают и помещают на свое место. Оба отверстия на скорлупе закрывают парафином или медицинским лейкопластырем. Яйцо осторожно покачивают для распределения материала по поверхности оболочки. Инкубируют в горизонтальном положении при 35 °С в течение 2–3 сут. Через 24 ч проводят контроль на патогенное действие, для чего зараженные яйца просматривают на овоскопе и с погибшими зародышами выбрасывают.

Как правило, при заражении дермотропными вирусами гибели КЭ не наблюдается. Показателем размножения вирусов является наличие поражений в виде непрозрачных беловатых бляшек различной формы, которые представляют собой очаги пролиферации оболочки с некротическим центром в поздней стадии.

Чтобы получить вирус, яйца выдерживают 12–18 ч при 4 °С. Вскрытие эмбрионов производят в стерильных боксах. Яйцо помещают в чашку Петри на ватную подставку, смазанную дезинфицирующим раствором. Поверхность скорлупы дезинфицируют. Скорлупу разрезают ножницами и удаляют по нижней границе воздушной полости, не нарушая целостности подскорлупной и хорионаллантоисной оболочек. Затем стерильным пинцетом осторожно снимают подскорлупную оболочку, разрезают хорионаллантоисную оболочку, удаляют эмбрион, желточный мешок и белок. Извлекают пинцетом хорионаллантоисную оболочку, отслаивают от внутренней поверхности скорлупы и переносят в стерильную чашку Петри с 2–3 мл физиологического раствора. До проведения дальнейших исследований хорионаллантоисную оболочку можно хранить при –30 ... –70 °С.

Заражение в аллантоисную полость производят при гриппе, парагриппе и др.

Основным методом культивирования вируса при этом является заражение 9–12-дневных куриных эмбрионов, когда аллантоисной жидкости содержится больше всего.

Поверхность скорлупы яйца над воздушным мешком, где будет производиться заражение, дезинфицируют 70 % раствором спирта, прожигают огнем, смазывают 2 % раствором йода, повторно прожигают. Яйцо помещают вертикально тупым концом вверх. Над центром воздушного мешка делают прокол скорлупы. В шприц набирают 0,2 мл вирусного материала. Вводят в отверстие иглу шприца. Прокалывают хорионаллантоисную оболочку и погружают иглу в аллантоисную полость. От поверхности скорлупы иглу вводят на глубину 1,5 см. Вводят 0,2 мл вирусного материала. Место инъекции протирают йодом, отверстие заклеивают лейкопластырем или заливают парафином.

После 72 ч инкубации в вертикальном положении при 35 °С яйца выдерживают при 4 °С в течение 12–18 ч для остановки крови в сосудах. Затем стерильными ножницами срезают скорлупу по границе воздушной полости. Подскорлупную и хорионаллантоисную оболочки разрезают и отгибают на края скорлупы. Яйцо слегка наклоняют и шприцем емкостью 10 мл отсасывают аллантоисную жидкость. Из одного яйца

отбирают 6–8 мл жидкости. Показателем размножения гемагглютинирующих вирусов является РГА, идентификацию осуществляют в РСК, а также заражением аллантоисной жидкостью восприимчивых животных и культур клеток.

Заражение в амниотическую полость производят, главным образом, для выделения вирусов из первичного патологического материала при ОРЗ и гриппе.

Заражение в желточный мешок используется для культивирования вирусов орнитоза, лимфогранулемы и трахомы. Используют 5–6-дневные эмбрионы, так как в это время желточный мешок имеет большой объем, что обеспечивает большую клеточную поверхность для размножения вируса. Скорлупу над воздушным мешком дезинфицируют, делают в ней отверстие; иглу (длина 5 см диаметр 0,5 мм) вводят вертикально до упора. Количество вирусного материала при заражении в желток составляет 0,3–0,5 мл, больше чем при других методах введения. Затем иглу быстро вынимают, место введения дезинфицируют и закрывают лейкопластырем или парафином.

После инкубации при 35 °С в течение 72 ч и охлаждения при 4 °С 12–18 ч скорлупу вскрывают по нижнему краю воздушного мешка, разрушают подскорлупную и хорионаллантоисную оболочки, желточный мешок отсекают от эмбриона, разрезают, чтобы вышел желток. Оболочки, освобожденные от желтка, промывают в стерильном физиологическом растворе. Проводят контроль на бактериологическую стерильность и наличие вируса. Хранят желточные оболочки при температуре –30 ... –70 °С.

К недостаткам данного метода культивирования вирусов относятся невозможность обнаружения исследуемого вируса без предварительного вскрытия эмбриона, а также наличие в нем большого количества белков и других соединений, затрудняющих последующую очистку вирусов при изготовлении иммунобиологических препаратов.

В настоящее время ни одна вирусологическая лаборатория не обходится без культур клеток, играющих важную роль в диагностических исследованиях. Клеточные культуры используются как для выделения вирусов из патологического материала, определения титра вируса, так и при изготовлении вирусных антигенов для вакцин и серологических реакций.

Культура тканей — это более широкое понятие, чем культура клеток.

Наиболее распространено культивирование клеток в монослое на стенках сосудов.

Культуры клеток готовят из тканей животных или человека в стерильных условиях. *Первичные клеточные культуры* можно получать

также из эмбриональных тканей человека, эмбрионов мышей, новорожденных крольчат и т. д.

Для диспергирования ткани чаще всего используют 0,3 % раствор трипсина. Трипсин разрушает межклеточное белковое вещество. Существует несколько вариантов трипсинизации различных тканей для приготовления первичной клеточной культуры. Разберем конкретный пример трипсинизации почек методом многократной экстракции для получения *первичной клеточной культуры почки теленка*.

К измельченной и 3 раза промытой раствором Хэнкса почечной ткани добавляют 50 мл 0,3 % теплого раствора трипсина и перемешивают на магнитной мешалке в течение 5 мин. Надосадочную жидкость сливают и выбрасывают. Ткань заливают новой порцией трипсина в количестве 50–100 мл, перемешивают с помощью магнитной мешалки 20 мин при комнатной температуре. Затем полученную суспензию клеток помещают в центрифужный стакан и центрифугируют 20 мин при 600 об/мин. Осадок промывают раствором Хэнкса двукратно с последующим центрифугированием 20 мин при 600 об/мин. Полученные клетки ресуспендируют в небольшом объеме среды 199 с 10 % сыворотки КРС и хранят на льду до смешивания с клетками последующих экстракций. Экстракцию проводят 3–4 раза до полного истощения ткани. Суспензию клеток, полученную при всех экстракциях, смешивают, фильтруют через марлевый фильтр в центрифужный стакан, центрифугируют 15 мин при 800 об/мин. Надосадочную жидкость выбрасывают. Клетки ресуспендируют в 50 мл ростовой среды, контролируют на стерильность путем посева 0,1 мл в 2 пробирки с МПБ и МПА, проводят подсчет клеток в камере Горяева. Для чего после тщательного взбалтывания клеток берут 2 пробы по 0,5 мл 0,1 % раствора кристаллвиолета в 0,1 N растворе лимонной кислоты. Перемешивают суспензию и подсчитывают число сохранных клеток. Количество клеток, содержащихся в 1 мл, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{a \cdot 4000 \cdot 2}{b},$$

где X — количество клеток в 1 мл;

a — среднее количество клеток в малом квадрате;

b — количество сосчитанных малых квадратов;

4000 — число малых квадратов в кубическом миллиметре;

2 — коэффициент разведения суспензии добавленным объемом краски.

После подсчета клеток суспензии добавляют такое количество питательной среды, чтобы в 1 мл содержалось необходимое количество клеток: 200–400 000 и более. Для культивирования в каждую пробирку засевают 0,5–1 мл суспензии. Пробирки плотно закрывают стерильными резиновыми пробками и помещают в штативы. Клетки прикрепляются к внутренней поверхности пробирки и через 3–7 сут образуют клеточный монослой, который уже сможет быть использован для культивирования вирусов. Для заражения 3–5 пробирок с культурой клеток необходимо 0,5 мл вирусосодержащего материала. Ростовую среду удаляют и вносят по 0,1 мл вирусосодержащей суспензии на клеточный монослой. Вирус оставляют на клетках в течение 1–2 ч для адсорбции при комнатной температуре, после чего неадсорбированный вирус удаляют, а монослой заливают питательной средой 199 и инкубируют при 37 °С. О репродукции вирусов в клеточной культуре судят по цитопатическому действию (ЦПД), которое обнаруживают при микроскопии зараженных вирусом клеточных культур. При этом часть клеток погибает и отслаивается от стенки пробирки. Вирионы, освобождающиеся при разрушении одних клеток, заражают другие, которые впоследствии также погибают, в результате чего от сплошного клеточного монослоя остаются отдельные участки клеток.

При репродукции одних вирусов (парамиксовирусы, герпесвирусы) ЦПД проявляется в виде синцития, образовавшегося в результате слияния клеток; у энтеровирусов и реовирусов — в виде сморщивания и деструкции клеток; у аденовирусов — в виде агрегации клеток в группы и грозди и т. д.

ЦПД вирусов оценивают в динамике, просматривая инфицированную культуру клеток под микроскопом в разные сроки после ее заражения вирусосодержащим материалом. По характеру ЦПД и срокам его проявления судят о наличии того или иного вида вируса в процессе его ориентировочной идентификации.

Количество вирусных частиц определяют методом титрования по ЦПД в клеточных культурах, для чего их заражают десятикратными разведениями вируса. Затем просматривают на наличие ЦПД. Титром вируса считают наибольшее разведение, вызывающее ЦПД у 50 % зараженных культур. Титр вируса выражают количеством тканевых цитопатических доз $TCD_{50}/мл$.

Другим количественным методом учета вирусных частиц является метод бляшек. В этом случае культуру клеток после инфицирования вирусосодержащим материалом покрывают тонким слоем агара. После инкубирования посевов в течение нескольких суток на агаровом

покрытии появляются прозрачные участки погибших клеток в сплошном монослое клеточной культуры. Каждый такой участок, или бляшка, образуется при размножении одной вирусной частицы и хорошо заметен на красном фоне клеток, прижизненно окрашенных нейтральным красным. В этом случае титр вируса выражают числом бляшкообразующих единиц (БОЕ) в 1 мл. Причем размеры, форма и сроки появления бляшек отличаются как у отдельных видов вирусов, так и у штаммов одного вида.

Некоторые виды вирусов можно обнаружить и идентифицировать по включениям, которые они образуют в ядре или цитоплазме инфицированных клеток. Вирусные включения представляют собой или реакцию клетки на присутствие вируса, или места скопления вирусных частиц, которые могут быть выявлены в препаратах, приготовленных из зараженной ткани и окрашенных по Романовскому—Гимза, Селлеру (см. цв. вкл. XXXII), или с помощью флуорохромов. В данном случае используют люминесцентную микроскопию.

ЗАДАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ЗАНЯТИЮ

1. Произвести заражение на хорионаллантоисную оболочку куриного эмбриона вирусом осповакцины.
2. Провести заражение в аллантоисную полость куриного эмбриона вирусосодержащим материалом.
3. Освоить технику вскрытия куриного эмбриона.
4. Определить репродукцию вируса в курином эмбрионе и клеточной культуре по ЦПД вируса.

Тема: ГЕНЕТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель: Изучить методы обнаружения мутаций и генетических рекомбинаций у бактерий, возможности применения генетических методов для создания лекарственных средств.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Виды изменчивости у микроорганизмов.
2. Примеры фенотипической изменчивости.
3. Примеры генотипической изменчивости.
4. Назвать виды мутаций.
5. В чем суть явления генетической рекомбинации?
6. Дать понятие трансформации.
7. Определить понятие трансдукции.
8. Понятие о конъюгации.
9. Использование методов генной инженерии для создания микроорганизмов — продуцентов лекарственных средств.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дикий И.Л., Холуяк И.Ю., Шевелева Н.Е., Стегний М.Ю. Микробиология.— Х.: Прапор: Изд-во УкрФА, 1999.— С. 68–76.
2. Елишов Н.П., Заикина И.А., Соколова И.П. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии.— М.: Медицина, 1988.— С. 59–62.

Микроорганизмы, главным образом, бактерии, являются оптимальной моделью для генетических исследований по целому ряду причин:

- ✓ во-первых, формирование на питательных средах в течение суток большого количества бактериальных популяций позволяет проводить быстрый количественный и качественный учет их изменений;
- ✓ во-вторых, гаплоидный набор генов прокариотов исключает у них явление доминантности, что обеспечивает быстрое выявление мутировавших генов;
- ✓ в-третьих, простота постановки экспериментов по селективному анализу микробной популяции и выделение особей, мутировавших с частотой 10^{-9} и выше, обеспечивает эффективность работы.

Постановка флюктуационного теста Лурия и Дельбрюка для выявления частоты спонтанных мутаций, возникающих в бактериальной популяции без предварительного воздействия какого-либо мутагена. Чтобы определить частоту стрептомицинустойчивых спонтанных мутантов в культуре кишечной палочки, чувствительной к стрептомицину, ее засевают одновременно в одну пробирку с 10 мл МПБ и в 10 пробирок с 1 мл той же среды по 10^2 – 10^3 клеток. После инкубации посевов при 37°C в течение 24 ч из каждой пробы делают посевы в чашки Петри с МПБ, содержащим 100 ЕД стрептомицина. Пробы из первой пробирки (с 10 мл МПБ) в количестве 0,1 мл засевают на 10 чашек и на отдельные чашки в том же объеме 0,1 мл из каждой пробирки с 1 мл МПБ на отдельную чашку. Общее число посевов таким образом составляет 20 чашек, которые впоследствии инкубируют в течение 18–20 ч (рис. 5).

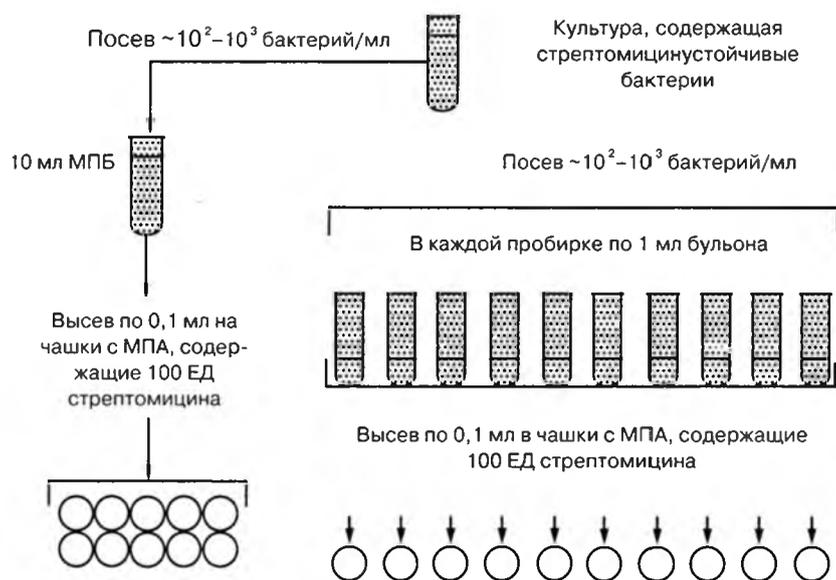


Рис. 5. Схема постановки опыта флюктуации (флюктуационного теста) по Лурия и Дельбрюку

В случае роста на агаровой среде со стрептомицином стрептомицинрезистентных бактерий, образовавшихся только в течение суточного контакта с антибиотиком, число колоний на всех чашках должно быть примерно одинаковым. Образование на чашках различного числа колоний, выросших при высевах из отдельных пробирок в исследуемой

популяции бактерий, свидетельствует о наличии в ней стрептомицин-резистентных мутантных клеток (Str^r). Значительные колебания (флюктуации) количества мутантных клеток обусловлены различным временем возникновения мутаций. Культура, в которой мутация произошла еще до посева на чашки, будет содержать большее число стрептомицин-резистентных клеток и наоборот. Такие флюктуации могут проявиться только при посеве из отдельной пробирки на свою чашку. При посеве из общей пробирки мутанты независимо от момента их возникновения будут равномерно распределены по всей популяции бульонной культуры.

Постановка опытов трансформации

В качестве реципиента используют культуру стрептомицинчувствительных сенных палочек *Bacillus subtilis*. Донором является ДНК, выделенная из стрептомицинрезистентного штамма сенной палочки. Селективной средой для отбора трансформантов служит агар, содержащий 100 ЕД стрептомицина.

Для осуществления трансформации к 1 мл бульонной культуры сенной палочки добавляют 1 мкг/мл ДНК донора и инкубируют при 37 °С в течение 30 мин. После этого на 5 мин в пробирку вносят 0,1 мг/мл раствора фермента ДНК-азы в 0,5 мл хлорида магния для разрушения ДНК, не проникшей в бактериальные клетки реципиента. Затем 0,1 мл неразведенной смеси высевают на селективную среду в чашки Петри. Чтобы определить количество клеток реципиентной культуры, готовят ее десятикратные разведения в изотоническом растворе хлорида натрия до 10^{-5} – 10^{-6} и высевают в объеме 0,1 мл на агар без стрептомицина. При этом контролем служит посев на агар со стрептомицином, на котором чувствительная культура не должна расти. После инкубации при 37 °С в течение 24 ч определяют частоту трансформации по отношению числа выросших рекомбинантных клеток к числу клеток реципиентного штамма.

Например, если при посеве 0,1 мл культуры штамма-реципиента, разведенного до 10^{-5} микробных клеток, выросло 170 колоний, а при посеве неразведенной взвеси — 68 колоний, частота трансформации в этом случае будет равна:

$$\frac{6,8 \times 10^2}{1,7 \times 10^5} = 4,0 \times 10^{-6},$$

где числитель — содержание рекомбинантных клеток в 1 мл смеси;

знаменатель — содержание клеток реципиента в 1 мл культуры сенной палочки.

Постановка опыта специфической трансдукции

В качестве реципиента берут лактозоотрицательный штамм (*E. coli* λ c⁻) без галактозидазного оперона, контролирующего ферментацию лактозы. Трансдуцирующий фаг обозначают как фаг, в геноме которого часть генов замещена β -галактозидазным опероном *E. coli*. Фаг является дефектным и не способен вызывать продуктивную инфекцию с лизисом кишечной палочки. На селективной среде Эндо лактозоотрицательные колонии реципиентного штамма образуют бесцветные колонии, в то время как лактозоположительные приобретают красный цвет с металлическим оттенком. Для осуществления специфической трансдукции к 1 мл трехчасовой бульонной культуры реципиента добавляют 1 мл трансдуцирующего фага в концентрации 10^6 – 10^7 частиц в 1 мл. После чего смесь инкубируют при 37 °С в течение часа. Затем в зависимости от предполагаемой концентрации бактерий для получения сосчитываемого количества колоний готовят десятикратные разведения. Из пробирки с разведением 10^{-6} высевают по 0,1 мл на три чашки Петри с селективной средой и равномерно распределяют посев шпателем по ее поверхности. После инкубации посевов в течение 24 ч вычисляют частоту трансдукции по отношению количества клеток трансдуктантов, обнаруженных на всех чашках, к числу клеток штамма-реципиента, исходя из того, что каждая колония образовалась в результате размножения только одной бактериальной клетки. Например, если после посева 1 мл смеси реципиента и трансдуцирующего фага в разведении 10^{-6} на трех чашках со средой Эндо выросло соответственно 170, 138 и 160 бесцветных колоний, а на первой и третьей — пять и одна колония трансдуктантов красного цвета, частота трансдукции будет составлять:

$$\frac{(5+1) \times 10^7}{(170+138+160) \times 10^7} = \frac{6}{468} = 1,3 \times 10^{-2}.$$

Постановка опыта конъюгации для передачи *R*-плазмиды, которая контролирует множественную устойчивость к стрептомицину (*Str*^r), тетрациклину (*Tc*^r) и хлорамфениколу (*Cm*^r). В качестве донора используют лейциноотрицательный антибиотикорезистентный штамм кишечной палочки *E. coli* K12 R⁺ leu⁻ *Str*^r *Tc*^r *Cm*^r, а реципиент — *E. coli* K12 R⁻ leu⁺ *Str*^r *Tc*^s *Cm*^s. Для постановки опыта в стерильную пробирку вносят по 1 мл 3-часовой бульонной культуры донора и реципиента. После инкубации смеси при 37 °С в течение двух часов ее высевают в объеме 0,1 мл на чашку с селективной минимальной глюкозосолевой средой и тремя антибиотиками в концентрации по 50 мкг/мл каждого. На данной среде вырастут только рекомбинантные колонии

(трансконъюгаты), которые приобрели резистентность к стрептомицину, тетрациклину и хлорамфениколу. Донорский штамм не вырастет на этой среде потому, что он нуждается в лейцине, а реципиентный штамм — чувствителен к антибиотикам. Частоту формирования трансконъюгатов можно определить по отношению числа рекомбинированных клеток к числу клеток штамма-реципиента (см. цв. вкл. XXXIII). Можно привести пример определения частоты формирования трансконъюгатов. Если при высеве 0,1 мл культуры штамма-реципиента в разведении 10^{-4} на глюкозосолевую среду с лейцином образовалось 20 колоний, а при высеве 0,1 мл неразведенной смеси — 60 колоний трансконъюгатов, частота их формирования определяется так:

$$\frac{60 \cdot 10}{20 \cdot 10 \cdot 10^4} = \frac{6 \cdot 10^2}{2 \cdot 10^6} = 3,0 \cdot 10^{-4}.$$

ЗАДАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ЗАНЯТИЮ

1. Определить частоту спонтанных мутаций в культуре кишечной палочки с помощью флюктуационного теста Лурия и Дельбрюка.
2. Определить частоту трансформации в культуре стрептомицинчувствительных сенных палочек.

Раздел 3. ЭКОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Тема: РАСПРОСТРАНЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В ПРИРОДЕ

Цель: Изучение методов санитарно-бактериологического исследования почвы, воды, воздуха.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Микрофлора почвы.
2. Микрофлора воды.
3. Микрофлора воздуха.
4. Санитарно-микробиологический анализ почвы.
5. Санитарно-микробиологический анализ воды.
6. Санитарно-микробиологический анализ воздуха.
7. Понятие о санитарно-показательных микроорганизмах окружающей среды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дикий И.Л., Холуляк И.Ю., Шевелева Н.Е., Стегний М.Ю. Микробиология. — Х.: Прапор: Изд-во УкрФА, 1999. — С. 143–147.
2. Елинов Н.П., Заикина Н.А., Соколова И.П. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. — М.: Медицина, 1988. — С. 74–84.

В природе микроорганизмы распространены везде, где они находят условия для роста и размножения. При отсутствии таких условий микроорганизмы могут лишь временно сохранять свою жизнеспособность. Наиболее благоприятные для жизнедеятельности микробов условия имеются в почве, богатой органическими веществами. Наибольшее количество микроорганизмов наблюдается на глубине 5–15 см от ее поверхности. В почве обитают грибы, водоросли, бактерии, фаги, простейшие. Микроорганизмы почвы играют большую роль в круговороте веществ в природе. Почва является основным резервуаром микроорганизмов в природе. Из нее микроорганизмы могут попадать в воду,

воздух, на листья растений, лекарственного растительного сырья и т. д. В прибрежных и поверхностных водах открытых водоемов также содержится большое количество микроорганизмов. Водоемы, располагающиеся возле крупных городов, а также животноводческих ферм, как правило, богаты микроорганизмами в результате их загрязнения канализационными и сточными водами.

Воздух не является благоприятной средой для обитания микробов. Поэтому большинство микроорганизмов могут находиться в нем лишь некоторое время.

Патогенные микроорганизмы, обитающие в организме больных или носителей, попадая в почву и воду с выделениями (моча, кал), в воздух при разговоре, кашле, чихании, могут сохраняться там в течение определенного времени. В этом случае окружающая среда становится фактором передачи патогенных микробов.

Санитарно-микробиологические исследования почвы проводят с целью определения ее санитарно-гигиенического состояния, а также для эпидемиологических исследований, выявления путей заражения и сроков выживаемости патогенных микроорганизмов, загрязнения грунтовой воды и открытых водоемов.

Санитарно-микробиологические исследования воды проводят с целью санитарного контроля и по эпидемиологическим показаниям на наличие патогенных кишечных бактерий (сальмонелл, шигелл), энтеровирусов и показателей свежего фекального загрязнения.

Санитарно-микробиологические исследования воздуха проводят с целью определения биологического показателя загрязнения его микрофлорой носоглотки человека, а также непосредственного обнаружения патогенных стафилококков, синегнойных палочек, других грамотрицательных условно-патогенных бактерий — возбудителей внутрибольничных инфекций. На предприятиях микробиологической промышленности изучается содержание в воздухе микроорганизмов-продуцентов. Например, на ферментных заводах — грибов рода *Aspergillus* и споровых бактерий.

Точное количественное определение бактерий в почве, воде, воздухе затруднено в связи с тем, что невозможно создать условия для размножения всех встречающихся в исследуемом материале микроорганизмов, которые отличаются между собой по типам дыхания, питания. Поэтому большое значение для санитарно-микробиологической оценки внешней среды имеют санитарно-показательные микроорганизмы, которыми являются представители нормальной микрофлоры организма человека и теплокровных животных. Эти микроорганизмы легко поддаются

обнаружению и определению количественными методами и служат показателем загрязнения окружающей среды выделениями человека.

Для почвы санитарно-показательными микроорганизмами являются кишечная палочка — *E. coli*, *Streptococcus faecalis*, *Clostridium perfringens*. Для воды санитарно-показательными микроорганизмами выбраны — *E. coli*, *Streptococcus faecalis*; для воздуха — *Streptococcus haemolyticus*, *Streptococcus viridans*, *Staphylococcus aureus*.

Методы санитарно-микробиологического анализа почвы включают количественный учет сапрофитных бактерий, по которому судят о микробном числе почвы; определение количества бактерий группы кишечных палочек методами титрации, мембранных фильтров, методом прямого поверхностного посева; определение *Cl. perfringens*, сальмонелл, шигелл, клостридий столбняка и ботулизма.

При учете численности микроорганизмов почвы применяют диспергирование в воде находящихся в почве бактерий. В асептических условиях пробы почвы измельчают, растирают в ступке и готовят для чистых почв до 3–4 десятикратных разведений в стерильной водопроводной воде. При определении *микробного числа почвы* (это количество микроорганизмов, содержащихся в 1 г почвы) должно быть использовано для посева не менее двух различных разведений в зависимости от предполагаемого загрязнения исследуемой почвы.

Перед посевом каждое разведение в пробирках перемешивают стерильной пипеткой, затем из него отбирают 1 мл и переносят на дно стерильной чашки Петри. Каждое разведение вносят не менее чем на 2 чашки, в которые затем вливают 7–10 мл растопленного и остуженного до 45 °С МПА или сусло-агара. Расплавленный агар перемешивают с имеющейся взвесью почвы с помощью покачивания чашки. Отмечают разведение пробы и инкубируют при температуре 28–30 °С в течение 24 ч. Для удобства подсчета следует брать те разведения, при которых на чашках вырастает от 50 до 150 колоний. В качестве примера можно привести следующую схему заполнения протокола (табл. 3).

Таблица 3

Определение микробного числа почвы

Наименование участка	Количество подсчитанных бактерий в разведениях 1:10 000	Число бактерий в 1 г почвы (микробное число)
Двор аптечного учреждения	70	среднее 80 800 000
	90	

Микробное число почвы показывает общую численность в основном сапрофитных микроорганизмов, вырастающих на МПА или суло-агаре. Для определения *коли-титра почвы* (наименьшее количество исследуемого материала в граммах, в котором обнаруживается жизнеспособная *E. coli*) используют элективные питательные среды, содержащие желчь и другие компоненты, тормозящие рост большинства микробов, населяющих почву, кроме кишечной палочки.

Метод титрации предполагает засев первоначального разведения почвенной суспензии 1:10 во флаконы с 50 мл жидких сред, что соответствует 1 г почвы.

Чаще всего используют посев почвы в лактозный бульон с 1,5 мл и 2 % водного раствора ТТХ (2–3,5-трифенилтетразолия хлорида). Кишечная палочка способна восстанавливать ТТХ бесцветное соединение в трифенолформазан, выпадающий в виде осадка, придающего среде красно-коричневый цвет. Кишечная палочка устойчива к действию формазана, который тормозит рост большинства микробов. Посевы инкубируют в течение 24 ч при 37 °С. При наличии в среде ТТХ газообразования и изменения цвета среды на кирпично-красный производят посев на среду Эндо или розоловый агар. При наличии на среде Эндо розовых или красных колоний грамотрицательных палочек с отрицательной оксидазной активностью осуществляют их подсчет. Для подтверждения их ферментативной способности делают посев выросших колоний на полужидкую среду с глюкозой, затем на 24 ч помещают в термостат при температуре 37 °С. В случае появления в среде кислоты и газа исследование на наличие кишечных палочек считается положительным. Результат анализа выражают коли-титром.

Можно использовать другой метод посева соответствующих разведений почвенной суспензии: на среду Кеслера — Свенертона с последующей экспозицией в течение 24–48 ч при температуре 37 °С. После чего в случае газообразования и помутнения на среде Кеслера—Свенертона также производят высев на среду Эндо или розоловый агар. Дальнейший ход исследований полностью совпадает с вышеописанным.

Метод мембранных фильтров

Этот метод позволяет сократить время анализа на двое суток благодаря исключению этапа накопления микроорганизмов на жидких средах. При анализе почвы в небольших разведениях (1:10; 1:100), чтобы избежать накопления на фильтрах почвенных частиц, мешающих выявлению кишечной палочки при выращивании на фильтре, на мембранный фильтр накладывают предварительный планктонный

фильтр. Подсчет колоний осуществляют на тех фильтрах, где из соответствующего разведения выросло не более 30–50 колоний. Затем осуществляют пересчет выращенных на фильтрах колоний на 1 г почвы.

Метод прямого поверхностного посева применяют при анализе загрязненных почв. Для этого среду Эндо разливают в чашки Петри, подсушивают в сушильном шкафу. Готовят почвенную суспензию, как указано выше, используя разведение до 1:1 000 000. Посевы выращивают при температуре 37 °С в течение 24 ч. Затем производят подсчет розовых и красных колоний с металлическим блеском. Для более точного определения соответствующие бактерии должны быть изучены по схеме, которая применяется при исследовании воды. При необходимости перевода коли-индекса в титр кишечной палочки необходимо 1000 разделить на число, выражающее коли-индекс.

Определение *Clostridium perfringens*

Готовят почвенные разведения до 1:100 000, которые переносят по 1 мл в два ряда пробирок. Один ряд прогревают в течение 15 мин при 80 °С или 10 мин при 90 °С. Затем во все пробирки вносят по 10 мл расплавленной и охлажденной до 45 °С среды Вильсона—Блер, вращением пробирки между ладонями равномерно распределяют почвенную суспензию и быстро опускают в холодную воду для быстрого охлаждения и удаления воздуха из среды. Учет колоний можно начинать через 2 ч экспозиции при 43 °С. В глубине агара вырастают черные колонии, разрывающие среду вследствие газообразования. В приготовленных из этих колоний мазках *Cl. perfringens* определяются в виде характерных грамположительных палочек.

Другой метод определения *Cl. perfringens* в почве производится с использованием сульфит-полимиксиннеомициновой среды (СПН). Инкубация посевов проводится при 44–45 °С в течение 10–12 ч. Дальнейшая идентификация выросших колоний не требуется.

Определение сальмонелл и шиггелл

1. Метод коагуляции и центрифугирования по Фикеру. Для исследования берут 30–50 г почвы. Посевы почвы производят из основного разведения 1:10 в стерильной водопроводной воде. С целью концентрации сальмонелл к 500 мл взвеси почвенной суспензии добавляют 2 мл 10 % стерильного раствора бикарбоната натрия, а затем 1,7 мл 10 % стерильного раствора сульфата окиси железа (Fe_2SO_4). После размешивания суспензию оставляют на 1 ч при 4 °С. Образовавшиеся после коагуляции хлопья вместе с частицами почвы и бактериями оседают на

дно. Осадок центрифугируют 5 мин и растворяют в 25 % стерильном растворе виннокислого калия, прибавляя его по каплям до растворения осадка. После чего осадок высевают по 0,5–1 мл на плотные элективные среды Вильсона—Блер и Плоскирева с помощью стерильного шпателя. Этим же шпателем заражают еще 3–4 чашки. Оставшийся осадок заливают 50 мл 10–20 % желчного бульона, при 37 °С инкубируют 5–6 ч и производят ранний высев петлей на плотные элективные среды, а через 8–20 ч — дополнительный высев. Дальнейшая идентификация сальмонелл и шигелл производится по общепринятой методике.

2. Применение магниевой среды «М» для обнаружения сальмонелл в почве.

В подготовленную суспензию почвы вносят растворы и навески магниевой среды в отношении 1:1. Посевы инкубируют при 37 °С. Через 18–20 ч производят высев петлей на 3–5 чашек висмутсульфитного агара. Дополнительная идентификация проводится по общепринятой методике.

Концентрацию микробов при исследовании в ней шигелл и сальмонелл можно проводить с помощью мембранных фильтров. После того как пропустили определенное количество почвенной суспензии, каждый мембранный фильтр накладывают на чашку с дифференциальной средой и размазывают шпателем осадок с фильтра по всей чашке. Посевы выращивают при 37 °С.

Исследование почвы на наличие Clostridium tetani

Пробы почвы 20–30 г собирают в стерильную посуду, затем растирают в стерильной ступке 3–5 г, разводят 10–15 мл стерильного изотонического раствора натрия хлорида. После отстаивания в течение 3–4 ч при комнатной температуре полученную взвесь вносят в количестве 1 мл белым мышам подкожно в правую заднюю конечность. Каждую пробу испытывают на двух мышах. В качестве контроля берут мышей, которым до введения почвенной взвеси была введена противостолбнячная сыворотка. Гибель первой группы мышей с характерными симптомами и выживание контрольных животных указывает на наличие *Cl. tetani* в почве.

Определение Clostridium botulinum в почве производят, растирая в стерильной фарфоровой ступке 20–30 г почвы, затем переносят в колбу с 80–100 мл среды Китта—Тароцци. Одну из колб при этом прогревают до 80 °С в течение 30 мин для уничтожения неспорообразующих микроорганизмов. Прогретую и непрогретую колбы ставят в термостат при

температуре 37 °С на 8–14 дней, после чего из среды обогащения проводят посев в агар столбиком или на чашки с сахарным агаром с дальнейшим изучением биологических и антигенных свойств полученных культур по методам, описанным для клостридий.

МЕТОДЫ САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ВОДЫ

Определение микробного числа воды предполагает исследование общего количества мезофильных аэробов и факультативных анаэробов в 1 мл исследуемой воды, способных при 37 °С в течение 24 ч образовывать на МПА колонии, видимые невооруженным глазом и при увеличении в 2–5 раз. В зависимости от степени загрязнения воды готовят последовательно ее 10-кратные разведения от 1:10 для чистых до 1:10 000 для сильнозагрязненных сточных вод. При исследовании водопроводной воды в каждую из двух чашек вносят по 1 мл неразведенной воды и заливают 10–12 мл растопленного и остуженного до 45 °С МПА, а для выявления роста грибов — сусло-агара. Посевы на МПА выращивают в течение суток при 37 °С, а на сусло-агаре — 2–3 сут при 27 °С. Учет колоний производится с использованием лупы на чашках, где выросло не более 300 колоний. Микробное число питьевой воды централизованно-водоснабжения не должно превышать 100 микробных клеток в 1 мл.

Определение кишечных палочек обычно проводят с использованием метода титрации — двухэтапный бродильный метод и метода мембранных фильтров. Анализ воды проводят согласно ГОСТу 18963-73 в трех параллельных рядах, начиная с 10; 1 и 0,1 мл. Для объемов 10 мл используют флаконы по 100 мл лактозо-пептонной среды. Все остальные объемы воды вносят в пробирки с 5 мл питательной среды. На выходе в водопроводную сеть в водопроводной воде исследуют три объема по 100 мл воды, три объема по 10 мл воды и три объема по 1 мл. Для этого осуществляют посевы по 100 мл воды на концентрированную глюкозопептонную среду и по 10 мл и по 1 мл воды на разведенную среду. Культивирование посевов производят при 38 °С в течение 24 ч. В случае отсутствия помутнения среды и образования газа через сутки дается отрицательный ответ. При наличии помутнения среды кислоты и газа из такого флакона производят посев секторами на чашки со средой Эндо, чтобы получить изолированные колонии. Если через 16–18 ч на среде выросли темно-красные с металлическим блеском или без него колонии, из них готовят мазки и проводят пробу на оксидазу. Для этого со среды Эндо снимают по 2–3 колонии каждого типа и наносят на фильтровальную бумагу, смоченную диметил-п-фенилендиамином.

Наличие в мазках грамотрицательных палочек и отсутствие оксидазы свидетельствует о положительном результате исследований, которые выражают в виде коли-индекса, т. е. количества бактерий кишечных палочек в 1 л воды. Для питьевой воды централизованного водоснабжения коли-индекс не должен быть больше трех.

При определении *свежего фекального загрязнения* из трех объемов лактозо-пептонной среды, в которых после инкубации при 37 °С в течение 24 ч наблюдалось выделение газа, петлей материал высевают в лактозную среду с борной кислотой. Культивирование на элективной среде производят при 43 °С в течение суток. Наличие газа и помутнений среды указывает на свежее фекальное загрязнение воды. Если среда только помутнела без газообразования, результат не учитывается. Определение индекса фекальных кишечных палочек и бактерий группы кишечных палочек проводят по табл. 4.

Метод мембранных фильтров предполагает фильтрование воды в количествах 100, 10 и 1 мл для чистой воды и 0,1; 0,01 мл для загрязненных вод. Начинают исследования с больших разведений.

При посевах объемом 1 мл и меньше их разводят в 10 мл стерильной водопроводной воды, а затем фильтруют. После окончания фильтрации изучаемого объема мембранные фильтры снимают стерильным пинцетом и помещают на поверхность среды Эндо фильтрующей поверхностью вверх. На одну чашку помещают до 3–4 мембранных фильтров. Инкубируют чашки с фильтрами при 37 °С в течение 18–24 ч. Для учета колоний выбирают фильтры с количеством колоний от 10–50. Для расчета коли-индекса количество бактерий группы кишечных палочек, выросших в анализируемом объеме воды, умножают на 1000 и делят на этот объем. Следует отметить, что методом мембранных фильтров обычно определяется меньшее число бактерий, чем методом титрации.

Определение энтерококков

Дополнительным показателем фекального загрязнения являются энтерококки (*Streptococcus faecalis* и др.). Индекс энтерококков в исследуемой воде определяют в параллельных рядах посевов в жидкой щелочно-полимиксиновой среде с 10-кратными разведениями в зависимости от предполагаемого бактериального загрязнения воды от 100 до 0,01 мл. Объемы воды по 100 и 10 мл вносят в щелочно-полимиксиновую среду двойной концентрации, остальные объемы — в пробирки со средой обычной концентрации, учет производят после 24 ч

Таблица 4

Определение индекса бактерий группы кишечных палочек

Количество положительных результатов анализов воды			Индекс
из трех флаконов по 100 мл	из трех флаконов по 10 мл	из трех флаконов по 1 мл	
0	0	0	менее 3
0	0	1	3
0	1	0	3
1	0	0	4
1	0	1	7
1	1	0	7
1	1	1	11
1	2	0	11
2	0	0	9
2	0	1	14
2	1	0	15
2	1	1	20
2	2	0	21
2	2	1	28
3	0	0	23
3	0	1	39
3	0	2	64
3	1	0	43
3	1	1	75
3	1	2	120
3	2	0	93
3	2	1	150
3	2	2	210
3	3	0	240
3	3	1	460
3	3	2	1100
3	3	3	более 1100

инкубации при 37 °С по изменению цвета и помутнению среды. Из этих флаконов проводят высев секторами на чашки с молочно-ингибиторной средой. Также осуществляют дополнительный учет. Фекальный стрептококк растет на секторах чашек в виде черных с металлическим блеском колоний.

Определение патогенных бактерий

Определение сальмонелл.

Посев исследуемой воды проводят в среды накопления (магниева, селенитовая среда). Дальнейший ход исследований проводится по общепринятой для сальмонелл методике.

Определение шигелл

Шигеллы можно определить в водопроводной воде в случае аварийных ситуаций. В качестве среды накопления при этом используют среду с охмеленным сусликом (400 мл исследуемой воды вносят в флакон со 100 мл охмеленного суслика). После выращивания в течение суток при 37 °С производят высев на среду Плоскирева или Левина. Дальнейший ход исследований соответствует методам, описанным в разд. «Лабораторная диагностика бактериальной дизентерии».

Определение энтеровирусов

Вирусологические исследования воды производят при оценке качества водопроводной воды и определении эффективности очистки сточных вод.

Метод фильтрации

Пробу воды в количестве 1 л фильтруют через мембранный фильтр № 3, предварительно доведя рН среды до 3,0 добавлением 1 N HCl.

В качестве элюирующего раствора для снятия энтеровирусов с поверхности фильтра используют мясную воду или МПБ с рН 7,8 (добавлением 1N NaOH). В элюирующую жидкость добавляют антибиотики. После встряхивания в шюттель-аппарате в течение 30 мин элюат собирают в пенициллиновые флаконы, обрабатывают эфиром и хранят при -20 °С. Дальнейшее исследование проводят на культуре клеток.

Санитарно-бактериологический анализ воздуха закрытых помещений проводят методом оседания на чашки (седиментация) и аспирационным способом с помощью прибора Кротова.

Метод седиментации. В помещениях, где производят микробиологический анализ воздуха, устанавливают открытые чашки с МПА

на 10 мин. Затем чашки закрывают и инкубируют в термостате при 37 °С 24 ч и при комнатной температуре 24 ч. После чего подсчитывают количество выросших колоний, измеряют диаметр чашки с целью определения ее площади. Чтобы найти количество микроорганизмов в 1 м³ воздуха, число выросших колоний умножают на множитель (табл. 5)

Таблица 5

Расчет числа бактерий в 1 м³ воздуха при 10 мин экспозиции

Диаметр чашки, см	Площадь чашки, см ²	Множитель
8	50	100
9	63	80
10	78	60

Метод аспирации по Кротову

Поскольку при использовании метода седиментации могут быть определенные погрешности, связанные с тем, что оседание микроорганизмов зависит от потоков воздуха, для более точной оценки количества микрофлоры в 1 м³ воздуха используют аспирационный метод с помощью прибора Кротова.

С помощью центробежного вентилятора воздух всасывается через щель в крышке прибора. Щель располагается по радиусу чашки Петри, закрепленной на диске, вращающемся со скоростью около 1 оборота в секунду. В результате этого происходит равномерный посев микроорганизмов, находящихся в воздухе, на поверхность питательной среды чашки Петри. Время просасывания воздуха обычно 2 мин, скорость — 20–25 м в мин.

Определение числа микроорганизмов в 1 м³ воздуха производят по формуле:

$$X = \frac{a \cdot 1000}{v},$$

где X — число м/о в 1 м³ воздуха;

a — количество колоний, выросших в течение 48 ч на чашке Петри;

v — количество воздуха, пропущенного через щель прибора, в л, приведенного к нормальным условиям.

Для оценки микробной чистоты воздуха, полученные данные сравниваются с данными табл. 6.

Таблица 6

Характеристика бактериального загрязнения воздушной среды (А.И. Шафир)

Характеристика воздуха	Число м/о в 1 м ³ воздуха			
	Летний режим		Зимний режим	
	Всего м/о	Зеленящего и гемолитического стрептококка	Всего м/о	Зеленящего и гемолитического стрептококка
Чистый	<1500	<16	<4500	<36
Загрязненный	>2500	>36	>7000	>124

ЗАДАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ЗАНЯТИЮ

1. Определить микробное число почвы.
2. Определить коли-индекс и коли-титр воды методом титрации.
3. Провести санитарно-бактериологический анализ воздуха методом седиментации.

Тема: МИКРОФЛОРА ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА

Цель: Изучение методов исследования нормальной микрофлоры организма.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Общая характеристика микробиоценозов человека.
2. Нормальная микрофлора кожи.
3. Нормальная микрофлора полости рта.
4. Микрофлора верхних дыхательных путей.
5. Нормальная микрофлора пищеварительного тракта.
6. Нормальная микрофлора мочевыводящих путей.
7. Нормальная микрофлора половых органов.
8. Микрофлора конъюнктивы глаза.
9. Роль аутофлоры в жизнедеятельности организма человека.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дикий И.Л., Холуяк И.Ю., Шевелева Н.Е., Стегний М.Ю. Микробиология.— Х.: Прапор: Изда-во УкрФА, 1999.— С. 150–159.
2. Елинов Н.П., Заикина Н.А., Соколова И.П. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии.— М.: Медицина, 1988.— С. 72–74.

Сложившиеся в процессе эволюции микробные биоценозы тела человека поддерживают его нормальное функционирование. Важную роль играет нормальная микрофлора тела человека в формировании естественного иммунитета макроорганизма, так как его постоянная микрофлора обладает выраженными антагонистическими свойствами относительно многих возбудителей инфекционных заболеваний. Причиной высокой антагонистической активности нормальной микрофлоры человека является выделение этими микроорганизмами бактериоцинов, антибиотиков, молочной кислоты, спиртов, жирных кислот, перекиси водорода и других веществ, подавляющих рост и размножение патогенных видов. Нарушение экологических взаимоотношений между биоценозами и организмом человека, а также изменения в самих биоценозах приводят к развитию дисбактериоза.

Дисбактериоз — это качественное и количественное нарушение экологического баланса между микробными популяциями в составе микрофлоры организма человека. Причиной дисбактериозов может быть резкое снижение иммунитета при хронических инфекциях, воздействии радиации, нерациональное использование антибиотиков широкого спектра действия (тетрациклины, левомицетин и т. д.).

При дисбактериозах возрастает количество гнилостных микробов из родов *Pseudomonas*, *Proteus*; дрожжеподобных грибов *Candida albicans*; количество *E. coli*, *Klebsiella*, *Str. faecalis*.

Для изучения качественного состава нормальной микрофлоры организма человека используют микроскопию мазков, приготовленных из зубного налета, смывов со слизистой оболочки зева, носа, половых органов и т. д., а также бактериологические методы исследования.

Бактериоскопические методы

Обнаружение микроорганизмов зубного налета осуществляют с помощью стерильных палочек, при этом берут его с зубов, делают мазки, окрашивают по Граму, микроскопируют в иммерсионной системе.

Для обнаружения подвижных микроорганизмов готовят препараты «раздавленная капля», микроскопируют их в темнопольном или фазово-контрастном микроскопе.

При бактериологическом исследовании делают смывы с лица, рук, слизистых носа тампоном, смоченным в физиологическом растворе. Затем взятый таким образом материал высевают на чашки Петри с МПА, кровяным или сахарным агаром. Инкубируют при 37 °С в течение 24 ч. С помощью отдельного тампона, помещенного в пробирку с глюкозо-пептонной средой, для обнаружения бактерий группы кишечных палочек берут смывы с рук с последующим высевом на среду Эндо или розоловый агар, дальнейшее выделение кишечной палочки аналогично стандартной методике обнаружения бактерий группы кишечных палочек.

Кроме того, можно использовать метод посева отпечатков пальцев на чашках с МПА, прикасаясь к поверхности питательной среды. О качественном составе микрофлоры рук судят через 24 ч экспозиции при 37 °С. Делают мазки из отдельных колоний, окрашивают по Граму. В мазках можно обнаружить стафилококки, дрожжи, грамположительные и грамотрицательные палочки.

Количественное бактериологическое исследование смывов с рук также проводят с целью проверки соблюдения правил личной гигиены работниками аптечных учреждений. Смывы с рук получают путем

тщательного протирания ладоней, межпальцевых и подногтевых пространств влажным тампоном. Тампон помещают в пробирку, добавляют 8 мл стерильной воды, в которой тампон тщательно прополаскивают. Из исходных смывов в зависимости от предполагаемой степени бактериальной загрязненности готовят ряд 10-кратных разведений. Смывы исследуют на общие бактериальные загрязнения (микробное число) по методике, описанной при определении микробного числа воды, на наличие бактерий группы кишечных палочек, золотистого стафилококка. Для определения бактерий группы кишечных палочек в пробирку с тампоном после взятия смыва наливают 5 мл среды Кесслера (1 л воды, 10 г пептона, 50 мл бычьей желчи, 10 г лактозы, 4 мл 1 % раствора генциана фиолетового — состав среды Кесслера). Затем пробирки термостатируют в течение 24 ч при 43 °С. При наличии роста производят высеивание на дифференциально-диагностическую среду Эндо. Рост на среде типичных красных колоний указывает на наличие в смывах кишечной палочки. Заканчивается исследование постановкой оксидазной пробы.

Для обнаружения золотистого стафилококка смыв в количестве 3–4 капель засевают на чашки Петри с желточно-солевым агаром. После инкубирования в течение 24 ч при температуре 37 °С изучают свойства выделенных культур стафилококка.

Результаты бактериологического исследования смывов с рук можно оформить в виде таблицы.

Таблица 7

Результаты бактериологического исследования смывов

Исследуемый материал	Разведение и объем посевов	Количество колоний	Результаты
Смывы с рук			

ЗАДАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ЗАНЯТИЮ

1. Бактериоскопическое исследование микроорганизмов зубного налета.
2. Количественное бактериологическое исследование смывов с рук.

Тема: ДЕЙСТВИЕ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ НА МИКРООРГАНИЗМЫ

Цель: Знать влияние факторов внешней среды (физических, химических, биологических) на микроорганизмы; владеть вопросами асептики, антисептики, дезинфекции, стерилизации; характеризовать методы стерилизации, уметь определять эффективность дезинфицирующих средств, проводить выделение микробов-антагонистов, бактериофагов и определять их активность.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Оптимальные, минимальные и максимальные температуры для жизнедеятельности грибов, дрожжей, бактерий.
2. Термофильные, мезофильные и психрофильные бактерии.
3. Влияние физических факторов на различные микроорганизмы и их споры.
4. Влияние химических веществ на микроорганизмы.
5. Влияние биологических факторов на микроорганизмы.
6. Определение понятий: асептика, антисептика, дезинфекция.
7. Характеристика дезинфицирующих и антисептических средств.
8. Стерилизация. Методы стерилизации.
9. Характеристика термических методов стерилизации.
10. Химические методы стерилизации.
11. Стерилизация фильтрованием.
12. Радиационный метод стерилизации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дикий И.Л., Холуняк И.Ю., Шевелева Н.Е., Стегний М.Ю. Микробиология.— Х.: Прапор: Изд-во УкрФА. 1999.— С. 136–142.
2. Елинов Н.П., Заикина Н.А., Соколова И.П. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии.— М.: Медицина. 1988.— С. 62–72.

Жизнь микроорганизмов находится в тесной зависимости от условий внешней среды. Физические, химические и биологические факторы внешней среды могут оказывать различное влияние на микроорганиз-

мы в зависимости от дозы, времени их воздействия, физиологического состояния и концентрации микробных клеток, среды их обитания. Изучение законов взаимоотношений между миром микробов и окружающей средой имеет большое практическое значение.

Действие физических факторов. Среди физических факторов особое значение в жизни микроорганизмов имеет температура. Жизнедеятельность микроорганизмов проявляется только при определенных температурных условиях. Различают три кардинальные температурные точки: минимум, оптимум и максимум. Между нижним и верхним пределами возможна жизнедеятельность микробов, а оптимум соответствует физиологической норме для данного вида.

Высокие температуры оказывают губительное действие на микроорганизмы, так как они вызывают коагуляцию белка цитоплазмы микробной клетки. Большинство вегетативных форм бактерий погибает уже при 10-минутном воздействии температуры 70 °С и моментально при температуре 100 °С. Большой устойчивостью к высоким температурам обладают бактериальные споры. Они могут сохранять способность к прорастанию даже после многочасового кипячения и только при температуре пара 120 °С и сухого жара 165–170 °С они погибают.

На действии высоких температур основан целый ряд методов стерилизации.

Высокие дозы излучения убивают большинство патогенных организмов. К ним относятся прямые солнечные лучи, ультрафиолетовые, лучи Рентгена, радия и др. Ультрафиолетовые лучи в диапазоне длины волны от 200 до 280 мкм обладают бактерицидным действием и используются в основном для дезинфекции воздуха.

Ультразвуковые волны с частотой колебаний 20 000 Гц в сек и больше являются бактерицидными. Ультразвук используют для приготовления вакцин.

Аэроионы, заряженные отрицательно, убивают бактерии в концентрациях 5×10^4 в 1 см³ воздуха, аэроионы, несущие положительный заряд, задерживают их рост только в больших концентрациях.

Действие химических факторов. Бактерицидное действие химических веществ имеет большое практическое значение, поскольку их используют для дезинфекции, антисептики и в качестве консервантов.

Дезинфекция — уничтожение в (на) каком-либо объекте или в окружающей среде патогенных микроорганизмов, вызывающих инфекционные болезни. Цель дезинфекции — прервать пути передачи и распространения инфекционного заболевания.

В качестве дезинфицирующих средств применяют галоиды, окислители, фенолы и их производные, тяжелые металлы, кислоты, щелочи, спирты, ПАВ, газообразные вещества.

Выбор дезинфицирующего вещества и длительность его воздействия диктуются как особенностями микроорганизма, так и средой, в которой будет происходить контакт дезинфицирующего вещества с патогенным микроорганизмом.

Наряду с дезинфицирующими в медицинской практике широко применяются антисептические средства (антисептики). Антисептика предполагает использование химических веществ (антисептиков), убивающих или подавляющих размножение болезнетворных и др. микроорганизмов, находящихся на коже и слизистых оболочках макроорганизма. Антисептика совместно с асептикой широко используется в хирургии.

Антисептика — комплекс мероприятий, направленных на предупреждение попадания микроорганизмов на (в) какой-либо объект: операционное поле, бактериологический бокс, определенные производственные помещения, стерильный раствор или препарат. Работа микробиологов, хирургов и многих работников, связанная с изготовлением и использованием лекарственных средств, проводится с применением методов асептики. Создание асептических условий предусматривает дезинфекцию помещений, стерилизацию инструментов и материалов.

Для испытания эффективности действия дезинфицирующих средств применяют метод «тест-объектов».

Приготовление бактериальных тестов производят следующим образом: выстиранная белая хлопчатобумажная ткань обрабатывается спиртом в течение 30 мин. Ткань, обеззараженную таким образом, прополаскивают, сушат, проглаживают, разрезают на правильные прямоугольники длиной в 1 см, шириной 0,5 см, укладывают по 20–30 шт. в чашки Петри и стерилизуют.

Тесты заражают 2-миллиардной микробной взвесью, для чего используют смывы односуточной агаровой культуры стафилококка кишечной палочки и антракоида (с большим содержанием спор). Стерильные кусочки ткани погружают в микробную взвесь на 20–25 мин, после этого извлекают стерильным пинцетом, просушивают между листами стерильной фильтровальной бумаги, а затем 15–20 мин в термостате.

Тесты помещают в пробирки, содержащие по 5 мг дезинфектантов, и выдерживают от 5 мин до часа. После этого их дважды промывают в стерильной воде, погружают в пробирку с питательным бульоном и ставят в термостат (для стафилококка и кишечной палочки на 6–8 дней,

для антракоида на 21 день). Помутневший бульон высевают на питательный агар. Для каждой экспозиции используют не менее 3 тестов. Контрольные тесты не обрабатываются дезинфицирующими веществами.

Консерванты — это вещества, обладающие антимикробным действием, которые добавляют в лекарственные средства для предотвращения роста и развития микроорганизмов, попадающих в них во время технологического процесса или при неоднократном употреблении препарата.

Консерванты вводят как в стерильные препараты (парентеральные, офтальмологические и некоторые др.), так и в нестерильные лекарственные средства.

Для максимальной защиты пациента эффективная концентрация консерванта в готовом препарате должна быть значительно ниже токсичной для человека дозы.

Испытание состоит из искусственного заражения лекарственного средства суспензиями определенных тест-микроорганизмов, инкубации контаминированных образцов при определенной температуре, отбора проб через указанные интервалы времени и подсчета жизнеспособных клеток микроорганизмов в 1 г или в 1 мл препарата на протяжении периода испытания.

Предлагаемый метод определения эффективности консервантов применяется для готовых лекарственных средств в неповрежденной упаковке.

Все лекарственные средства, в которые вводятся консерванты, разделены на две категории (табл. 8).

Категория 1 — водорастворимые лекарственные средства, различающиеся по методу применения.

Категория 2 — нерастворимые в воде лекарственные средства.

Тест-микроорганизмы. Антимикробное действие консервантов определяют в отношении некоторых видов бактерий и грибов, которые являются наиболее частыми контаминантами лекарственных средств: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ГИСК 453 (взамен ATCC 9027), *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Candida albicans* NCTC 885-653, *Aspergillus niger* ВКМ F-1119.

Примечания:

1. Помимо вышеперечисленных тест-штаммов, можно использовать и другие культуры микроорганизмов из отечественных и зарубежных коллекций, типичные по культурально-морфологическим, тинкториальным и биохимическим свойствам.

2. Набор тест-микроорганизмов может быть уменьшен или расширен в зависимости от применения или состава испытуемого лекарственного средства.

Подготовка тест-штаммов. Все культуры микроорганизмов, полученные из Государственных музеев, следует оживлять согласно прилагаемым инструкциям. По рекомендациям Государственного музея патогенных бактерий (ГИСК им. Л.А. Тарасевича) тест-штаммы хранят при температуре $5 \pm 10^\circ\text{C}$ в лиофилизированном состоянии или под слоем стерильного вазелинового масла на среде Романова следующего состава: панкреатического гидролизата казеина — 8,0 г, натрия хлорида — 5,0 г, агар-агара — 10,0 г, воды дистиллированной — 1000 мл, рН после стерилизации $7 \pm 0,1$.

Тест-штаммы бактерий из ампул с лиофилизированной культурой или со среды хранения высевают в пробирки с питательным бульоном и инкубируют посевы при температуре от 30 до 35°C в течение 18–24 ч.

После 2-х, 3-х пассажей с бульона на бульон культуру пересевают бактериологической петлей штрихом на питательный агар в чашках Петри для получения изолированных колоний. Условия выращивания тест-микроорганизмов приведены в табл. 9.

Выросшую на питательном агаре культуру каждого тест-штамма проверяют визуально на чистоту роста, изучают культурально-морфологические и биохимические свойства. Типичные колонии пересевают в пробирки на скошенный агар того же состава и инкубируют, как было указано выше.

Культуры грибов *S. albicans* и *A. niger* хранят при температуре $5 \pm 10^\circ\text{C}$ на скошенном агаре Сабуро, делая посевы каждые 3 мес.

Приготовление инокулята. Выросшие культуры тест-штаммов бактерий и *S. albicans* смывают с поверхности скошенного агара стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида. Концентрацию клеток бактерий и *S. albicans* доводят до 10 единиц в 1 мл, используя отечественный стандартный образец мутности ОСО 42-28-59-85 или международный стандарт мутности (The International Reference Preparation of Opacity of 10 International Units). Можно для этой цели использовать инструментальный турбодиметрический метод.

Для смыва конидий *A. niger* используют стерильный 0,9 % раствор натрия хлорида, содержащий 0,05 % твина-80. Количество конидий *A. niger* в 1 мл смыва определяют с помощью камеры Горячева. Полученную взвесь разводят до концентрации 1×10^9 конидий в 1 мл. Стандартизованные суспензии всех тест-штаммов разводят до 1×10^8 КОЕ/мл (КОЕ — колониеобразующая единица).

Техника испытания. Отбирают препараты в конечной, неповрежденной упаковке. В 5 стерильных флаконов помещают по 20 мл иссле-

дуемого препарата. В каждый флакон вносят по 0,1 мл одного из приготовленных инокулятов тест-микроорганизмов — *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. albicans*, *A. niger* — и перемешивают.

Лекарственные средства, нерастворимые в воде (Категория 2), контаминируют так же, как и водорастворимые препараты, из расчета конечной концентрации тест-микроорганизма 1×10^5 — 1×10^6 КОЕ в 1 мл или 1 г.

Препараты, приготовленные на твердой мазовой основе, нагревают до температуры от 45 до 50 °С. Используя стерильные стеклянные бусы или шпатель, смешивают каждый инокулят стандартизованной микробной суспензии с образцом препарата в течение не менее 1 мин до достижения гомогенной эмульсии. Для улучшения смешивания можно добавить стерильное поверхностно-активное вещество, если оно не влияет на жизнеспособность микроорганизмов или на эффективность консерванта.

Фактическую исходную концентрацию тест-микроорганизмов в контаминированных образцах определяют сразу после контаминации чашечным агаровым методом посева на соответствующие питательные среды, используя подходящие разведения для получения на чашке от 30 до 300 колоний бактерий и от 10 до 100 колоний грибов. Можно также применять для этой цели метод мембранной фильтрации.

Контаминированные образцы препарата выдерживают при температуре от 20 до 25 °С в защищенном от света месте. Через 7, 14 и 28 сут после инокуляции определяют количество жизнеспособных микроорганизмов в 1 мл образца.

Результаты испытания и их интерпретация. Чашечным агаровым методом определяют количество КОЕ/мл для каждого тест-микроорганизма через указанные выше сроки инкубации контаминированного препарата. Выражают в десятичных логарифмах изменение количества микробных клеток по сравнению с исходной концентрацией в 1 мл. Для оценки эффективности антимикробного действия консервантов используют критерии, указанные в табл. 10.

Действие биологических факторов. Микробный антагонизм.

Во внешней среде микроорганизмы существуют в виде сложных ассоциаций. Они постоянно вступают друг с другом в сложные взаимоотношения, которые могут носить характер взаимопомощи-симбиоза или антагонизма.

Антагонизм может проявляться в бактериостатическом, бактериолитическом или бактериоцидном действии. Проявления и механизм микробного антагонизма могут быть весьма различными. Антагонизм

Таблица 8

Категории лекарственных средств, в которые вводятся консерванты

Категория	Лекарственные средства
Категория 1	Водорастворимые лекарственные средства
1 А	Инъекционные и другие парентеральные препараты, включая эмульсии. Лекарственные средства для введения в полость уха, носа (стерильные), офтальмологические средства.
1 Б	Препараты, применяемые местно, нестерильные лекарственные средства для введения в полость носа, эмульсии, в том числе и те, которые применяют на слизистую. Лекарственные средства для приема внутрь, водорастворимые.
1 В	
Категория 2	Нерастворимые лекарственные средства Все лекарственные формы, перечисленные в Категории 1, нерастворимые в воде или приготовленные на безводной основе.

Таблица 9

Условия культивирования тест-микроорганизмов для приготовления инокулята

Микроорганизм	Питательная среда	Температура инкубации посевов	Время инкубации посевов
1	2	3	4
<i>Esherichia coli</i> ATTC 25922	Среда № 1 (ГФ XI, вып. 2, с. 200) Среда № 8 (ГФ XI, вып. 2, с. 208)	от 30 до 35 °С	от 18 до 24 ч
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ГИСК 453 (взамен ATCC 9027)	Среда № 1 (ГФ XI, вып. 2, с. 200) Среда № 8 (ГФ XI, вып. 2, с. 208)	от 30 до 35 °С	от 18 до 24 ч
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538-Р	Среда № 1 (ГФ XI, вып. 2, с. 200) Среда № 8 (ГФ XI, вып. 2, с. 208)	от 30 до 35 °С	от 18 до 24 ч

1	2	3	4
Candida albicans NCTC 885-653	Среда № 2 (ГФ XI, вып. 2, с. 200) Жидкая среда Сабуро (ГФ XI, вып. 2, с. 193)	от 20 до 25 °С	от 44 до 52 ч
Aspergillus niger ВКМ F-1119	Среда № 2 (ГФ XI, вып. 2, с. 200) Жидкая среда Сабуро (ГФ XI, вып. 2, с. 193)	от 20 до 25 °С	от 6 до 10 сут

Примечание: допускается использование альтернативных жидких и агаризованных питательных сред отечественного и зарубежного производства, обеспечивающих обильный рост указанных в табл. 9 микроорганизмов и не изменяющих их характерные культурально-морфологические и биохимические свойства.

Таблица 10

Категории оценки эффективности antimicrobных консервантов лекарственных средств

Категория	Бактерии	Грибы
	В контаминированном образце	
1 А	По сравнению с исходной концентрацией уменьшение логарифма числа бактерий в 1 мл через 7 сут должно быть не менее чем на 1, через 14 сут — не менее чем на 3, а с 14 до 28 сут не должно быть увеличения числа бактерий.	По сравнению с исходной концентрацией через 7, 14 и 28 сут не должно быть увеличения числа грибов.
1 Б	По сравнению с исходной концентрацией уменьшение логарифма числа бактерий в 1 мл через 14 сут должно быть не менее чем на 2, а с 14 до 28 сут не должно быть увеличения числа бактерий.	По сравнению с исходной концентрацией через 14 и 28 сут не должно быть увеличения числа грибов.
1 В	По сравнению с исходной концентрацией уменьшение логарифма числа бактерий в 1 мл через 14 сут должно быть не менее чем на 1, а с 14 до 28 сут не должно быть увеличения числа бактерий.	По сравнению с исходной концентрацией через 14 и 28 сут не должно быть увеличения числа грибов.
2	Бактерии и грибы	
	По сравнению с исходной концентрацией через 14 и 28 сут не должно быть увеличения числа бактерий и грибов.	

может быть обусловлен прямым воздействием микроорганизмов друг на друга или действием их продуктов обмена. Антимикробным действием могут обладать различные неспецифические продукты обмена микробной клетки: кислоты, щелочи, спирты, перекиси, сероводород и др. соединения. Эти вещества действуют на микробную клетку неспецифически. Наибольший интерес представляют вырабатываемые микроорганизмами химические вещества, обладающие специфическим антимикробным действием, т. е. действующим только на определенные виды микроорганизмов.

Для суждения об активности бактериофага определяют его титр. Титром фага называется его предельное разведение, вызывающее полный лизис соответствующей культуры. Определение титра фага можно производить на жидких и плотных питательных средах.

Выделение микробов-антагонистов из почвы производят методом «скученных пластинок». С этой целью густую взвесь почвы сеют на поверхность мясо-пептонного агара в чашки Петри. На фоне скученного роста более отчетливо проявляется действие микробов-антагонистов и микробов-синергистов. Вокруг первых колоний наблюдаются зоны задержки роста, вокруг вторых — пышный рост бактерий. Микробы-антагонисты и продукты их жизнедеятельности практически используют для угнетения или задержки роста гнилостных и патогенных бактерий. Микробы-антагонисты встречаются среди грибов (пенициллы, аспергиллы) и среди бактерий. Выраженными антагонистическими свойствами обладают кишечная и синегнойная палочки, молочнокислые бактерии. Так, синегнойная палочка является антагонистом брюшнотифозной и дифтерийной палочек, холерного вибриона, гнилостные бактерии — антагонисты сибиреязвенной палочки.

Испытание активности микроба-антагониста производится следующим образом. Засевают густым газоном две чашки Петри с мясо-пептонным агаром культурами кишечной палочки и стафилококка. Для этого 2–3 капли бульонной культуры этих микроорганизмов тщательно растирают по поверхности агара при помощи стерильного шпателя. На поверхность засеянных чашек накладывают кусочек агаровой культуры актиномицета-антагониста. Чашки помещают в термостат. Вокруг наложенного кусочка культуры актиномицета-антагониста наблюдается зона, свободная от роста испытуемого микроба.

БАКТЕРИОФАГИЯ

Бактериофаг является вирусом, паразитирующим в бактериальной клетке и вызывающим ее лизис. Фаги широко распространены

в природе и встречаются всюду, где имеются бактерии. В природе существует огромное количество фагов, строго специфичных в отношении определенных видов бактерий. Бактериофаги можно обнаружить в различных объектах внешней среды, например, сточных водах, испражнениях и др.

Феномен бактериофагии может быть изучен на жидких и плотных средах.

Наиболее показательное проявление бактериофагии — это полное просветление бульонной культуры, наступающее вследствие лизиса бактерий.

При нанесении бактериофага на агаровую культуру наблюдается образование так называемых негативных колоний или стерильных пятен.

Метод выделения бактериофага. Берут 1–2 г испражнений или др. материала, размешивают в 50 мл МПБ и ставят в термостат на 18–24 ч при 37 °С. После этого смесь для очищения от грубых частиц фильтруют через асбестовые пластинки Зейтца.

Литическую силу фильтрата по отношению к той или иной культуре микроорганизмов испытывают несколькими способами.

1. Четыре пробирки с МПБ засевают молодой культурой микроорганизмов. В первую пробирку добавляют 1 каплю, во вторую 10 капель и в третью 2 мл фильтрата. Четвертая пробирка служит контролем. После 12–18-часового инкубирования в термостате учитывают результаты. Если во всех пробирках, кроме контрольной, рост отсутствует, то выделенный бактериофаг очень активен; если бульон в пробирках с фильтратом менее мутен, чем в контрольной пробирке, или в третьей пробирке прозрачен, то выделен бактериофаг средней активности; если же все пробирки одинаково мутны, то бактериофаг в фильтрате отсутствует.

2. 12–18-часовую культуру бактерий наносят на агар в чашке Петри и растирают шпателем по всей поверхности агара так, чтобы получить сплошной рост. Подсушивают в термостате 30–45 мин, затем добавляют каплю испытуемого фильтрата, растирают его по агару и ставят чашку в термостат на 18–24 ч. При наличии в фильтрате бактериофага в культуре будут видны стерильные пятна.

3. На подсушенную поверхность агара в чашке Петри помещают каплю бульонной культуры микроорганизмов и растирают ее шпателем. Затем наносят на агар каплю испытуемого фильтрата и, наклоня чашку, дают ему стечь в одном направлении. Ставят чашку в термостат на 18–24 ч. Если по ходу стекания капли роста не будет, то в фильтрате присутствует бактериофаг.

Для суждения об активности бактериофага определяют его титр. Титром фага называется его предельное разведение, вызывающее полный лизис соответствующей культуры. Определение титра фага можно производить на жидких и плотных питательных средах.

Метод титрования бактериофага в жидкой питательной среде. Необходимо приготовить ряд пробирок, содержащих по 4,5 мл МПБ. В первую пробирку стерильной пипеткой вносят 0,5 мл исходного бактериофага (разведение 1:10). Из первого разведения новой стерильной пипеткой 0,5 мл переносят во 2-ю пробирку (разведение 1:100). И таким образом проводят разведение в девяти пробирках. Десятую пробирку оставляют для контроля, т. е. она не должна содержать фага. Во все пробирки, включая контрольную, вносят по одной капле бульонной культуры микроорганизма. Пробирки термостатируют 18–24 ч и после этого производят учет результатов.

СТЕРИЛИЗАЦИЯ. МЕТОДЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ

Стерилизация — это процесс умерщвления в объекте или удаления из него микроорганизмов всех видов, находящихся на всех стадиях развития.

Для стерилизации используют следующие методы:

- ✓ термические;
- ✓ химические;
- ✓ стерилизация фильтрованием;
- ✓ радиационный метод стерилизации.

Термические методы стерилизации

Паровой метод стерилизации осуществляют насыщенным водяным паром при избыточном давлении 0,11 Мпа (1,1 кгс/см²) и температуре 120 °С; 0,20 Мпа (2 кгс/см²) и температуре 132 °С. Стерилизацию проводят в паровых стерилизаторах — автоклавах. Совместное действие высокой температуры и пара обеспечивает высокую эффективность данного способа. При этом погибают вегетативные клетки и споры микроорганизмов.

Стерилизация паром при температуре 120 °С рекомендуется для растворов лекарственных веществ. Время стерилизационной выдержки зависит от физико-химических свойств препарата, объема раствора и используемого оборудования (табл. 11).

Время стерилизационной выдержки растворов лекарственных веществ
в зависимости от объема образца

Объем образца, мл	Минимальное время стерилизационной выдержки, мин
До 100	8
От 100 до 500	12
От 500 до 1000	15

Жиры и масла в герметично закупоренных сосудах стерилизуют при 120 °С в течение 2 ч.

Этим методом стерилизуют также изделия из стекла, фарфора, металла, перевязочные и вспомогательные материалы (вата, марля, бинты, фильтровальная бумага, спецодежда и др.). Время стерилизационной выдержки при температуре 120 °С — 45 мин, при 132 °С — 20 мин. Для стерилизации изделий из резины следует использовать первый из указанных режимов.

Воздушный метод стерилизации осуществляют сухим горячим воздухом в воздушных стерилизаторах при температуре 160, 180 или 200 °С.

Эффективность этого метода стерилизации зависит от температуры, времени, степени теплопроводности стерилизуемых объектов и правильности расположения их внутри стерилизационной камеры для обеспечения свободной циркуляции горячего воздуха.

Воздушный метод используют для стерилизации термостойких порошкообразных веществ (натрия хлорида, окиси цинка, талька, белой глины и др.) (табл. 12).

Изделия из стекла, металла, силиконовой резины, фарфора, установки для стерилизующего фильтрования с фильтрами и приемники фильтрата стерилизуют при 180 °С в течение 60 мин или при 160 °С в течение 2,5 ч.

Прокаливанием на пламени стерилизуют бактериальные петли, пинцеты, предметные стекла и некоторые мелкие инструменты (иглы, крючки, лопаточки). Температура пламени горелки достигает 1560 °С. При прокаливании происходит сгорание микроорганизмов и их спор.

Кипячение — простейший способ стерилизации игл, шприцев, хирургических инструментов, резиновых трубок. Для этого применяют специальные стерилизаторы для инструментов. Стерилизацию проводят в течение 20–30 мин. Для устранения жесткости воды и повышения

температуры кипения в воду полезно добавить 1–2 % бикарбоната натрия. Однако следует помнить, что споры некоторых бацилл и вирусные частицы (возбудитель гепатита) могут выдерживать кипячение в течение нескольких часов.

Таблица 12

Время стерилизационной выдержки термостойких порошкообразных веществ и температура в зависимости от массы образца

Масса образца, г	Температура, °С	Минимальное время стерилизационной выдержки, мин
до 25	180	30
	200	10
от 25 до 100	180	40
	200	20
от 100 до 200	180	60
	200	30
до 100	180	30
	200	15
от 100 до 500	180	40
	200	20

Стерилизацию текучим паром применяют в тех случаях, когда стерилизуемый материал изменяет свои свойства при температуре выше 100 °С. Таким способом стерилизуют растворы, содержащие углеводы, витамины, молоко и др. Используют автоклав с незакрепленной крышкой и открытым паровыпускным краном или специальный аппарат Коха. Поскольку при 100 °С многие споровые формы сохраняют свою жизнеспособность, прибегают к дробной стерилизации, нагревая стерилизуемый материал текучим паром при 100 °С 30 мин 3 раза через каждые 24 ч с выдерживанием стерилизуемых объектов между стерилизациями при 18–37 °С. За это время споровые формы микробов прорастают и превращаются в вегетативные, которые погибают при повторных прогревах.

Тиндализация — вид дробной стерилизации, который применяют к объектам, содержащим вещества, разлагающиеся и денатурирующие при 100 °С (витамины, некоторые глазные капли, питательные среды). При этом нагревают стерилизуемый объект на водяных банях с термо-

регуляторами при 60–65 °С 5 раз или при 70–80 °С 3 раза по 60 мин с выдерживанием между стерилизациями при температуре 18–37 °С. Недостаток дробной стерилизации — возможность образования спор вегетативными клетками, образовавшимися из проросших спор.

Химические методы стерилизации. Метод рекомендуется для изделий из полимерных материалов, резины, стекла, коррозионно-стойких материалов.

Для *газовой стерилизации* используют окись этилена или ее смесь с различными флегматизаторами: бромистым метилом, двуокисью углерода, хладонами (фреонами) и др. Стерилизацию проводят в газовых стерилизаторах или микроанаэростатах при следующих режимах:

- ✓ окись этилена — стерилизующая доза 1200 мг/дм³, температура стерилизации не менее 18 °С, относительная влажность 80 %, время стерилизационной выдержки — 16 ч (микроанаэростат);
- ✓ смесь ОБ (смесь окиси этилена и бромистого метила в весовом соотношении 1:2,5):

а) стерилизующая доза 2000 мг/дм³, температура стерилизации 55 °С, относительная влажность 80 %, время стерилизационной выдержки — 4 ч;

б) стерилизующая доза 2000 мг/дм³, температура стерилизации не менее 18 °С, относительная влажность 80 %, время стерилизационной выдержки — 16 ч при той же относительной влажности (микроанаэростат).

В связи с токсичностью окиси этилена и бромистого метила применение стерилизованных этими газами изделий допускается только после их дегазации, т. е. выдержки в вентилируемом помещении до допустимых остаточных количеств, указанных в НТД.

Для *химической стерилизации растворами* используют перекись водорода и надкислоты.

При стерилизации 6 % раствором перекиси водорода температура стерилизующего раствора должна быть не менее 18 °С, время стерилизационной выдержки — 6 ч; при температуре 50 °С — 3 ч.

При стерилизации 1 % раствором дезоксана-1 (по надуксусной кислоте) температура стерилизующего раствора должна быть не менее 18 °С, время стерилизационной выдержки — 45 мин.

Химическую стерилизацию растворами проводят в закрытых емкостях из стекла, пластмассы или емкостях, покрытых неповрежденной эмалью, при полном погружении изделия в раствор на время стерилизационной выдержки. После этого изделие должно быть промыто стерильной водой в асептических условиях.

Стерилизация фильтрованием. Растворы термолabileльных веществ (растворы белков, сыворотки, некоторые витамины и др.) стерилизуют фильтрованием с помощью мембранных и глубинных фильтров, задерживающих микроорганизмы и их споры. Мембранные фильтры характеризуются ситовым механизмом задержания и постоянным размером пор при эксплуатации.

Максимальный диаметр пор стерилизующего фильтра не превышает 0,3 мкм. Мембранные фильтры изготавливаются из эфиров целлюлозы (ацетилцеллюлозы, этилцеллюлозы, нитроцеллюлозы) и их смесей, а также из политетрафторэтилена (тефлона), поливинилхлорида, акрила, нейлона и др. полимеров.

Глубинные фильтры изготавливают из волокнистых материалов (хлопок, шерсть, стекловолокно, смесь целлюлозы и асбеста и др.). Эти фильтры имеют толщину 2–6 мм и удерживают микроорганизмы и частицы за счет адсорбционного, ситового и инерционного механизмов. Глубинные фильтры могут быть использованы для стерилизации растворов, в том числе содержащих микробные тела размером 0,3 мкм.

Задержанные в глубине фильтра микроорганизмы могут прорасти в процессе длительной фильтрации и попадать затем в фильтруемый раствор. Кроме того, возможен отрыв волокон фильтра и загрязнение ими фильтра. Особенно опасны в этом отношении фильтры из асбеста и стекловолокна, поэтому такие фильтры не должны применяться для стерилизации лекарственных средств, вводимых парентерально.

Стерилизацию фильтрованием и разлив раствора проводят в асептических условиях.

В лабораторной практике широко применяется фильтрация материала с помощью фильтра Зейтца (асбестовые фильтры). Эти фильтры помещают в разъемную часть цилиндрической воронки Зейтца, обе части которой скрепляются барашкообразными болтами. Трубочатый конец воронки через резиновую пробку вставляют в колбу Бунзена. Собранная система с асбестовым фильтром стерилизуется в автоклаве.

Фильтруемую жидкость наливают в металлический цилиндр аппарата, из колбы приемника откачивают воздух, под влиянием разности давлений жидкость проходит через фильтр (рис. 6).

Радиационный метод стерилизации. Радиационный метод стерилизации может быть рекомендован для изделий из пластмасс, изделий одноразового использования в упаковке, перевязочных материалов, некоторых лекарственных средств и др.

Облучение объектов в конечной упаковке производят на гамма-установках, ускорителях электронов и др. источниках ионизирующего излучения дозой 25 кГр или др. дозами в зависимости от конкретных условий.

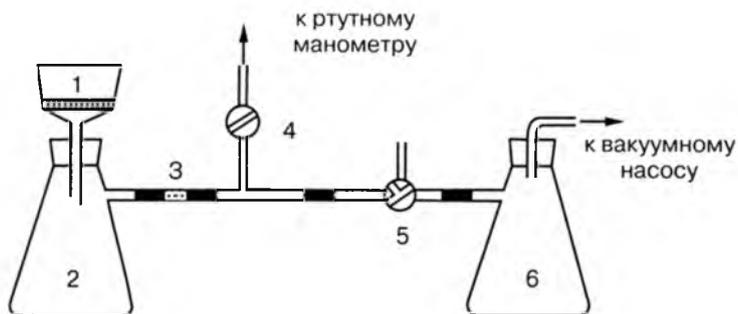


Рис. 6. Установка для фильтрации в условиях вакуума:

1 — фильтр Зейтца; 2 — колба Бунзена для сбора фильтрата; 3 — переходная трубка с ватным фильтром; 4, 5 — вакуумные краны; 6 — ловушка

ЗАДАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ЗАНЯТИЮ

1. Определить эффективность действия дезинфицирующих средств методом «тест-объектов».
2. Провести определение эффективности антимикробных консервантов лекарственных средств.
3. Провести выделение микробов-антагонистов из почвы методом «скупенных пластинок».
4. Определить активность микроба-антагониста по зоне задержки роста испытуемого микроба.
5. Провести выделение бактериофага и подтвердить его литическую силу.
6. Провести титрование бактериофага на жидких питательных средах.

Раздел 4.

ФИТОПАТОГЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ. МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО СЫРЬЯ И ГОТОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

**Тема: ФИТОПАТОГЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ.
МИКРОБНОЕ ЗАГРЯЗНЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО
СЫРЬЯ И ГОТОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ.
ФАРМАКОПЕЙНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ
К МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЧИСТОТЕ СУБСТАНЦИЙ,
ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ И ГОТОВЫХ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ,
МЕТОДЫ ЕЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ**

Цель: Уметь анализировать источники, признаки, знать последствия микробного загрязнения лекарственного сырья и готовых лекарственных средств; знать меры предупреждения их микробной порчи; освоить фармакопейные методы определения микробиологической чистоты лекарственного сырья и готовых лекарственных средств.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Понятие о фитопатогенных микроорганизмах, их распространение в природе.
2. Пути проникновения фитопатогенных микроорганизмов в растительный организм, механизмы его поражения.
3. Признаки заболеваний растений: особенности бактериозов, микозов, вирусных и микоплазменных инфекций.
4. Меры борьбы с болезнями растений.
5. Предупреждение микробной порчи растительного сырья.
6. Источники, признаки и последствия микробного загрязнения лекарственных препаратов.

7. Предупреждение микробного загрязнения лекарств в аптеках. Объекты микробиологического контроля.

8. Фармакопейные требования к микробиологической чистоте субстанций, вспомогательных веществ и лекарственных препаратов. Методы ее определения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дикий И.Л., Холупяк И.Ю., Шевелева Н.Е., Стегний М.Ю. Микробиология.— Х.: Прапор: Изд-во УкрФА, 1999.— С. 159- 165.
2. Елинов Н.П., Заикина Н.А., Соколова И.П. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии.— М.: Медицина, 1988.— С. 87—100.
3. ДФУ, 2001 р., I издания.

Фитопатогенными называются микроорганизмы, вызывающие заболевания растений, в том числе лекарственных. Попадая в растение различными путями, они с помощью разнообразных повреждающих механизмов способны вызывать локальные (очаговые) или общее поражения. Заболевания существенно влияют на урожайность, пораженные лекарственные растения становятся непригодными для получения сырья и, соответственно, для изготовления лекарственных форм.

Лекарственное сырье также подвержено микробному загрязнению, уровень которого в значительной мере зависит от его происхождения, условий заготовки и хранения. В процессе высушивания большая часть микроорганизмов погибает, однако оставшиеся при нарушении правил хранения (высокая влажность, непродвигаемые помещения) не только длительно сохраняются, но и способны активно размножаться, вызывая ряд изменений как внешних, так и глубоких, приводящих к биодеградации сырья, с утратой специфических фармакологических свойств.

Готовые лекарственные средства (ГЛС) могут загрязняться микроорганизмами в процессе приготовления (первичная контаминация), хранения и использования (вторичная контаминация). Источниками микробного загрязнения ГЛС являются сырье, вода, воздух, упаковка и упаковочный материал, аптечное и заводское оборудование, руки и одежда персонала. Обладая широким набором ферментов, микроорганизмы способны разлагать и использовать в качестве питательного субстрата фармакологически активные субстанции и вспомогательные вещества. Микробной порче особенно подвержены лекарственные средства, богатые органическими веществами, жидкие и мягкие лекарственные

формы. Кроме сапрофитных, лекарственные препараты могут быть контаминированы микроорганизмами, опасными в инфекционном отношении.

С учетом опасности микробного загрязнения разработаны и введены соответствующие фармакопейные требования к лекарственным препаратам, а также к субстанциям и вспомогательным веществам, используемым при их изготовлении.

К нестерильным лекарственным средствам предъявляются требования **микробиологической чистоты**, ограничивающие микробную загрязненность:

- ✓ не допускается присутствие энтеробактерий, золотистого стафилококка, синегнойной палочки;
- ✓ в лекарственных формах, используемых местно, трансдермально, интравагинально; в полость уха, носа, ротовой полости; для ингаляций допускается не более 10^2 бактерий и грибов (дрожжевых и плесневых) суммарно в 1 г (мл);
- ✓ в лекарственных формах для приема внутрь (таблетки, драже, гранулы, капсулы, жидкие лекарственные формы), препаратах для ректального введения, ферментных препаратах допускается не более 10^1 бактерий и не более 10^2 грибов в 1 г (мл);
- ✓ в лекарственных средствах для детей в возрасте до 1 года допускается не более 50 бактерий и грибов суммарно; для детей старше одного года — не более $5 \cdot 10^2$ бактерий и 50 грибов в 1 г (мл);
- ✓ в лекарственных средствах для приема внутрь, в состав которых входит растительное, животное или другое природное сырье, которое невозможно подвергнуть антимикробной обработке и для которого допускается уровень микробного загрязнения более 10^5 бактерий в 1 г (мл) — общее количество бактерий не должно быть более 10^4 , грибов (плесневых и дрожжевых суммарно) — не более 10^3 . В этих лекарственных формах допускается не более 10^2 бактерий семейства энтеробактерий при отсутствии кишечных палочек и сальмонелл.

Введены дополнительные требования к микробиологической чистоте *субстанций и вспомогательных веществ*, используемых в производстве нестерильных лекарственных средств. Уровень их микробного загрязнения не должен превышать пределы, установленные для соответствующих готовых лекарственных средств. Исключение составляют:

- ✓ субстанции и вспомогательные вещества растительного, животного или другого происхождения, уровень микробного загрязнения которых невозможно снизить во время технологического процесса и для которых антимикробная обработка невозможна. В 1 г (мл) до-

пускается не более 10^4 бактерий, не более $2 \cdot 10^3$ плесневых и дрожжевых грибов (суммарно), не более 10^2 энтеробактерий при отсутствии кишечных палочек и сальмонелл. Не допускается присутствие золотистого стафилококка и синегнойной палочки;

- ✓ лекарственное растительное сырье, которое используется для приготовления настоев, отваров и подвергается кипячению или обработке кипящей водой перед применением. В 1 г допускается не более 10^4 бактерий, не более 10^5 грибов и не более 10^2 кишечных палочек.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЧИСТОТЫ ЛЕКАРСТВЕННОГО СЫРЬЯ И ГОТОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, НЕ ОБЛАДАЮЩИХ АНТИМИКРОБНЫМИ СВОЙСТВАМИ

Испытание на микробиологическую чистоту осуществляется *методом прямого посева* по схеме (рис. 7).

Подготовка образцов для анализа

От каждой серии лекарственного препарата (сырья) отбирают среднюю пробу не менее чем 50 г (мл), состоящую из 10 равных разовых проб, взятых из 10 разных упаковок. Для проведения одного анализа используют 10 г (мл) образца, которые разводят стерильным буферным раствором рН 7,0 до конечного объема 100 мл. Образцы готовят к испытанию в виде раствора, суспензии или эмульсии.

Твердые лекарственные формы (порошки, таблетки, драже и др.) и сырье, которые трудно растворяются, вначале измельчают, затем суспендируют в буферном растворе. Мягкие (мази, пасты, свечи, масла, эмульсии) готовят в виде гомогенной эмульсии, для чего к препарату (10 г) добавляют фосфатный буферный раствор и эмульгатор твин-80 (2,5 %). Для получения гомогенного состояния добавляют стеклянные бусы, осуществляют механическое встряхивание и в случае необходимости эмульсию нагревают до температуры не более 45 °С. К мягким лекарственным формам, изготовленным на водорастворимой основе, эмульгатор не добавляют.

Питательные среды

Используют питательные среды, рекомендуемые Фармакопеей: МПА с 1 % глюкозой (среда № 1) — для выращивания бактерий; агар Сабуро (среда № 2 с антибиотиками бензилпенициллином или тетрациклином из расчета 100 мг на 1000 мл среды) — для выращивания грибов; среда № 3 — среда обогащения для энтеробактерий; агар Эндо

(среда № 4) и висмут-сульфитный агар (среда № 5) — для дифференциации представителей семейства энтеробактерий; среда с феноловым красным (среда № 6) — для определения ферментации глюкозы; среда № 7 — для определения восстановления нитратов в нитриты; среда № 8 — среда обогащения для *P. aeruginosa* и *S. aureus*; среда № 9 — для выявления пигмента *P. aeruginosa*; солевой агар с маннитом (среда № 10) — для идентификации *S. aureus*.

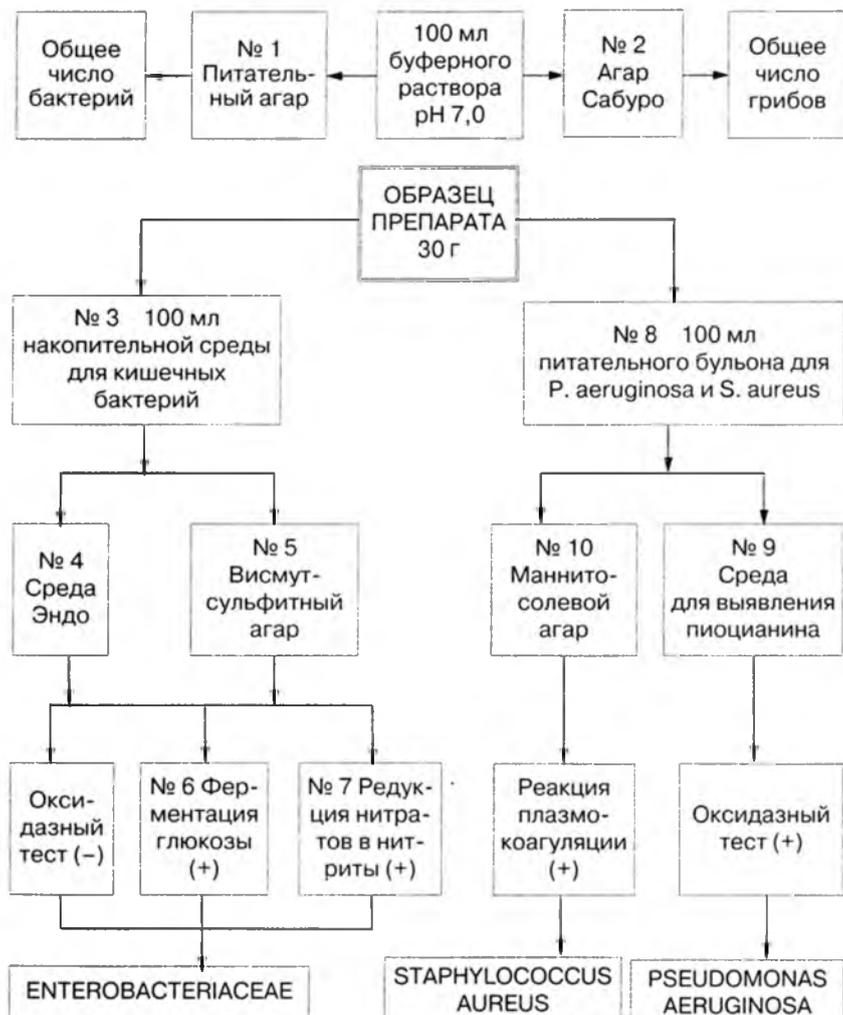


Рис. 7. Схема выделения и идентификации микроорганизмов из нестерильных лекарственных средств

Определение общего числа бактерий

1 мл подготовленного вышеуказанным способом образца лекарственного средства, разведенного 1:10, вносят в виде раствора (суспензии, эмульсии) в каждую из двух пробирок с 4 мл расплавленной и охлажденной до температуры 45–50 °С среды № 1. Быстро перемешивают и вносят в каждую из двух чашек Петри, в которых содержится 15 мл этой же среды, предварительно залитой и застывшей. Равномерно распределяют верхний слой и после застывания инкубируют в течение 5 сут при температуре $32,5 \pm 2,5$ °С. Затем подсчитывают число колоний на двух чашках, находят среднее арифметическое и, умножая на показатель разведения (в данном случае 10), вычисляют число бактерий в 1 г (мл) исследуемого образца.

Следует учитывать только те чашки, на которых выросло менее 300 колоний. Если число колоний больше, осуществляют ряд последовательных разведений (1:100; 1:1000 и т. д.), выбирая для посева наиболее подходящее.

В случае отсутствия роста колоний в разведении 1:10 отмечают, что в 1 г (мл) лекарственного средства менее 10 бактерий.

Наиболее достоверные результаты дают чашки с числом колоний от 30 до 300.

Определение количества плесневых и дрожжевых грибов

Испытание лекарственного средства на общее число содержащихся в нем грибов проводят также методом прямого посева (см. определение общего числа бактерий). В качестве питательной среды используют среду Сабуро, инкубацию посевов осуществляют при $22,5 \pm 2,5$ °С в течение 5 сут. На чашках учитывают все колонии, даже если их число менее 30.

Определение присутствия бактерий семейства *Enterobacteriaceae*

10 г (мл) образца вносят в 100 мл среды обогащения для энтеробактерий (среда № 3), перемешивают и инкубируют при $32,5 \pm 2,5$ °С в течение 24–48 ч. При наличии роста бактерий делают пересевы петлей на среду Эндо и висмут-сульфитный агар, разлитые в чашки Петри. Инкубируют при $32,5 \pm 2,5$ °С в течение 24–48 ч. На среде Эндо энтеробактерии образуют крупные малинового цвета колонии с металлическим блеском (или без него) или розовые, бесцветные, блестящие, выпуклые, диаметром 2–4 мм. На висмут-сульфитном агаре вырастают черные с характерным металлическим блеском колонии или зеленоватые, коричневые. Вышеописанные колонии пересевают каждую в отдельно-

сти на скошенный в пробирках агар (среда № 1) и после инкубирования при температуре $32,5 \pm 2,5$ °С в течение 18–20 ч полученные чистые культуры пересевают на среду с феноловым красным (среда № 6) для определения ферментации глюкозы (устанавливают по изменению цвета среды из красного в желтый) и среду с нитратом калия (среда № 7) для определения восстановления нитратов в нитриты. О наличии нитратов судят по появлению красного окрашивания после внесения в среду реактива Гисса. Параллельно ставят тест на наличие фермента цитохромоксидазы: полоску фильтровальной бумаги смачивают смесью 1 % спиртового раствора нафтола-1 и 1 % раствора N-диметил-p-фенилендиамина (в соотношении 2:3) и на нее наносят чистую культуру исследуемых бактерий. О положительной оксидазной реакции судят по синему окрашиванию, появляющемуся через 2–5 мин.

Если в образце обнаружены грамотрицательные, оксидазонегативные, неспорообразующие палочки, ферментирующие спустя 48 ч после посева на глюкозу с образованием кислоты и газа (или только кислоты) и восстанавливающие нитраты в нитриты, делают вывод о присутствии в ГЛС энтеробактерий и, следовательно, о непригодности его к использованию.

Количественное определение бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, определение *E. coli* и *Salmonella* осуществляют для оценки микробиологической чистоты субстанций, вспомогательных веществ растительного, животного или другого происхождения, которые невозможно подвергнуть антимикробной обработке, и соответствующих ГЛС. При этом используется методика, описанная в ДФУ.

Определение присутствия *S. aureus* и *P. aeruginosa*

10 г (мл) образца ГЛС вносят в 100 мл солевого бульона (среда № 8 для накопления *S. aureus* и *P. aeruginosa*), инкубируют при температуре $32,5 \pm 2,5$ °С в течение 24–48 ч. При наличии роста бактерий делают пересевы петлей на среды № 9 (для выявления пигмента *P. aeruginosa*) и № 10 (солевой агар с маннитом для идентификации *S. aureus*).

Если после инкубирования на среде № 9 вырастают зеленоватые флуоресцирующие колонии грамотрицательных неспорообразующих палочек, выделяющие в среду сине-зеленый пигмент, дающие положительную цитохромоксидазную реакцию, считают, что ГЛС контаминировано синегнойной палочкой.

Если после инкубирования на среде № 10 вырастают золотисто-желтые колонии, окруженные желтыми зонами (подтверждение фер-

ментации маннита), микроскопия которых дает грамположительные кокки, расположенные гроздьями и коагулирующие плазму, считают, что ГЛС контаминировано золотистыми стафилококками.

Наличие синегнойных бактерий и золотистых стафилококков в ГЛС свидетельствует о непригодности исследуемого препарата в медицинской практике.

Определение микробиологической чистоты нестерильных лекарственных средств, обладающих антимикробным действием

Антимикробная активность лекарственного препарата не исключает возможности его микробной загрязненности, что может быть обусловлено отсутствием самостерилизующего эффекта в отношении микроорганизмов, которые не входят в спектр его специфического действия. Например, химиотерапевтические препараты, проявляющие активность в отношении грамположительных бактерий, могут быть контаминированы грамотрицательными, антибактериальными антибиотиками широкого спектра действия — грибами и т. д.

Уровень микробной загрязненности препарата зависит от типа действия (бактериостатический, бактерицидный), поступления в него микробов с приобретенной устойчивостью, наличия в составе веществ, снижающих антимикробное действие препарата.

С целью избежания ошибок в интерпретации результатов, возможных в связи с проявлением антимикробного действия лекарственного средства, перед определением микробиологической чистоты следует предварительно оценить его антимикробную активность.

Определение антимикробного действия лекарственного средства осуществляют по методике, описанной в ДФУ.

Пять образцов испытуемого лекарственного средства по 1 г (мл) каждый разводят в соотношении 1:10, используя фосфатный буферный раствор (2 образца), среду № 3 (1 образец) и среду № 8 (2 образца). Характеристика питательных сред приведена выше.

В качестве тест-штаммов используют стандартные культуры из американской типовой коллекции культур, именуемых АТСС (American Type Culture Collection):

- ✓ *Bacillus subtilis* АТСС 6633;
- ✓ *Escherichia coli* АТСС 25922;
- ✓ *Pseudomonas aeruginosa* АТСС 9027;
- ✓ *Staphylococcus aureus* АТСС 6538-Р;
- ✓ *Candida albicans* АТСС 885-653.

Культуры *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* (*B. cereus*) выращивают на жидкой среде № 1 при температуре $32,5 \pm 2,5$ °С в течение 18–20 ч; культуру гриба *C. albicans* выращивают на жидкой среде Сабу-ро № 2 при температуре $22,5 \pm 2,5$ °С в течение 48 ч.

Культуры разводят в соотношении 1:1000 стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида изотоническим, вносят по 1 мл в подготовленные образцы. *S. aureus* и *P. aeruginosa* — в образцы, разведенные средой № 8, *E. coli* — средой № 3, *B. subtilis*, *C. albicans* — буферным раствором.

В случае роста тест-штаммов на соответствующих питательных средах при добавлении испытуемого лекарственного средства его характеризуют как «не проявляющее антимикробное действие». При последующем определении микробиологической чистоты используют вышеописанную методику прямого посева. Лекарственные средства испытывают в разведении 1:10.

При отсутствии роста тест-штаммов на питательных средах лекарственное средство характеризуют как «проявляющее антимикробное действие», которое при определении микробиологической чистоты устраняют с помощью следующих способов:

- ✓ увеличивают разведение лекарственного средства, используя больший объем растворителя (1:100, 1:1000 и т. д.);
- ✓ добавляют специфический инактиватор — например, пенициллиназу для пенициллина и цефалоспоринов соответственно от 1000 до 50 000–100 000 ЕД на 1 мл среды;
- ✓ добавляют неспецифический инактиватор — например, 4 % твин-80, 0,5 % соевый лецитин;
- ✓ комбинируют способы.

В случае неэффективности вышеописанных методов используют метод мембранной фильтрации.

***Определение микробиологической чистоты
нестерильных лекарственных средств
методом мембранной фильтрации***

Метод мембранной фильтрации может использоваться для контроля микробиологической чистоты нестерильных лекарственных средств, обладающих выраженными антимикробными свойствами, содержащими консерванты, стерильных лекарственных форм, а также сырья и вспомогательных веществ.

Образец лекарственного средства в количестве 10 г (мл) помещают в мерный флакон, растворяют (супендируют или эмульгируют) в фосфатном буферном растворе рН 7,0 так, чтобы конечный объем был 100 мл.

При испытании растительного лекарственного сырья к образцу в количестве 10 г приливают 100 мл фосфатного буферного раствора рН 7,0, встряхивают в течение 5 мин, а затем для фильтрации используют полученную смывную жидкость.

При испытании мазей и растворов лекарственных средств в маслах в качестве растворителя может быть использован изопропилмирикат.

Фильтрацию проводят в асептических условиях с использованием фильтрационной установки, состоящей из фильтродержателя с мембранным фильтром, соединенным с приемником (рис. 8). Фильтродержатель состоит из воронки с крышкой и основания из пористой пластины, на которую помещают мембрану. Для водных, масляных и слабоспиртовых растворов используют нитроцеллюлозные, для сильноспиртовых — ацетатцеллюлозные полимерные мембраны с размером пор $0,45 \pm 0,02$ мкм, диаметром 47 мм. Фильтрацию проводят под вакуумом 93,3 кПа (70 мм рт. ст.).

Непосредственно после приготовления образец лекарственного средства фильтруют, пропуская по 10 мл раствора через каждую из 6 мембран. При испытании лекарственного средства, нерастворимого в воде и образующего суспензию (таблетки, порошки и др.), производят фильтрацию надосадочной жидкости.

Вместе с микробами на фильтре остается противомикробный препарат, поэтому после окончания фильтрации мембраны отмывают 1–5 порциями по 100 мл соответствующего растворителя, например, 0,9 % раствором натрия хлорида, или для жирных веществ — растворами, содержащими твин-80. Растворитель не должен подавлять рост микроорганизмов.

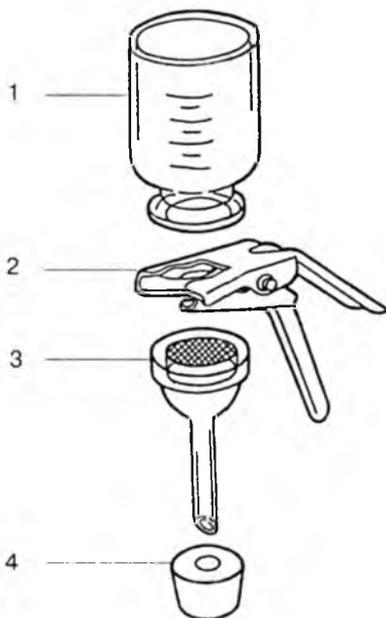


Рис. 8. Элементы устройства для фильтрации под вакуумом: 1 — стеклянная воронка с уплотнением; 2 — алюминиевый зажим; 3 — фильтродержатель с подложкой из пористого стекла; 4 — резиновая пробка, вставляемая в колбу Бунзена

После отмывания мембран их извлекают из фильтродержателя и осуществляют следующие операции:

- ✓ первые две мембраны накладывают на поверхность плотной питательной среды № 1 (МПА с 1 % глюкозы) в чашки Петри и инкубируют при температуре $32,5 \pm 2,5$ °С в течение 5 сут;
- ✓ третью и четвертую мембраны накладывают на поверхность плотной питательной среды № 2 (агар Сабуро) в чашки Петри и инкубируют при температуре $22,5 \pm 2,5$ °С в течение 5 сут;
- ✓ пятую мембрану вносят в 100 мл питательной среды № 3 и инкубируют при температуре $32,5 \pm 2,5$ °С в течение 24–48 ч;
- ✓ шестую мембрану вносят в 100 мл питательной среды № 8 и инкубируют при температуре $32,5 \pm 2,5$ °С в течение 24–48 ч.

Для количественного определения бактерий семейства *Enterobacteriaceae* две мембраны накладывают на поверхность плотной питательной среды № 4 в чашки Петри и инкубируют при температуре $32,5 \pm 2,5$ °С в течение 48 ч.

Количественное определение бактерий и грибов

Посевы на питательных средах № 1 и № 2 просматривают ежедневно, определяя соответственно количество бактерий и грибов. Через 5 суток подсчитывают общее количество бактерий (грибов) на двух мембранах, находят среднее значение, округляют до целого, тем самым вычисляя общее число в 1 г образца.

Для получения достоверных результатов учитывают только те чашки Петри, в которых на поверхности мембраны отмечен рост до 100 колоний микроорганизмов. Если на поверхности мембраны нет роста, результаты отмечают следующим образом: «В 1 г (мл) лекарственного средства бактерии (грибы) не обнаружены».

Если число колоний на мембране превышает 100, делают ряд дальнейших последовательных разведений образца (1:100, 1:1000 и т. д.)

Для фильтрации выбирают разведение, при котором число колоний на мембране не превышает 100. В этом случае при вычислении числа микроорганизмов в 1 г (мл) среднее значение количества колоний, полученное на двух чашках, умножают на соответствующий коэффициент (10, 100 и т. д.).

Выявление и идентификацию бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* осуществляют по окончании инкубации, как описано для метода прямого посева.

**Количественное определение бактерий
сем. Enterobacteriaceae (E. coli)**

Посевы на питательной среде № 4 просматривают в течение 24–48 ч. При наличии на мембранах роста колоний грамотрицательных палочек, типичных для семейства Enterobacteriaceae, подсчитывают их число на двух мембранах, находят среднее значение, округляют до целого, тем самым вычисляя число бактерий семейства Enterobacteriaceae в 1 г образца.

Для количественного определения E. coli в препарате подтверждают рост на среде № 4 (малиновые колонии с металлическим блеском или без него, либо розовые или серовато-кремовые в цвет среды диаметром 2–4 мм). Ставят тесты на фермент цитохромоксидазу (отрицательный), утилизацию цитрата натрия (отрицательный) и индол (положительный).

ЗАДАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ЗАНЯТИЮ

1. Определите микробиологическую чистоту нестерильных лекарственных средств методом прямого посева (общее количество сапрофитных бактерий и грибов).

2. Определите микробиологическую чистоту нестерильных лекарственных средств, обладающих антимикробным действием, методом мембранной фильтрации.

Результаты оценки микробиологической чистоты следует оформлять в виде таблицы (табл. 13).

Таблица 13

Микробиологическая чистота лекарственного средства

Исследуемое лекарственное средство	Разведение	Количество микроорганизмов в 1 г (мл)					
		Бактерий	Грибов		Бактерий семейства Enterobacteriaceae	S. aureus	P. aeruginosa
			дрожжевых	плесневых			

Заключение:

Тема: СТЕРИЛЬНЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА. ПОНЯТИЕ О ПИРОГЕНАХ. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТЕРИЛЬНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Цель: Знать требования, предъявляемые к производству стерильных лекарственных средств; освоить фармакопейные методы определения стерильности.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Современные требования к производству стерильных лекарственных средств.
2. Пирогены, их природа и свойства.
3. Методы определения стерильности лекарственных средств.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дикий Н.Л., Холуняк И.Ю., Шевелева Н.Е., Стегний М.Ю. Микробиология.— Х.: Прапор: Изд-во УкрФА, 1999.— С. 164—165.
2. Елинов Н.П., Заикина Н.А., Соколова Н.П. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии.— М.: Медицина, 1988.— С. 87—100.

В соответствии с рекомендациями Международной федерации фармацевтов и Государственной Фармакопеи стерильными должны быть:

- ✓ лекарственные средства для парентерального применения (инъекций, инфузий и др. способов введения);
- ✓ глазные лекарственные средства (капли, мази, пленки и др.);
- ✓ субстанции и вспомогательные вещества, используемые при получении стерильных лекарственных средств, которые не подвергаются стерилизации в процессе производства;
- ✓ лекарственные средства для введения в полость тела, где в нормальном состоянии отсутствует микрофлора.

Лекарственные препараты для парентерального введения должны подвергаться контролю не только на стерильность, но и на пирогенность, т. е. отсутствие пирогенов.

Пирогенность (от греч. *pyr* — огонь, *genes* — рождающий) — это способность некоторых веществ при парентеральном введении вызывать повышение температуры тела, что сопровождается ознобом, обильным потовыделением, головной болью, тошнотой, учащением пульса. Тяжелые лихорадочные состояния могут иметь летальный исход.

Пирогенные вещества классифицируются как экзогенные (бактериальные) и эндогенные (клеточно-тканевые). Экзогенные пирогены представляют собой продукты жизнедеятельности и распада микроорганизмов. С химической точки зрения, это сложные высокомолекулярные соединения, состоящие в основном из липополисахаридов, адсорбированных на белковом носителе. Эндогенные пирогены — это биологически активные вещества, выделяемые при определенных условиях белками и лейкоцитами крови (лейкопирогены).

Пирогены объединены рядом общих свойств: имеют малые размеры (от 1 до 50 нм), благодаря чему легко проходят через бактериальные фильтры; водорастворимы, но практически нерастворимы в спирте и ацетоне; чувствительны к действию перекиси водорода, перманганата калия; чрезвычайно термостабильны. Стерилизация сухим воздухом при температуре 160 °С в течение 2 ч не гарантирует освобождение стерилизуемого объекта от пирогенов. Нагревание в автоклаве при 120 °С приводит к гибели микроорганизмов, но не к разрушению пирогенов. Таким образом, весьма понятным становится определение: «стерильный раствор может вызвать пирогенную реакцию», и в этом его опасность. Пирогены отличаются высокой биологической активностью — при введении всего лишь 1,5 мкг в организм человека массой 75–80 кг вызывают характерную пирогенную реакцию.

Удалить пирогены чрезвычайно сложно, поэтому важное значение имеет соблюдение условий, исключающих возможность микробной контаминации парентеральных растворов и, следовательно, предупреждающих возникновение пирогенной реакции.

Стерильность лекарственных средств достигается совокупностью противомикробных мероприятий на всех этапах их изготовления, хранения и использования.

На этапе изготовления, в целях предупреждения первичной микробной контаминации, необходимо ограничить содержание микробов в сырье, обеспечить стерильность растворителей, разбавителей, асептические условия технологического процесса. В соответствии с принципами GMP (Good manufacturing practice — надлежащая производственная практика) производство стерильной продукции должно осуществляться в специальных, только для этих целей предназначенных так называемых «чистых» помещениях, в воздухе которых регламентируется строго определенное количество аэрозольных частиц и микроорганизмов. Важное значение имеет соблюдение правил личной гигиены персонала, определенных соответствующими инструкциями.

Испытание на стерильность должно проводиться в асептических условиях, в боксах, желательнее под вытяжкой стерильного ламинарного потока воздуха, в стерильной антистатической одежде.

Для контроля стерильности готовых лекарственных средств, а также субстанций и вспомогательных веществ, используемых при их изготовлении, используют жидкую тиогликолевую (меркаптоуксусную) среду (для выявления бактерий) и жидкую среду Сабуро (для выявления грибов). При этом используют два метода:

- 1) метод прямого посева;
- 2) метод мембранной фильтрации.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕРИЛЬНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, СУБСТАНЦИЙ, ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ МЕТОДОМ ПРЯМОГО ПОСЕВА

Испытуемое лекарственное средство в виде раствора вносят в стерильные колбы (пробирки) со средами в соотношении 1:10, исходя из объема одной контролируемой единицы. При объеме менее 1 мл высевают весь объем; 1–4 мл — 1 мл, 5–19 мл — 2 мл; 20–100 мл — 2–4 мл; более 100 мл — 10 мл.

Параллельно ставят контроли на нейтрализацию возможного антимикробного действия либо введением соответствующего инактиватора, либо разведением препарата (см. вышеописанные способы устранения антимикробного действия). Дополнительно ставят контроль роста тест-штаммов без препарата. При этом в среды добавляют по 0,1 мл взвеси суточных тест-штаммов: *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis*, *C. albicans* (посевная доза 1000 бактерий).

Посевы инкубируют 14 дней в тиогликолевой среде при температуре $32,5 \pm 2,5$ °С, в среде Сабуро — при $22,5 \pm 2,5$ °С.

Если после 14-дневной инкубации в опытных колбах (пробирках) нет микроорганизмов, а в контрольных есть, лекарственное средство считается стерильным.

Наличие роста микроорганизмов в питательных средах оценивают визуально по появлению мутности, пленки, осадка, других макроскопических изменений. Выявленный рост микроорганизмов необходимо подтвердить микроскопией мазков, окрашенных по Граму. При наличии роста микроорганизмов хотя бы в одной опытной пробирке (колбе) препарат считается нестерильным.

При испытании на стерильность мазей или растворов лекарственных средств в маслах в колбу объемом 250 мл, содержащую стеклянные бусы, вносят асептически 0,1 г (мл) образца, 100 мл 1/15 М фосфатного буфера pH 6,8–7,0 и эмульгатор твин-80 в концентрации 2,5 % (в мази на водорастворимой основе эмульгатор не вносят). Содержимое колбы подогревают до 41 ± 1 °С, встряхивают до получения однородной эмульсии, после чего 5 мл вносят в колбу с 40 мл тиогликолевой среды

и 5 мл — в колбу с 40 мл среды Сабуро. Дальнейший ход исследования такой же, как при исследовании на стерильность растворов.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕРИЛЬНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ. СУБСТАНЦИЙ И ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ МЕТОДОМ МЕМБРАННОЙ ФИЛЬТРАЦИИ

Метод используется в основном для определения стерильности лекарственных средств, обладающих антимикробным действием. По сравнению с прямым посевом метод мембранной фильтрации более надежен и экономичен.

Подготовку образцов и фильтрационной установки осуществляют, как описано в разделе «Определение микробиологической чистоты нестерильных лекарственных средств методом мембранной фильтрации».

Растворы (суспензии, эмульсии) пропускают через две мембраны по 10 мл через каждую. После фильтрации мембраны отмывают 3–5 порциями стерильного раствора натрия хлорида изотонического 0,9 % по 100 мл (при определении стерильности растворов) или растворителя, содержащего твин-80 (при испытании мазей и растворов лекарственных средств в маслах). Затем мембраны извлекают, разрезают стерильными ножницами на две половины: одну помещают в колбу со 100 мл тиогликолевой среды, другую — в колбу со 100 мл среды Сабуро, выдерживают при температуре $32, \pm 2,5$ °С (тиогликолевая среда) и $22,5 \pm 2,5$ °С (среда Сабуро) в течение 7 сут, ежедневно осуществляя визуальный контроль. При отсутствии роста микроорганизмов считают, что препарат отвечает требованиям на стерильность. В случае роста микроорганизмов опыт повторяют с удвоенным количеством образцов и питательных сред.

ЗАДАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ЗАНЯТИЮ

1. Определите стерильность раствора для инъекций, не обладающего антимикробным действием, методом прямого посева.

2. Определите стерильность глазных мазей, обладающих антимикробным действием, методом мембранной фильтрации.

Результаты определения стерильности лекарственных средств следует оформить в виде таблицы (табл. 14).

Таблица 14

Определение стерильности лекарственного средства

Исследуемое лекарственное средство	Разведение	Рост микроорганизмов на питательных средах		Заключение
		тиогликолевая	среда Сабуро	

Тема: ОСНОВЫ ХИМИОТЕРАПИИ

Цель: Дать общую характеристику химиотерапевтических препаратов, знать предъявляемые к ним требования, изучить основные группы химиопрепаратов, ознакомиться с классификациями антибиотиков, проявлениями микробного антагонизма. Изучить побочное действие химиотерапевтических препаратов и антибиотиков; меры профилактики при лечении инфекционных процессов. Освоить методы определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным химиотерапевтическим препаратам.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Понятие о химиотерапии. Значение работ П. Эрлиха, Д.Л. Романовского.
2. Основные группы химиотерапевтических препаратов.
3. Сульфаниламидные препараты, их классификация.
4. Противотуберкулезные препараты.
5. Противовирусные препараты.
6. Понятие об антибиотикотерапии. Этапы становления науки об антибиотиках.
7. Характеристика антибиотиков. Единица измерения антибиотической активности.
8. Классификация антибиотиков.
9. Микробный антагонизм.
10. Основные правила использования антибактериальных химиопрепаратов.
11. Антибиотикорезистентность микроорганизмов.
12. Побочное действие антибактериальных химиопрепаратов на человеческий организм.
13. Профилактика лекарственной аллергии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дикий И.Л., Холупняк И.Ю., Шевелева Н.Е., Стегний М.Ю. Микробиология.— Х.: Прапор: Изд-во УкрФА, 1999.— С. 165—183.
2. Елинов Н.П., Заикина Н.А., Соколова И.П. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии.— М.: Медицина, 1988.— С. 124—129.

Идеальным требованием для рациональной и целенаправленной терапии бактериальных инфекций является тщательная бактериологическая диагностика заболевания с выделением, идентификацией возбудителя и определением его чувствительности к назначаемому препарату. Оправданность такого подхода диктуется необходимостью выбора наиболее эффективного препарата среди многих близких по спектру действия, а также возможной устойчивостью микроорганизмов к назначаемым антибиотикам. Это особенно важно в связи с широким распространением антибиотикоустойчивых штаммов различных микроорганизмов.

Для определения чувствительности микробов к антибактериальным химиопрепаратам существует ряд методов, среди которых наиболее распространены: метод последовательных разведений в жидкой питательной среде или питательном агаре, метод диффузии в агар (метод дисков, насыщенных антибиотиками) и ряд ускоренных методов.

Определение чувствительности микробов к антибактериальным химиопрепаратам *in vitro* проводится в условиях, значительно отличающихся от тех, в которых препарат действует в организме. На его результаты большое воздействие оказывают такие факторы, как состав и pH питательной среды, величина посевной дозы, возраст культуры, условия культивирования и др. При использовании метода диффузии в агар на результаты исследований влияют толщина слоя питательной среды, ее влажность, скорость диффузии препаратов, скорость роста исследуемых микроорганизмов и др.

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКРОБОВ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ХИМИОПРЕПАРАТАМ

Среды для определения чувствительности должны отвечать следующим требованиям:

- 1) быть стандартными и обеспечивать оптимальные условия роста микроорганизмов;
- 2) не содержать ингибиторов бактериального роста и чрезмерно количества стимуляторов;
- 3) не содержать веществ, подавляющих действия антибактериальных химиопрепаратов.

Взятие проб. Материал для посева из горла, ран, язв следует брать стерильным ватным тампоном. Экссудат из полостей (плевры, брюшной полости, суставов, абсцессов) набирают стерильным шприцем. Кровь из вен желательнее брать в период пика температурной кривой.

При взятии проб мочи следует соблюдать условия асептики. В исследовании используют осадок, полученный при центрифугировании мочи.

Выделение чистых культур и идентификация микробов производятся по правилам бактериологической техники.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БАКТЕРИЙ К АНТИБИОТИКАМ МЕТОДОМ «БУМАЖНЫХ ДИСКОВ»

Этот метод является наиболее простым, быстрым, доступным и широко используемым, его проводят, прежде всего, для оценки эффективности антибиотиков в клинических условиях. Он является качественным методом, позволяющим установить лишь факт чувствительности или устойчивости возбудителя инфекции к данному антибиотику.

Определение чувствительности проводят с чистыми культурами бактерий, однако в ряде случаев с целью быстрого получения ориентировочных данных о чувствительности микроорганизмов для исследования используют непосредственно патологический материал.

Питательную среду разливают в чашки Петри, помещенные на строго горизонтальную поверхность, заполнив их на одинаковую высоту 4 мм (25 мл среды для чашек с внутренним диаметром 9 см). Перед посевом поверхность среды должна быть подсушена для того, чтобы посевной материал мог легко всасываться.

Взятый тампоном материал для исследования помещают в стерильную пробирку, в которую добавляют 1,5 мл физиологического раствора или бульона, встряхивают для получения смыва. Клинический материал или культуру микроорганизма, выделенную от больного, засевают на поверхность застывшего агара в чашку Петри, равномерно распределяют путем покачивания чашки. Избыток жидкости удаляют пипеткой. Чашки подсушивают в течение 30–40 мин при комнатной температуре.

После впитывания жидкости в агар на него прокаленным пинцетом накладывают диски, слегка придавливая, на одинаковом расстоянии друг от друга и на расстоянии 2 см от края чашки. На одну чашку помещают 6 дисков.

Диски представляют собой небольшие кружки диаметром 6 мм, сделанные из специального картона, пропитанные определенным количеством разных антибиотиков. Содержание антибиотиков в диске, указанное на этикетке, соответствует рекомендациям ВОЗ.

После наложения дисков чашки выдерживают при комнатной температуре в течение 30 мин. Чашки помещают в термостат на 18–24 ч при температуре 37 °С в перевернутом кверху дном положении, после чего учитывают результаты.

Если испытуемая микробная флора чувствительна к одному из антибиотиков, вокруг соответственного диска образуется зона задержки роста и тем большая, чем сильнее действие антибиотика. Измеряют диаметры зон задержки роста микробов вокруг дисков, включая диаметр самих дисков, с помощью линейки или измерителя с точностью до 1 мм (рис. 9).

Единичные колонии или тонкая пленка роста внутри зоны задержки роста не учитываются. Отсутствие зоны задержки роста микроба вокруг диска свидетельствует о том, что испытуемый штамм не чувствителен к данному антибиотику. При зоне задержки роста микроба диаметром до 10 мм штамм расценивается как мало-чувствительный. Зона задержки роста микроба более 10 мм указывает на

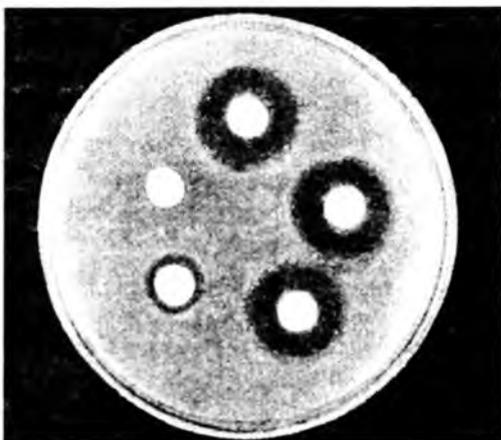


Рис. 9. Определение чувствительности бактерий к антибиотикам методом дисков

чувствительность штамма. Чем больше зона задержки роста, тем выше чувствительность микроорганизмов к антибиотику.

В ответе должно быть написано, какой чувствительностью обладает исследуемая культура, а не размер зоны задержки роста.

Для терапии данной инфекции рекомендуют те антибиотики, вокруг дисков которых получены наибольшие зоны задержки роста.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БАКТЕРИЙ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ХИМИОПРЕПАРАТАМ МЕТОДОМ ДИФФУЗИИ В АГАР

Подбирают одинакового размера чашки Петри, устанавливают их на горизонтальную поверхность (отрегулированную по ватерпасу), наливают 10 мл незараженного «голодного» агара. После застывания этого слоя на него помещают стерильные цилиндры из стекла или нержавеющей стали (высота 10 мм, внутренний диаметр 6 мм) и заливают их «зараженным» агаром в количестве 15 мл. Для этого растопленный и охлажденный агар добавляют к агаровому смыву суточной культуры бактерий или к смыву, полученному из патологического материала.

Густоту взвеси определяют по стандарту мутности № 5 с последующим разведением до нужного количества микробных клеток в 1 мл.

По застывании второго слоя агара цилиндры вынимают и в образовавшиеся лунки вносят испытуемые химиопрепараты антибактериального действия. В каждую лунку помещают $0,3 \pm 0,05$ мл исследуемого препарата. Мазевые формы вносят в лунку до полного ее заполнения. В одной чашке Петри можно испытать активность шести образцов различных препаратов.

Посевы термостатируют при температуре 37°C в течение 24–48 ч, затем учитывают результаты. Измеряют зоны задержки роста тест-микроба, отчетливо видимые вокруг лунок. Высокочувствительными к данному антибиотику считают микроорганизмы, дающие при его действии зоны задержки роста, превышающие 25 мм, чувствительными — 15–25 мм, малочувствительными — 11–15 мм.

Оценка результатов аналогична приведенной в описании метода «бумажных дисков».

Метод последовательных разведений антибактериальных химиопрепаратов в питательной среде является более надежным и точным количественным методом.

Установление степени чувствительности к ряду антибактериальных препаратов микроба, вызывающего инфекционный процесс, влияет на выбор химиопрепарата (отказ от препаратов, характеризующихся относительно высокой токсичностью при умеренной чувствительности к ним возбудителя), его дозировку (концентрация антибиотика в крови в 2–3 раза должна превышать его МПК в отношении возбудителя) и режим введения.

Существуют *две модификации* метода определения чувствительности микробов к антибактериальным химиопрепаратам на жидкой и на плотных питательных средах. Метод дает возможность определить минимальную подавляющую рост концентрацию препарата (МПК) для выделенного штамма возбудителя. Он заключается в приготовлении ряда последовательных разведений антибактериального химиопрепарата в питательной среде с внесением во все разведения исследуемой культуры. По подавлению роста микроба определенной концентрацией препарата в питательной среде судят о степени чувствительности микроорганизма. Ряд разведений химиопрепарата в жидкой питательной среде служит для определения чувствительности данного штамма. На чашке Петри с плотной питательной средой можно определить чувствительность большого числа штаммов (20 и более при посеве штрихом или с помощью штампа-репликатора).

Метод серийных разведений в плотной питательной среде дает возможность определить чувствительность к антибактериальным химиопрепаратам отдельных вариантов штамма. При использовании жидкой среды выявляется чувствительность штамма в целом.

При определении чувствительности методом серийных разведений необходимо выделение возбудителя в чистой культуре.

Различают бактерицидное (убивающее микробы) и бактериостатическое (задерживающее рост микробов) действие препаратов. В отношении противогрибковых препаратов говорят о фунгицидной (фунгистатической) активности.

Метод двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде

Мясо-пептонный бульон (или бульон Сабуро, или другой, на котором растет изучаемый микроб) разливают по 1 мл в пробирки, расставленные в штативы по 10 в ряду. В первую пробирку вносят 1 мл раствора антибактериального химиопрепарата в нужной концентрации (для антибиотиков удобной концентрацией для основного раствора является 200 мкг/мл или ед./мл). Основные растворы антибиотиков стабильны при хранении в холодильнике в течение 1 нед.

После тщательного перемешивания переносят мерной пипеткой 1 мл из этой пробирки во вторую, перемешивают и переносят то же количество смеси из второй в третью и т. д. до девятой пробирки, из которой 1 мл выливают, чтобы во всех пробирках объем жидкости был одинаков. Десятая пробирка, не содержащая препарат, служит контролем на рост культуры микроорганизма.

После этого во все пробирки, содержащие серийно разведенный препарат, и в контрольную пробирку вносят одинаковое количество взвеси тест-культуры. Для этого 18-часовую культуру (для микроорганизмов, рост которых замедлен, используют 48-часовую культуру) испытуемого микроба на косом агаре смывают физиологическим раствором, доводят до густоты 5 ЕД по стандарту мутности с последующим разведением до нужного количества микробных клеток в 1 мл и вносят в пробирки с серийно разведенным препаратом. Результаты учитывают, определяя наличие или отсутствие роста микроба в среде, содержащей различные разведения антибактериального химиопрепарата. Последняя пробирка с задержкой роста (прозрачный бульон) соответствует МПК препарата в отношении испытуемого штамма и указывает на степень его чувствительности. Если среда помутнела во всех пробирках, то испытуемый микроб устойчив

к максимально взятой в опыт концентрации антибактериального химиопрепарата. Отсутствие роста во всех пробирках, кроме контрольной, свидетельствует о том, что МПК препарата в отношении микроба ниже используемой концентрации.

Для определения бактерицидной концентрации из 2–3 последних пробирок с отсутствием видимого роста производят посев на агар или бульон. Через 24–48 ч инкубации в термостате отмечают ту наименьшую концентрацию антибактериального химиопрепарата в пробирке, посев из которой не дал роста, и принимают за минимальную бактерицидную концентрацию (МБК).

Метод двукратных серийных разведений в плотной питательной среде

Принцип опыта тот же, что и при определении чувствительности микроорганизмов к антибактериальным химиопрепаратам в жидкой питательной среде.

Перед постановкой опыта агар расплавляют на водяной бане и охлаждают до 50–60 °С.

Готовят двукратные разведения антибактериального химиопрепарата, после чего вносят по 1 мл каждого разведения в пробирку, содержащую 4 мл агаризованной расплавленной и охлажденной среды.

Затем пробирки скашивают для застывания агара, а на поверхность плотной среды петлей засевают взвесь тест-культуры.

Для постановки опыта в чашках Петри берут 1 объем, содержащий определенное разведение препарата, и 9 объемов расплавленного и остуженного агара, тщательно перемешивают в пробирках и выливают в чашку Петри. В контрольную пробирку с агаром вместо раствора антибактериального химиопрепарата вносят 1 объем стерильной дистиллированной воды. Приготовленные таким образом чашки, каждая из которых содержит определенную концентрацию препарата, делят на секторы, на каждый из которых засевают испытуемый штамм. Посев делают петлей или пастеровской пипеткой.

Для посева часто пользуются также специальным штампом-репликатором, позволяющим нанести на поверхность агара одновременно 25–32 испытуемые культуры. Посевы инкубируют в термостате при температуре 37 °С в течение 18–24 ч, после чего учитывают результаты.

За МПК препарата для данного штамма принимают ту, при которой отсутствуют признаки роста на поверхности агара (или вместо бляшки имеется рост единичных колоний).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ К СУЛЬФАНИЛАМИДАМ МЕТОДОМ РАЗВЕДЕНИЙ В ЖИДКИХ СРЕДАХ

Определение чувствительности микроорганизмов к сульфаниламидам затруднено тем, что большинство питательных сред, применяемых для определения лекарственной устойчивости микроорганизмов, для этих препаратов не годятся. Эти среды содержат значительные количества метаболитов, которые являются антагонистами сульфаниламидов (фолиевая кислота и др.). Поэтому определение чувствительности микробов к сульфаниламидам производят методом разведений на специальных средах. Для определения чувствительности к сульфаниламидам энтеробактерий рекомендуется среда Биргера и Зац, а бактерий кокковой группы — среда Ланди, которые могут применяться как жидкими, так и агаризованными. В связи с существованием перекрестной устойчивости микроорганизмов к большинству сульфаниламидов при определении чувствительности возбудителей к этим препаратам достаточно проверить чувствительность к одному какому-либо сульфаниламиду — например, норсульфазолу.

Разведения сульфаниламидного препарата готовят путем разведения основного раствора препарата стерильной дистиллированной водой согласно представленной схеме (табл. 15).

Таблица 15

Приготовление растворов сульфаниламидов

№ п/п	Указания для приготовления растворов сульфаниламидов	Концентрация препарата в полученном растворе, мкг/мл	Окончательная концентрация препарата, мкг/мл, в смеси 1 мл раствора препарата и 100 мл среды
1	Основной раствор	1 000 000	—
2	1 мл р-ра № 1 + 9 мл воды	100 000	1000
3	2 мл р-ра № 2 + 2 мл воды	50 000	500
4	1 мл р-ра № 2 + 9 мл воды	10 000	100
5	1 мл р-ра № 4 + 9 мл воды	1000	10
6	1 мл р-ра № 5 + 9 мл воды	100	1

Для получения необходимых концентраций препаратов в среде к 100 мл питательной среды, пригодной для исследуемой группы бактерий, добавляют 1 мл соответствующего раствора препарата.

После добавления соответствующего раствора препарата среду стерильно разливают по 1 мл в пробирки, после чего в каждую пробирку и контрольную (содержащую среду без сульфаниламида) вносят одинаковое количество взвеси тест-культуры.

После заражения пробирки инкубируют при 37 °С в течение 18–24 ч или более в зависимости от появления роста микробов в контроле.

Результаты оцениваются так же, как в методе двукратных серийных разведений в жидкой среде.

При приеме обычных терапевтических доз сульфаниламидов наиболее вероятный максимальный уровень препаратов в крови составляет 10–50 мкг/мл. В соответствии с этим, а также сообразуясь с устойчивостью большинства диких штаммов бактерий, выделенных до введения сульфаниламидов в клиническую практику, следует считать клинически устойчивыми к сульфаниламидам штаммы, растущие при концентрации препарата 10–50 мкг/мл и выше.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ К СУЛЬФАНИЛАМИДАМ МЕТОДОМ РАЗВЕДЕНИЙ В ПЛОТНЫХ СРЕДАХ

Проводится по тому же принципу, что и в методе разведений в жидких средах. В качестве питательных сред используются: Мюллер-Хинтон агар, среды Биргера, Зац, Ланди с добавлением 1,5–2 % очищенного агара. Ход определения аналогичен описанному ранее методу двукратных серийных разведений в плотной питательной среде.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ К НИТРОФУРАНОВЫМ ПРЕПАРАТАМ МЕТОДОМ РАЗВЕДЕНИЙ В ЖИДКИХ СРЕДАХ

Основные растворы нитрофуранов готовятся в соответствии с растворимостью этих препаратов в воде (табл. 16); раствор фурагина, фуразолидона, фурацилина, фурадонина с концентрацией 200 мкг/мл готовят растворением 10 мг чистого порошкообразного препарата (можно и при нагревании до 60–80 °С) в 50 мл бульона; фурагина с концентрацией 75 мкг/мл готовят растворением 20 мг чистого препарата в 267 мл бульона; фуразолидона с концентрацией 40 мкг/мл готовят растворением 10 мг чистого препарата в 250 мл бульона.

Растворы стабильны при хранении в холодильнике в стерильных условиях в течение месяца. При нарушении стерильности пригодны для применения в течение 5–7 дней при хранении в холодильнике.

Таблица 16

Максимальная растворимость в воде нитрофурановых препаратов

Препарат	Максимальная растворимость в воде
Фурагин растворимый	1:500 = 200 мкг/мл
Фуразолин	1:3000 = 333 мкг/мл
Фурацилин	1:4200 = 238 мкг/мл
Фурадонин	1:5200 = 192 мкг/мл
Фурагин	1:13000 = 77 мкг/мл
Фуразолидон	1:25000 = 40 мкг/мл

Разведения нитрофурановых препаратов готовят путем разведения основного раствора препарата бульоном согласно представленной схеме (табл. 17).

Таблица 17

Приготовление растворов нитрофурановых препаратов

Окончательная концентрация препарата в смеси основного раствора нитрофурана в бульоне, мкг/мл	Фуразолидон		Фурагин		Остальные более растворимые нитрофураны	
	Бульон, мл	Основной раствор, мл	Бульон, мл	Основной раствор, мл	Бульон, мл	Основной раствор, мл
5	2	0,3	2	0,15	2	0,05
10	2	0,7	2	0,03	2	0,1
15	1	0,6	2	0,5	2	0,15
20	1	1,0	2	0,75	2	0,22
25	1	1,7	2	1,0	2	0,3
30	0,5	1,5	2	1,3	2	0,25
40		2,0	1	1,1	2	0,5
50			1	2,0	1,5	0,5
75				2,0	1,25	0,75
100					1,0	1,0
150					0,5	1,5
200						2,0

Питательная среда (МПБ) с нитрофурановым препаратом стерильно разливается в пробирки по 2 мл в каждую. Ход определения и оценка результатов описаны в предыдущих методах.

Концентрация нитрофуранов в крови обычно редко превышает 5 мкг/мл, поэтому при септических инфекциях следует рассматривать как чувствительные те бактерии, которые подавляются при концентрации препарата 5 мкг/мл и менее. Таким образом, при септических инфекциях достаточно определять действие нитрофуранов в концентрациях 10, 20 и 40 мкг/мл. Культуры, рост которых задерживается всеми тремя разведениями, рассматриваются как чувствительные; при отсутствии роста только в двух последних разведениях — как слабо чувствительные, а если действие препарата отмечается только при его концентрации в растворе 40 мкг/мл — как устойчивые. Концентрация нитрофуранов в моче может быть значительно выше, чем в крови, достигая иногда 100 мкг/мл и более. Поэтому при инфекциях в мочевыводящих органах следует определять действие нитрофуранов в концентрациях 20, 40, 75, 100 и 150 мкг/мл (в соответствии с растворимостью препарата). Действие даже одного из двух последних разведений указывает на слабую чувствительность микробов.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ К ЭНТЕРОСЕПТОЛУ МЕТОДОМ РАЗВЕДЕНИЙ В ЖИДКИХ СРЕДАХ

Готовят основной раствор энтеросептола с концентрацией 200 мкг/мл. Для этого 2 мл чистого энтеросептола помещают в стерильную пробирку, добавляют 2 мг 0,1 N раствора едкого натра, несколько раз тщательно взбалтывают и через 1 ч добавляют 8 мл стерильной дистиллированной воды, опять взбалтывают и через несколько часов прозрачный раствор готов к употреблению. При хранении в холодильнике стабилен в течение месяца.

Для определения чувствительности одного штамма микроорганизмов берут 4 пробирки, содержащие по 2 мл стерильной питательной среды. В первую пробирку добавляют 0,1 мл, во вторую — 0,2 мл, в третью — 0,4 мл основного раствора энтеросептола. Четвертая пробирка контрольная, энтеросептол к ней не добавляют. Производят заражение 18-часовой культурой.

Через 18–24 ч, а для медленно растущих микробов через 48–72 ч, оценивают результаты. Если во всех трех опытных пробирках отмечается обильный рост бактерий, культура рассматривается как устойчивая к действию энтеросептола. Если обильный рост отмечается только в пер-

вых двух пробирках — как слабо чувствительная, при росте только в первой пробирке — как чувствительная. Отсутствие или резкая задержка роста во всех трех опытных пробирках указывает на высокую чувствительность исследуемого штамма микроорганизмов.

УСКОРЕННЫЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКРОБОВ К АНТИБИОТИКАМ

При использовании обычных методов определения чувствительности микробов к антибиотикам — метода серийных разведений в жидкой или плотной питательной среде, метода диффузии в агар, «бумажных дисков» — ответ может быть получен не ранее чем через 16–18 ч от начала исследования (без учета времени, необходимого для выделения чистой культуры). Это приводит к тому, что в большинстве случаев, особенно при тяжелом течении инфекционных процессов, лечение антибиотиками начинают до получения данных лабораторного исследования. Вследствие этого практический интерес представляют ускоренные методы определения чувствительности.

В зависимости от принципов, положенных в основу этих методов, их можно распределить на следующие группы:

1) методы, основанные на изменении ферментативной активности микроорганизмов при воздействии антибиотиков;

2) методы, основанные на изменении цвета редокс-индикаторов при изменении окислительно-восстановительного потенциала среды в процессе роста микробов в присутствии антибиотиков;

3) методы, основанные на цитологической оценке изменений морфологии бактериальных клеток под воздействием антибиотиков.

К первой группе относят метод Роджерса и соавт. (1953), основанный на способности антибиотиков подавлять ферментативную активность чувствительных к ним микробов, что сопровождается изменением цвета соответствующего индикатора. Сущность метода заключается в дифференцированном изменении красного цвета индикатора (феноловый красный) в желтый или фиолетовый в зависимости от чувствительности исследуемого штамма микроорганизма к антибиотику. В случае чувствительности к действию антибиотика штамма возбудителя не происходит сбраживание глюкозы при культивировании на среде, содержащей глюкозу, феноловый красный (в качестве индикатора) и определенные концентрации антибиотика. При этом среда окрашивается в фиолетовый цвет вследствие ее подщелачивания. Изменение красного цвета среды на желтый свидетельствует о расщеплении глюкозы с образованием кислоты в результате роста штамма, устойчивого

к действию присутствующего в среде антибиотика. При добавлении к среде культивирования 0,25 % дрожжевого экстракта результаты исследования могут быть учтены через 2,5 ч после его начала.

Использование ускоренных методов, относящихся ко второй группе, основано на изменении окислительно-восстановительного потенциала питательной среды в процессе роста микроорганизмов, о чем судят по изменению цвета добавляемых к среде индикаторов (резазурин, 1,3,5-трифенилтетразолхлорид, 2,6-дихлорфенолиндофенол и др.). Эти методы отличаются технической простотой, а результаты исследования при их использовании могут быть учтены в течение 2–6 ч.

Расплавленный и охлажденный до 50 °С питательный агар смешивают с агаровым смывом суточной изучаемой культуры (из расчета 200 млн. микробных тел в 1 мл питательной среды) или 1 мл (или меньше) непосредственно исследуемого материала (гной, раневое отделяемое и др.).

Выливают в чашку Петри в количестве 15 мл. На застывшей поверхности размещают диски, пропитанные антибиотиками. Чашки инкубируют при 37 °С в течение 3–5 ч, затем обрабатывают индикатором (3–5 мл на каждую чашку) и повторно инкубируют в течение 20–30 мин при температуре 37 °С. Учет результатов производят по изменению цвета среды вокруг дисков с антибиотиками. При использовании в качестве индикатора 1 % раствора 1,3,5-трифенилтетразолхлорида участки агара с бактериальным раствором вследствие образования формазана окрашиваются в красный цвет, а зоны подавления роста микробов вокруг дисков с антибиотиками остаются бесцветными.

При использовании в качестве индикатора 2,6-дихлорфенолиндофенола для исследования применяют двухслойный агар.

В чашку Петри наливают 15 мл питательного агара. После застывания первого слоя на него наносят второй слой. Для этого пробирки с 10 мл расплавленного и охлажденного до 50 °С агара заражают взвесью испытуемых микробов из расчета 200 млн. микробных тел на 1 мл. На застывшую поверхность второго слоя агара накладывают индикаторные диски с антибиотиками. Через 3–4 ч инкубации при температуре 37 °С поверхность чашек заливают 0,2 % раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола на дистиллированной воде. Через несколько минут в местах роста микробов происходит восстановление и обесцвечивание растворов индикатора; зоны подавления роста вокруг дисков с антибиотиками остаются окрашенными в синий цвет.

Зоны подавления роста измеряются и оцениваются, как в методе диффузии в агар с применением дисков.

Наряду с химическими индикаторами используются и биологические, в частности, гемоглобин крови.

Питательную среду в стерильные чашки Петри, установленные горизонтально, заливают в два слоя: нижний слой — 15–20 мл среды с добавлением 10 % цитратной донорской крови, среда должна быть ярко-красного цвета; верхний слой — среда без добавления крови, к которой после расплавления и охлаждения до 45–50 °С добавляют 1 мл испытуемой культуры микроорганизмов (из расчета 200 млн. микр.кл./мл) или 1 мл (или меньше) непосредственно исследуемого материала (гноя, раневое отделяемое и др.), тщательно перемешивают и выливают в чашку Петри на поверхность питательного агара с кровью.

На застывшую поверхность второго слоя накладывают диски с антибиотиками, как это описано в методе диффузии в агар с применением дисков, и чашки помещают в термостат при 37 °С на 5–6 ч.

Участки питательного агара с бактериальным ростом становятся из ярко-красных коричневато-бурыми, т. к. в процессе жизнедеятельности большинство штаммов микроорганизмов создает в питательной среде условия, способствующие переводу гемоглобина в метгемоглобин. Зоны подавления роста вокруг дисков с антибиотиками остаются окрашенными в ярко-красный цвет.

Указанные методы дают возможность судить о степени чувствительности микробов к антибиотикам с той же точностью, что и стандартный метод дисков, однако время исследования сокращается с 16–18 до 3–5 ч.

К ускоренным методам определения чувствительности относится метод, с помощью которого обнаруживается образование инволюционных форм бактерий под действием антибиотика при фазово-контрастной микроскопии. Инволюционные формы микроорганизмов образуются в присутствии бактериостатических концентраций антибиотика. В отсутствие его при действии суббактериостатических концентраций, а также при устойчивости изучаемого штамма к препарату вырастают нормальные микроколонии. Морфологические изменения исследуемых культур под действием антибиотика учитывают в специальных микрокамерах. Техника приготовления микрокамер состоит в следующем: в пробирки с 0,5–1 мл расплавленного МПА добавляют равные объемы того или иного антибиотика в двукратно убывающих концентрациях. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и выливают на поверхность предметных стекол. Полученный таким образом ряд стекол с агаром, содержащим различные концентрации антибиотиков,

соответствует ряду чашек Петри или ряду пробирок с убывающими концентрациями антибиотика при методе серийных разведений. Агар заражают (с помощью тонко оттянутой пастеровской пипетки) взвесью исследуемой культуры и накрывают покровным стеклом. Камеры без парафинизации помещают в термостат при температуре 37 °С на 3–5 ч. Результаты учитывают по образованию инволюционных форм микробов (при фазово-контрастном микроскопировании) с установлением концентрации антибиотика, вызвавшей их образование (МПК).

Метод фазово-контрастной микроскопии может быть применен для определения чувствительности к антибиотикам штаммов кишечной палочки, стафилококков, холерных вибрионов.

Таким образом, определение чувствительности возбудителей инфекционного процесса к антибактериальным химиопрепаратам является основным лабораторным методом, на основе которого осуществляется выбор оптимального препарата для лечения.

ЗАДАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ЗАНЯТИЮ

1. Определите чувствительность микрофлоры своего зева к антибиотикам методом бумажных дисков.

2. Определите чувствительность бактерий к антибактериальным химиопрепаратам методом серийных разведений в жидкой питательной среде. Установите микробную нагрузку.

3. Определите чувствительность микроорганизмов к антибактериальным химиопрепаратам методом серийных разведений в плотной питательной среде при помощи штампа-репликатора. Установите микробную нагрузку.

Раздел 5. ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

Тема: ИНФЕКЦИЯ. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ИНФЕКЦИЯ

Цель: Усвоить основные понятия об инфекционном процессе; овладеть навыками заражения и вскрытия лабораторных животных.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Определение понятий «инфекция», «инфекционный процесс», «инфекционная болезнь». Условия, необходимые для возникновения инфекционного процесса.
2. Определение понятий «патогенность» и «вирулентность». Единицы измерения вирулентности.
3. Способы снижения и повышения вирулентности. Практическое значение.
4. Факторы вирулентности.
5. Характеристика токсинов микроорганизмов.
6. Роль макроорганизма в возникновении и развитии инфекционного процесса.
7. Роль факторов внешней среды и социальных условий в возникновении инфекционного процесса.
8. Отличительные особенности инфекционного заболевания.
9. Периоды в развитии инфекционного заболевания.
10. Формы инфекционного процесса.
11. Понятие об эпидемическом процессе. Звенья эпидемической цепи.
12. Антропонозные и зоонозные инфекции. Примеры.
13. Источники, механизмы и пути передачи инфекции.
14. Понятие «экспериментальная инфекция» и ее цели.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дикий И.Л., Холуляк И.Ю., Шевелева Н.Е., Стегний М.Ю. Микробиология.— Х.: Прапор: Изд-во УкрФА, 1999.— С. 76–85.
2. Елинов Н.П., Заикина Н.А., Соколова И.П. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии.— М.: Медицина, 1988.— С. 100–104.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ИНФЕКЦИЯ

Инфекционный процесс может быть воспроизведен искусственно, путем заражения лабораторных животных. Экспериментальное заражение лабораторных животных производится с целью:

- 1) выделения чистой культуры возбудителя из различного материала;
- 2) изучения патогенности и вирулентности микроба;
- 3) воспроизведения экспериментальной инфекции;
- 4) испытания лечебного действия химиотерапевтических препаратов.

В качестве лабораторных животных наиболее широко используют белых мышей, морских свинок, кроликов, белых крыс. Специальные исследования проводят на обезьянах, кошках, собаках, крупном и мелком рогатом скоте, лошадях, некоторых видах диких животных (хомяки, суслики, хорьки, полевки), птицах, а также куриных эмбрионах.

ВЫБОР И ПОДГОТОВКА К ЗАРАЖЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Выбор метода введения инфекционного материала лабораторным животным зависит от вида возбудителя, используемого в опыте (или при диагностике), и от предполагаемого тропизма (преимущественных мест поражения).

Перед началом эксперимента животных помечают металлическими ярлычками или краской, взвешивают, иногда термометрируют. Перед кожным или внутрикожным способом заражения шерсть на месте введения материала удаляют выщипыванием, выбриванием или с помощью депилятора.

При работе с животными их фиксируют руками или применяют специальные приспособления (станки, столики).

Для заражения животных используют стерильные инструменты.

МЕТОДЫ ЗАРАЖЕНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Подкожное заражение. Материал вводят в складку кожи, которую захватывают пальцами на спине, у корня хвоста (мышь), на животе (морские свинки, кролики). Прокалывают складку иглой, вводят иглу примерно наполовину, медленно впрыскивают материал. После этого отпускают складку кожи, накладывают на иглу кусочек ваты и быстро вынимают иглу. Во избежание выхода инъецированной жидкости иглу вынимают под углом 45°. Место введения обрабатывают спиртом.

Накожное заражение. На участок кожи, лишенный шерсти и продезинфицированный, наносят царапину с помощью иглы или скарифи-

катора. На царапину капают каплю заразного материала и втирают его в кожу шпателем или стеклянной палочкой.

Внутрикожное заражение. Накануне введения шерсть на боку или спине животного (кролики, морские свинки) подстригают, а затем выбривают. Тонкую иглу вводят острым углом в приподнятую складку кожи под эпидермис. Жидкость вводят в объеме 0,1–0,2 мл, при этом используют туберкулиновый шприц. В результате на месте введения поверхностный слой эпидермиса приподнимается в виде бугорка.

Внутримышечное заражение. Материал вводят длинной иглой глубоко в мышцу бедра, а у птиц — в мышцу груди.

Внутривенное заражение. Для этого способа заражения у кроликов используют краевую вену уха, у морских свинок — ушную и яремную, у кошек и собак — яремную и бедренную, у мышей и крыс — хвостовую вену, причем перед впрыскиванием хвост животных погружают в теплую воду, чтобы вызвать гиперемию. Место введения дезинфицируют, тщательно протирают ксилолом для набухания вены. Материал вводят тонкой иглой по направлению тока крови.

Внутрибрюшинное (интраперитонеальное) заражение. Животное держат вниз головой, чтобы внутренности брюшной полости опустились к диафрагме. При этом образуется свободное место для иглы. Укол делают в нижней трети живота, но не слишком низко. Это уменьшает опасность повреждения отдельных участков кишечника, мочевого пузыря и половых органов. Место инъекции дезинфицируют, берут складку кожи, как при подкожном заражении, вводят в нее иглу, поворачивают под прямым углом и быстрым толчком прокалывают брюшную стенку. При таком способе заражения можно ввести большое количество заразного материала.

Заражение через пищеварительный тракт (пероральное). Наиболее простым способом является смешивание исследуемого материала или микробной взвеси с кормом, однако при этом нельзя учесть дозу инфекта. Более точные результаты получают при введении материала пипеткой через рот. При этом животное фиксируют в вертикальном положении, надавливанием пальцами на щеки или пинцетом открывают рот и медленно капают, давая проглотить каждую каплю. Для данного метода заражения используют также тонкий зонд, который вводят через нос. На наружный конец зонда надевают шприц. Это также позволяет дозировать вводимый материал. Мелких животных заражают при помощи шприца, на который надевают иглу с утолщением на конце в виде оливы.

Заражение через нос (интраназальное). Производят закапывание материала в нос пипеткой или иглой, надетой на шприц. Лучше такое заражение осуществлять под легким наркозом.

Внутричерепное (интрацеребральное) заражение. Мышей и крыс заражают как под наркозом, так и без него. Заразный материал вводят на расстоянии 1–2 мм от точки пересечения средней линии черепа с линией, соединяющей наружные углы глаз. Место укола дезинфицируют. Для заражения используют туберкулиновый шприц с тонкой иглой. Кроликов и морских свинок заражают путем прокола тонкой кости в области надглазничной борозды. Испытуемый материал необходимо вводить медленно, чтобы не вызвать резкого повышения внутричерепного давления и предупредить обратный выход вводимого материала. У крупных животных производят трепанацию черепа.

Заражение через глаз (интраокулярное) можно проводить различными способами. Заражение через конъюнктиву кролику или морской свинке проводят в задний угол глаза, капая одну каплю материала из пипетки.

При субконъюнктивальном заражении тонкой иглой вводят 0,2–0,5 мл материала под конъюнктиву. Образуется небольшой пузырек, который быстро рассасывается.

Заражение через прямую кишку (перректальное). Заражение производят путем введения заразного материала, суспендированного в физиологическом растворе, имеющем температуру тела, при помощи клизмы.

ВСКРЫТИЕ ЗАРАЖЕННЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Вскрытие погибших животных проводится с целью извлечения пораженных органов, обнаружения возбудителя, вызвавшего гибель животного, выделения чистой культуры возбудителя и определения места его локализации.

Вскрывать животных по возможности следует сразу же после их гибели, чтобы посторонняя микрофлора не исказила результаты опыта. Применяют только стерильные инструменты: скальпели, ножницы, пинцеты.

Трупы мелких лабораторных животных кладут на спину, растягивают в стороны лапы, прикалывают их к доске или кювете с парафином. Можно использовать специальные столики, снабженные соответствующими фиксирующими приспособлениями.

Производят осмотр наружных покровов, отмечая наличие язв, выпадение шерсти, изменения цвета кожи и др.

Перед вскрытием труп животного смачивают дезинфицирующим раствором или спиртом. Инструменты переносят из стерилизатора в банку со спиртом, а перед употреблением их обжигают в пламени горелки.

Вскрытие и исследование наружных покровов. Делают разрез кожи по средней линии от нижней челюсти до лобка. Кожу отсепааровывают и делают надрезы в направлении конечностей. Кожные лоскуты отворачивают в стороны. Осматривают подкожную клетчатку, отмечают со-

стояние сосудов, отек, кровоизлияния, а также лимфатические узлы. Из последних делают мазки-отпечатки и посевы. Использованные инструменты погружают в дезинфицирующий раствор.

Вскрытие грудной полости. Всю область, освобожденную от кожи, смачивают спиртом и поджигают. Захватив пинцетом мечевидный отросток, делают под ним поперечный надрез, вводят в него ножницы и перерезают ребра в местах их соединения с хрящами. Полученный лоскут в виде треугольника откидывают вверх. Осматривают органы грудной полости. При наличии в ней экссудата делают посевы и мазки. Производят посев крови и делают мазки-отпечатки из тканей легких и плевры. Кровь берут из сердца пастеровской пипеткой из правого желудочка или правого предсердия, место взятия предварительно прижигают раскаленным скальпелем или пинцетом.

Вскрытие брюшной полости производят осторожно, чтобы не поранить кишечник. Для этого захватывают пинцетом брюшную стенку, разрезают ее ножницами от диафрагмы до лобка и делают два поперечных разреза по направлению к конечностям. Образовавшиеся мышечные лоскуты отворачивают в сторону. Кишечник оттягивают пинцетом влево до тех пор, пока не обнажатся печень, почки и селезенка, на которые обращают особое внимание, отмечая цвет, величину, консистенцию. Затем делают посевы из тканей селезенки, печени, брыжеечных лимфатических узлов, экссудата. Материал для посева из органов берут следующим образом: поверхность органа прижигают раскаленным скальпелем и в этом месте делают разрез, с поверхности которого петлей соскабливают ткань и сеют в питательные среды. Для приготовления мазка вырезают кусочек ткани, берут его пинцетом и несколько раз прикасаются поверхностью разреза к предметному стеклу (мазки-отпечатки) или размазывают по нему тонким слоем. Фиксируют мазки на пламени или смесью Никифорова (спирт и эфир поровну) в течение 10–15 мин или метиловым спиртом 3–5 мин. Окрашивают мазки фуксином или синькой и по Граму.

После вскрытия труп животного стерилизуют, все инструменты, доску и кювету дезинфицируют или стерилизуют.

ЗАДАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ЗАНЯТИЮ

1. Произвести подкожное, внутримышечное и внутрибрюшинное заражение белых мышей взвесью стафилококка.
2. Произвести вскрытие погибшего лабораторного животного (белая мышь) и оформить протокол вскрытия.
3. Приготовить мазки-отпечатки из органов погибшего животного (печень, селезенка) и окрасить их метиленовым синим.

**Тема: ИММУНИТЕТ.
НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ И СПЕЦИФИЧЕСКИЕ
ФАКТОРЫ ЗАЩИТЫ ОРГАНИЗМА.
ОСНОВЫ КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ**

Цель: Знать особенности иммунологической реактивности в норме и патологии; изучить методы оценки и освоить методы иммунодиагностики.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Иммуитет — понятие. Виды иммунитета.
2. Основные компоненты неспецифической резистентности.
3. Фагоцитоз. Виды фагоцитов. Стадии фагоцитоза. Завершенный и незавершенный фагоцитоз. Роль фагоцитоза в развитии иммунного ответа. Оценка функционального состояния фагоцитов.
4. Приобретенный иммунитет. Классификация приобретенного иммунитета.
5. Иммунная система. Центральные и периферические лимфоидные органы. Системы Т- и В-лимфоцитов. Методы исследования лимфоцитов. Механизм иммунного ответа.
6. Антигены. Свойства и характеристика антигенов. Полноценные и неполноценные (гаптены) антигены. Антигенная структура бактериальной клетки.
7. Антитела. Классы иммуноглобулинов. Их химические и биологические свойства.
8. Противовирусный иммунитет. Гуморальные и клеточные факторы.
9. Трансплантационный иммунитет. Гуморальные и клеточные факторы. Реакция «трансплантат против хозяина». Преодоление трансплантационного иммунитета.
10. Противоопухолевый иммунитет. Опухолевые антигены. Механизмы противоопухолевой защиты.
11. Аутоиммунные процессы. Аутоантигены, классификация. Аутоантитела. Аутоиммунные заболевания.

12. Иммунодефициты. Недостаточность гуморального иммунитета. Недостаточность клеточного иммунитета. Иммунитет и старение.

13. Клиническая иммунология. Основные приемы иммунодиагностики.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дикий И.Л., Холуляк И.Ю., Шевелева Н.Е., Стегний М.Ю. Микробиология.— Х.: Прапор: Изд-во УкрФА, 1999.— С. 85–111, 122–134.
2. Елинов Н.П., Заикина Н.А., Соколова И.П. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии.— М.: Медицина, 1988.— С. 104–106.

ОСНОВЫ ИММУНОДИАГНОСТИКИ

Клиническая иммунология представляет собой раздел медицины, изучающий патологию человека в контексте нарушения функций иммунной системы. С этих позиций рассматриваются этиология и патогенез заболеваний, а также методы диагностики и лечения. Кроме того, к аспектам данной дисциплины, несомненно, относятся и нарушения взаимодействий иммунной, нервной и эндокринной систем, причем в эти рамки укладывается патогенез большинства патологических состояний человека.

Основными задачами клинической иммунологии являются:

- ✓ диагностика врожденной недостаточности иммунной системы, в том числе наследственных дефектов системы комплемента и фагоцитарной функции (первичные иммунодефициты);
- ✓ своевременное выявление приобретенных иммунологических дефектов (вторичные иммунодефициты);
- ✓ диагностика иммунопатологических проявлений соматической патологии;
- ✓ специфическая диагностика аллергии;
- ✓ диагностика аутоиммунной патологии;
- ✓ диагностика лимфопролиферативных заболеваний;
- ✓ подбор пары донор — реципиент при пересадке органов и тканей;
- ✓ диагностика дефектов иммунной системы при опухолях и их лечение;
- ✓ выявление конкретного иммунологического дефекта и подбор (в том числе и в тестах *in vitro*) способа иммунокоррекции;
- ✓ объективизация эффективности иммунокорректирующей терапии и прогноза течения заболевания;
- ✓ диагностика и лечение иммунопатологии репродуктивной функции (в том числе «иммунные» формы бесплодия, беременность, лактация), а также нарушений, связанных с климаксом.

Для постановки диагноза иммунопатологического состояния используют следующие приемы:

- ✓ сбор иммунологического анамнеза;
- ✓ постановка диагностических тестов непосредственно у больного (тесты *in vivo*);
- ✓ постановка иммунологических тестов *in vitro*.

СБОР ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО АНАМНЕЗА И ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНЫХ ИММУНОПАТОЛОГИЧЕСКИХ СИНДРОМОВ

Сбор иммунологического анамнеза проводят в соответствии с картой иммунологического опроса. В результате опроса следует сразу определить тип наиболее вероятного иммунопатологического синдрома. Как правило, речь идет об одном из следующих 6 синдромов:

- ✓ инфекционный синдром;
- ✓ аллергический синдром;
- ✓ аутоиммунный синдром;
- ✓ первичный иммунодефицит (у детей);
- ✓ вторичный иммунодефицит;
- ✓ иммунопролиферативный синдром.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ТЕСТЫ, ПРОВОДИМЫЕ НЕПОСРЕДСТВЕННО У БОЛЬНОГО (ТЕСТЫ *IN VIVO*)

Тесты этой группы включают кожные тесты (капельные, уколочные и др.), провокационные пробы (эндонозальные, полоскательный тест, ингаляционные тесты) и элиминационные пробы.

Наибольшее распространение получили кожные тесты. Следует помнить, что проведение тестов *in vivo* всегда имеет ряд противопоказаний, особенно у детей. К таким противопоказаниям прежде всего относятся:

- 1) обострение аллергического заболевания;
- 2) острые инфекции;
- 3) обострение или декомпенсация заболеваний эндокринного аппарата, сердечно-сосудистой системы, печени, почек;
- 4) злокачественные опухоли;
- 5) психические и неврологические заболевания;
- 6) длительная терапия глюкокортикостероидами или иммунодепрессантами;
- 7) анафилактический шок в анамнезе;
- 8) беременность.

Следует помнить и о вероятности ложноположительных и ложноотрицательных результатов. Первые могут возникнуть при повышенной чувствительности к механическому раздражению и компонентам разводящей жидкости или при наличии перекрестных реакций. Получение ложноотрицательного результата может быть связано с нарушением техники постановки проб, отсутствием или истощением реагентов в коже, предшествующих приему антимадиаторных препаратов, если есть аллергия другого типа.

Иногда применяют холодовую пробу (прикладывание кусочков льда), тепловую пробу (прикладывание грелки с температурой 40–42 °С), а также кратковременную локальную инсоляцию (при подозрении на фотодерматиты).

ОСНОВНЫЕ ТЕСТЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ИММУНОДИАГНОСТИКИ

Все существующие в настоящее время лабораторные иммунологические тесты могут быть разделены на тесты I и II уровня.

Тесты I уровня (ориентирующие) включают:

- ✓ подсчет общего числа лимфоцитов (абсолютное и относительное содержание в периферической крови);
- ✓ определение количества Т- и В-лимфоцитов;
- ✓ оценка фагоцитарной активности нейтрофилов;
- ✓ определение основных классов сывороточных иммуноглобулинов (IgA, IgM, IgG);
- ✓ определение титра комплемента (не всегда).

После анализа результатов тестов I уровня определяют тактику дальнейшего исследования иммунного статуса. Тесты II уровня в отличие от тестов I уровня ставят избирательно в зависимости от того, какие цели преследует проводимое иммунологическое обследование.

Тесты II уровня могут включать:

- ✓ определение Т- и В-лимфоцитов и их субпопуляций (CD4⁺, CD8⁺);
- ✓ определение циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК);
- ✓ постановку реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ);
- ✓ определение специфических IgE;
- ✓ НСТ, а также любые другие исследования состояния иммунной системы.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛИМФОЦИТОВ

Как правило, исследование лимфоцитов в лаборатории включает этап выделения фракции мононуклеарных лейкоцитов из перифериче-

ской крови. С этой целью используют метод градиентного центрифугирования. Кровь больного (кровь берут из вены в раствор гепарина) разводят в два раза забуференным изотоническим раствором натрия хлорида, не содержащим ионов Mg и Ca, и осторожно настилают на раствор фикола. В последний для увеличения его плотности добавляют рентгеноконтрастный препарат для внутривенного введения (например, верографин, гипак, триозил и др.). В результате между плазмой и раствором фикола образуется ступенчатый градиент плотности. После центрифугирования эритроциты и гранулоциты проходят сквозь фикол и оседают на дно, а мононуклеары (лимфоциты и моноциты) остаются в виде кольца в интерфазе. Клетки собирают пипеткой, отмывают, переносят в культуральную среду и исследуют с помощью различных методов.

Все методы исследования лимфоцитов можно разделить на изучение поверхностных маркеров и функциональные тесты.

В 1983 году Первое международное рабочее совещание по антигенам дифференцировки лейкоцитов ввело в практику клинической иммунологии термин «clusters of differentiation» (кластеры дифференцировки, сокращенно CD).

МЕТОДЫ, ОСНОВАННЫЕ НА ИЗУЧЕНИИ ПОВЕРХНОСТНЫХ МАРКЕРОВ

В настоящее время для идентификации поверхностных структур лимфоцитов и ряда других клеток в основном используют 3 группы методов:

- 1) розеткообразование;
- 2) методы иммунофлуоресценции;
- 3) иммуноферментные методы.

Наиболее дешевым и в то же время достаточно точным методом определения численности популяции Т-лимфоцитов является метод розеткообразования. Метод основан на наличии сродства между рецептором CD2 и гликопротеинами мембраны эритроцита барана. При смешивании лимфоцитов с эритроцитами барана образуются фигуры, получившие название розеток. Количество таких розеткообразующих клеток (Е-РОК) соответствует количеству Т-лимфоцитов, для которых характерна экспрессия на поверхности CD2-антигена.

Другая модификация метода розеткообразования (ЕАС-розетки) используется для идентификации В-клеток. Известно, что на поверхности В-лимфоцитов имеется рецептор для С3-компонента комплемента. Для выявления этого рецептора лимфоциты смешивают с эритроцитами быка, последовательно обработанными антиэритроцитарными антителами

в субагглютинирующей концентрации и комплементом (свежезамороженной сывороткой крови мыши). Использование такого источника комплемента гарантирует защиту эритроцитов от комплементзависимого лизиса. После совместной инкубации В-клетки образуют фигуры розеток.

Более прогрессивным является использование метода иммунофлуоресценции, который позволяет с помощью наборов моноклональных антител к различным CD-антигенам идентифицировать практически любые поверхностные структуры лимфоцитов.

Различают метод прямой и непрямой иммунофлуоресценции. Первый состоит в использовании анти-CD-моноклональных антител, к которым присоединена флуоресцентная метка. Чаще применяют флуоресцеин изотиоцианат (ФИТЦ), дающий в ультрафиолетовых лучах зеленоватое свечение. При наблюдении в люминесцентном микроскопе клеток, обработанных мечеными антителами, можно видеть характерные светящиеся ободки, указывающие на то, что на поверхности данной клетки экспрессированы соответствующие дифференцировочные антигены. Метод непрямой иммунофлуоресценции предполагает использование немеченных моноклональных антител. Визуализация реакции осуществляется с помощью вторых антител (например, козы антитела против иммуноглобулина мыши, если моноклональные антитела были получены на основе мышинной гибридомы), несущих флуоресцентную метку.

Применение иммуноферментного метода, когда ко вторым проявляющимся антителам вместо ФИТЦ присоединяется пероксидазная метка, особенно удобно для небольших иммунологических лабораторий, так как не требует дорогих люминесцентных микроскопов. Цветную реакцию, возникающую при взаимодействии фермент—субстрат, можно наблюдать в обычный световой микроскоп.

Универсальным методом исследования лейкоцитов является метод лазерной проточной цитофлуориметрии, который позволяет не только получить детальные характеристики клеточных субпопуляций, но производить их препаративное разделение. Прежде всего, на основе анализа светорассеивания (без применения антител) в исследуемом образце можно определить содержание лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов. Используя метод иммунофлуоресценции (прямой или непрямой), можно определить численность различных субпопуляций лимфоцитов. Помимо регистрации свечения, возможна оценка его интенсивности. Обработка полученных данных по специальной программе позволяет вычислить плотность данного рецептора на клеточной мембране. За ограниченный отрезок времени можно произвести большее число анализов.

Помимо определения численности популяций и субпопуляций, важное значение придается вычислению показателя CD4/CD8, так называемого хелперно-супрессорного отношения.

Определение соотношения лимфоцитов с хелперной и супрессорной функциями допустимо производить в теофиллиновом тесте.

Принцип метода заключается в том, что в присутствии теофиллина Т-лимфоциты с супрессорной функцией теряют способность к Е-розеткообразованию. Такие клетки получили название теофиллинчувствительных (ТЧ). Так называемые теофиллинрезистентные (ТР) клетки в значительном проценте случаев содержали субпопуляцию Т-лимфоцитов с хелперной активностью. Показатель ТР/ТЧ в норме составляет 2,5–3,5.

ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ЛИМФОЦИТОВ

Существует большое число методов, позволяющих исследовать *in vitro* различные функции лимфоидных клеток. В частности, в клинических иммунологических лабораториях исследуют интенсивность пролиферативного ответа лимфоцитов на Т- и В-клеточные митогены (рис. 10), продукцию антител, а также синтез мононуклеарами периферической крови цитокинов.

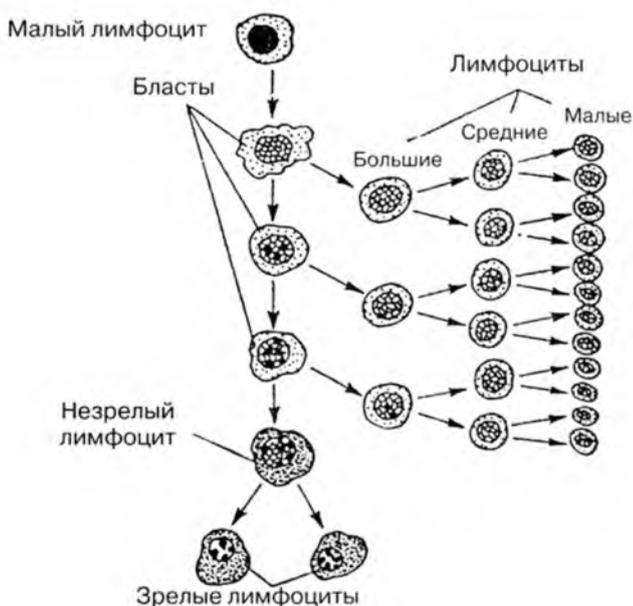


Рис. 10. Реакция бласттрансформации лимфоцитов

РЕАКЦИЯ БЛАСТТРАНСФОРМАЦИИ ЛИМФОЦИТОВ (РБТЛ)

Известны вещества, оказывающие на лимфоциты млекопитающих митогенное действие (табл. 18).

Таблица 18

Неспецифические митогены лимфоцитов

Митоген	Происхождение	Мишень
ФГА	<i>Phaseolus vulgaris</i>	T-лимфоциты
Кон А	<i>Canavalia ensiformis</i>	T-лимфоциты
Митоген лаконоса МЛ (PWM)	<i>Phytolacca americana</i>	В-лимфоциты в присутствии T-клеток
ЛПС	грамположительные бактерии	В-лимфоциты

Чаще для оценки функционального состояния T-лимфоцитов в клинической лабораторной практике используют фитогемагглютинин (ФГА) — растительный лектин, получаемый из семян фасоли. Обычно мононуклеарные лейкоциты, выделенные из периферической крови методом градиентного центрифугирования, культивируют в присутствии ФГА в течение 72 ч. Результаты реакции можно учитывать либо морфологическим методом, либо по включению радиоактивной метки.

В первом случае из клеточной культуры готовят мазки, фиксируют их в метаноле и окрашивают по Романовскому—Гимза так же, как мазки крови. В световом микроскопе с иммерсионной системой определяют процент бластов по отношению к общему количеству лимфоцитов. Результат может быть выражен также в виде индекса стимуляции (ИС), представляющего собой отношение процента трансформированных клеток в опыте (культура с ФГА) к проценту трансформированных клеток в контроле (культура без ФГА).

Учет результатов по включению радиоактивной метки более удобен. Этот метод позволяет уменьшить количество крови для исследования, а также сократить расход питательных сред и трудозатраты. Культивирование проводят не в пробирках или флаконах, а в 96-луночных планшетах с объемом лунки около 200 мкл. В каждую лунку достаточно внести 50 000 клеток, что в пересчете на цельную кровь составляет 0,05 мл. За 4–6 ч до окончания культивирования в лунки вносят

³H-тимидин. Далее с помощью специального прибора (клеточного харвестера) клетки переносят на стеклянные фильтры, избыток метки смывают большим количеством воды, фильтры высушивают и помещают во флаконы со сцинтилляционной жидкостью. Уровень включения метки оценивают на сцинтилляционном спектрофотометре. Результаты выражают в импульсах в минуту или в виде индекса стимуляции (отношение уровня включения метки в культуре с ФГА к уровню включения метки клетками, культивировавшимися без ФГА).

На интенсивность стимуляции лимфоцитов могут влиять условия культивирования, качество использованных реактивов и сыворотки, используемой как добавка к питательной среде.

При оценке результатов РБТЛ следует обращать внимание как на интенсивность пролиферативного ответа стимулированной культуры, так и на высоту ответа в контрольных лунках. Снижение пролиферативного ответа на ФГА свидетельствует о наличии иммунодефицита, однако механизмы последнего могут быть различны.

Оценка интенсивности продукции цитокинов

С помощью тестов этой группы можно получить представление о продукции цитокинов мононуклеарными лейкоцитами периферической крови. Следует иметь в виду, что одни цитокины продуцируются преимущественно лимфоцитами (ИЛ-2, ИЛ-6), а другие — моноцитами (ИЛ-1, TNF); продукцию первых стимулируют Т-клеточные митогены (ФГА, Кон А), продукцию вторых — микробные липополисахариды (ЛПС).

Исследование проводят по следующей схеме. Мононуклеары периферической крови, выделенные методом градиентного центрифугирования, культивируют в 24-луночных культуральных планшетах (объем лунки около 2 мл) в течение 16–18 ч в присутствии Кон А, ФГА или ЛПС. Надосадочную жидкость собирают и определяют в ней содержание цитокина. Для определения содержания цитокинов используют либо иммуоферментный анализ, либо цитокинзависимые клеточные линии. Принцип определения основан на том, что клеточная линия способна размножаться только в присутствии определенного цитокина. Интенсивность пролиферации клеток линии в присутствии разных разведений исследуемого образца сравнивают с интенсивностью пролиферации клеток той же линии в присутствии различных разведений рекомбинантного цитокина с известной активностью. Математическое сравнение полученных титровочных кривых позволяет вычислить содержание цитокина в исследуемом образце. В некоторых случаях

используют не цитокинзависимую, а цитокинчувствительную клеточную линию. Клетки этой линии гибнут в присутствии цитокина. Таким образом, титровочная кривая будет отражать процент погибших клеток, которых будет тем больше, чем выше концентрация цитокина.

Определение специфических IgE обычно проводят с помощью кожных проб. Определение специфических IgE с помощью радиоаллергосорбентного теста показано при высоком риске анафилактических реакций, поражении кожи. Суть метода заключается в следующем:

1) к аллергену, сорбированному на твердой подложке, добавляют исследуемую сыворотку;

2) после отмывания несвязавшихся IgE добавляют меченые антитела к IgE;

3) по уровню радиоактивности оценивают содержание специфических IgE в исследуемой пробе.

Применяется модификация метода с использованием меченных ферментом антител к IgE.

Методы, основанные на реакции высвобождения гистамина тучными клетками. Суть методов заключается в следующем:

1) к тучным клеткам, покрытым специфическими IgE, добавляют антиген;

2) связывание антигена с IgE вызывает дегрануляцию тучных клеток и высвобождение гистамина;

3) определяют содержание гистамина в растворе.

Эти методы могут использоваться для изучения влияния лекарственных средств и других веществ на тучные клетки и базофилы при аллергических заболеваниях. Методы, основанные на реакции высвобождения гистамина тучными клетками, трудоемки и применяются редко.

ОЦЕНКА ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЗАМЕДЛЕННОГО ТИПА

Для оценки гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) используют реакцию торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ), которая по своей сути является пробирочным аналогом клеточных иммунных реакций ГЗТ. В качестве веществ, модулирующих (тормозящих или активирующих) спонтанную миграционную активность лейкоцитов, применяют те же митогены, что и при РБТЛ. Кроме того, могут быть использованы тканевые и микробные антигены, стандартные аллергены. Последние применяют при диагностике саркоидоза, туберкулеза, альвеолитов и других заболеваний, протекающих с образованием эпителиоидноклеточных гранулем (тканевое выражение ГЗТ).

Анализируемые клетки помещают в стеклянные капилляры, которые инкубируют в чашках Петри с культуральной средой с добавлением или без добавления (спонтанный уровень миграции) митогена либо антигена. Сравнение интенсивности миграции в опытной и контрольной чашках позволяет вычислить индекс миграции.

ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ФАГОЦИТОВ

Наиболее доступным объектом для оценки функционального состояния фагоцитов являются нейтрофилы крови. Оценку активности Fc и C3-рецепторов нейтрофилов можно проводить с помощью реакции розеткообразования с зимозаном, нагруженным соответственно анти-Fc-антителами или комплементом при 4 °С. Этот прием позволяет определить долю нейтрофилов, способных к адгезии объекта фагоцитоза.

Саму фагоцитарную активность оценивают с помощью методов, позволяющих определить долю клеток, способных формировать фагосому. «Переваривающую» способность нейтрофилов и их антибактериальную активность можно определить непосредственно методом фагоцитоза с перевариванием тестируемого микроорганизма. Для постановки реакции фагоцитоза к 1 мл суспензии фагоцитов, к которому было добавлено 8 МЕ гепарина, приливают 1 мл суспензии бактерий. Время взаимодействия составляет обычно 30 мин. После инкубации отбирают 0,5 мл смеси, добавляют 1,5 мл 0,1 % раствора желатина в растворе Хенкса, охлажденного до 0 °С, и центрифугируют 3–4 мин при 300 g. Из осадка готовят мазки, которые окрашивают по Паппенгейму. Просматривают 200 клеток (по возможности трижды). Вычисляют процент фагоцитоза. По числу содержащихся в клетках бактерий рассчитывают индекс активности фагоцитоза: число фагоцитированных бактерий умножают на процент фагоцитирующих клеток; интенсивность фагоцитоза выражают числами от 1 до 4.

Степень 1: фагоцитировано 1–4 бактерии.

Степень 2: фагоцитировано 5–7 бактерий.

Степень 3: фагоцитировано 8–10 бактерий.

Степень 4: фагоцитировано более 10 бактерий на клетку.

Пример проведения расчета при слабом фагоцитозе

<i>Число просчитанных клеток</i>	500
<i>Число нефагоцитировавших клеток</i>	350
<i>Число клеток, фагоцитировавших 1–2 микроба</i>	104
<i>Число клеток, фагоцитировавших 3–4 микроба</i>	40
<i>Число клеток, фагоцитировавших 5 и более микробов</i>	7

Индекс фагоцитоза

$$104 \times 1,5 = 156$$

$$40 \times 3,5 = 140$$

$$7 \times 5 = 35$$

$$331$$

$$331: 500 = 0,7.$$

Количество живых микробов определяют по расseyу на плотные питательные среды 0,1 мл исследуемых фракций. Инкубируют 24(48) ч. При расчете бактерицидности исходят из того, что одна образовавшаяся колония соответствует одному живому микробу.

Для направленного изучения бактерицидности исследуют кровь пациентов и здоровых доноров с добавлением раствора антибиотиков (по 5000 ЕД пенициллина и стрептомицина/мл) и без него, а также проводят бактериальный контроль.

Состав пробы: 0,3 мл раствора Хенкса +
0,1 мл нормальной сыворотки, полученной из крови, взятой у пяти доноров, +
0,5 мл суспензии лейкоцитов (10^7 кл/мл) +
0,1 мл суспензии микробов (10^6 мкб/мл).

Раствор антибиотиков вносят по 0,02 мл в пробу. Инкубируют пробы при 37 °С и определяют число микробов через 20 мин, 1,5 ч и 3 ч. Для этого отбирают по 0,1 мл из каждой пробы, разводят отобранные аликвоты раствором Хенкса в 10, 100 и 1000 раз и наносят на подогретый агар. Если хотят сократить длительность бактериологического исследования, можно определять находящиеся внутри клетки микробы по флуоресценции при помощи окраски акридиновым желтым.

Степень активности опсопинов принято выражать опсопическим индексом, который представляет собой отношение фагоцитарного индекса иммунной сыворотки к фагоцитарному индексу нормальной сыворотки. Вычисление опсонофагоцитарного показателя производится по специальной формуле, дающей более точный результат. Показатель опсопического индекса должен быть больше 1.

$$\text{Опсопический индекс} = \frac{\text{Фагоцитарный индекс иммунной сыворотки}}{\text{Фагоцитарный индекс нормальной сыворотки}} > 1.$$

Процесс фагоцитоза можно исследовать *in vivo*. Для этого белым мышам вводят внутрибрюшинно 3 мл стерильного МПБ, через 2–4 ч — 1 мл микробной взвеси *S. saprophyticus* в изотоническом растворе хлорида натрия по стандарту, содержащему 2 млрд. микробных клеток в 1 мл. Через 10, 30, 60 мин после этого брюшную стенку мыши прокалывают тонким капилляром пастеровской пипетки, набирают в нее несколько капель

экссудата и делают мазки на стеклах, предварительно обезжиренных в смеси Никифорова. Мазки высушивают, фиксируют в смеси Никифорова 10 мин, окрашивают по Романовскому—Гимза 30 мин. При микроскопии отмечают отдельные стадии фагоцитарного процесса: прилипание, поглощение, частичное переваривание. Подсчитывают индекс фагоцитоза в динамике. Если он со временем убывает, то это свидетельствует о том, что фагоциты переваривают поглощенные ими клетки (завершенный фагоцитоз). Если индекс фагоцитоза с течением времени не изменяется или возрастает, то это свидетельствует о незавершенном фагоцитозе.

В последние годы большое распространение получили методы оценки АФК (активные формы кислорода) в НСТ-тесте или с помощью хемолюминесценции. Методы основаны на способности ассоциированных с плазматической мембраной оксидаз восстанавливать кислород с образованием супероксид-анионов или перекиси водорода. Есть основание предполагать, что активация кислородного обмена может служить индикатором процесса захвата.

Для проведения НСТ-пробы — пробы на восстановление нитросинового тетразолиевого до формазана — смешивают 0,1 мл крови, 0,1 мл 0,1 % раствора НСТ в 0,15 М NaCl, инкубируют 20 мин при 37 °С, еще раз тщательно перемешивают. Включение формазана в клетки определяют микроскопией. Результат выражают в процентах формазан-позитивных клеток. Формазан-позитивными клетками считаются клетки с гранулами и включениями синего цвета. Миграционную активность фагоцитов оценивают в тестах РТМЛ и направленного хемотаксиса.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОМПЛЕМЕНТА

Комплемент — это группа сывороточных белков, состоящая из протеаз и их активаторов. Существуют два механизма активации комплемента — классический и альтернативный. Комплемент играет важную роль в защите от микробов, активирует катаболизм циркулирующих иммунных комплексов и участвует в регуляции функций иммунной системы.

В клинической практике невозможно обходиться без определения содержания комплемента и его компонентов в сыворотке крови. Это касается как патологии со сниженной активностью комплемента, так и случаев повышения его активности.

Определение гемолитической активности комплемента. Для исследования компонентов классического пути активации комплемента определяют его гемолитическую активность. Суть метода заключается в следующем:

1) разные разведения сыворотки больного и нормальной сыворотки добавляют к эритроцитам барана, покрытым антителами;

2) степень гемолиза оценивают фотометрически по выходу гемоглобина в раствор. За единицу гемолитической активности компонента принимают величину, обратную тому разведению сыворотки, при котором разрушаются 50 % эритроцитов.

Существуют модификации метода, основанные на применении небольших объемов исследуемой сыворотки. Определение гемолитической активности компонента по 100 % гемолизу основано на гемолизе в геле. Суть этого метода заключается в следующем:

1) в геле, содержащем покрытые антителами эритроциты барана, делают лунки;

2) в лунки вносят разные разведения исследуемой и нормальной сывороток;

3) гемолитическую активность компонента оценивают по диаметру зон гемолиза.

Определение гемолитической активности компонента позволяет обнаружить недостаточность компонентов компонента, прежде всего участвующих в образовании мембраноатакующего комплекса. Кроме того, оценка этого показателя может использоваться для выявления активации компонента, например, при СКВ и гломерулонефрите, хотя чувствительность метода для этого недостаточно высока.

Альтернативный путь активации компонента исследуют редко.

Определение компонентов компонента обычно проводят при обследовании больных с аутоиммунными заболеваниями и при подозрении на генетический дефект компонента.

Количественное определение компонентов компонента (C3 и C4) чаще проводят с помощью простой радиальной иммунодиффузии и нефелометрии. Однако если функциональный дефект компонентов компонента не сопровождается изменением их антигенных свойств, эти методы не информативны.

Функциональные исследования позволяют оценить активность отдельных компонентов компонента в сыворотке. Суть метода заключается в следующем:

1) к стандартной сыворотке, лишенной какого-либо компонента компонента, добавляют исследуемую сыворотку (источник недостающего компонента компонента);

2) определяют гемолитическую активность компонента. Если гемолитическая активность компонента не восстанавливается до

нормы, значит, активность этого компонента комплемента в исследуемой сыворотке снижена.

Иногда дополнительно оценивают активность регуляторных компонентов комплемента, например, ингибитора С1-эстеразы.

ЗАДАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ЗАНЯТИЮ

1. Изучение явления фагоцитоза *in vivo*. Заразите белую мышь внутрибрюшинно взвесью стафилококка для изучения явления фагоцитоза *in vivo*. Проанализируйте защитную роль фагоцитоза в организме.

2. Определение индекса фагоцитоза. Рассчитайте индекс активности фагоцитоза по числу содержащихся в клетках бактерий в мазках, приготовленных ранее при постановке реакции фагоцитоза *in vitro*.

3. Демонстрация результатов метода розеткообразования лимфоцитов с эритроцитами барана для количественной оценки содержания в крови Т-лимфоцитов.

4. Оформите протокол занятия.

Тема: РЕАКЦИИ АНТИГЕН — АНТИТЕЛО

Цель: Знать химические основы реакций иммунитета; освоить методики постановки реакций кольцепреципитации, развернутой реакции агглютинации.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Реакции антиген — антитело. Химические основы. Аффинность — понятие. Методы определения аффинности антител.
2. Методы выявления антител и антигенов, основанные на реакции преципитации.
3. Методы выявления антител и антигенов, основанные на реакции агглютинации.
4. Методы выявления антител и антигенов, основанные на использовании меченых реагентов.
5. Методы выявления антител и антигенов, основанные на реакции лизиса.
6. Практическое использование реакций иммунитета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

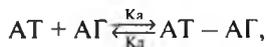
1. *Дикий И.Л., Холуяк И.Ю., Шевелева Н.Е., Стегний М.Ю.* Микробиология.— Х.: Прапор: Изд-во УкрФА, 1999.— С. 111–118.
2. *Елинов Н.П., Заикина Н.А., Соколова И.П.* Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии.— М.: Медицина, 1988.— С. 106–114.

РЕАКЦИИ АНТИГЕН — АНТИТЕЛО.

ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ

В основе реакций иммунитета лежит специфическое соединение антигена с соответствующим антителом в комплексе (реакция антиген — антитело). В результате взаимодействия антигена с антителом происходят конформационные изменения молекулы антитела, обусловленные сближением определенных областей его молекул, возникновением новых областей или маскировкой некоторых из них.

Схематически эту реакцию можно выразить следующим образом:



где AT — свободное антитело;

AG — свободный антиген;

AT-AG — комплекс антиген — антитело;

K_a — константа ассоциации;

K_d — константа диссоциации.

Пользуясь законом действующих масс, уравнение можно видоизменить:

$$K_a[AT][AG] = K_d[AT-AG]$$

и рассчитать константу равновесия:

$$\frac{K_a}{K_d} = K = \frac{[AT-AG]}{[AT][AG]}.$$

Константа равновесия определяет аффинность — сумму сил притяжения и отталкивания между молекулами, которые возникают при взаимодействии активного центра антитела (его антигенсвязывающей области) и гомологичной антигенной детерминанты. Термин аффинность наиболее пригоден для характеристики первичного взаимодействия антигена с антителом, т. е. взаимодействия одной антигенной детерминанты с одним активным центром антитела. Однако в природе антигены и антитела поливалентны и вступают в более сложные взаимодействия, чем только первичное связывание. Поэтому энергию взаимодействия антител и поливалентных антигенов наиболее объективно характеризует функциональная аффинность, или avidность. Поскольку встречающиеся в природных условиях антигены поливалентны, очевидно, что в иммунном ответе организма более важную роль играет функциональная аффинность.

Поливалентное связывание антител в энергетическом отношении выгодней, чем моновалентное, поскольку оно более прочное и имеет явные функциональные и биологические преимущества — для обеспечения активного гуморального иммунитета требуются меньшие концентрации поливалентных антител, чем моновалентных.

Реакция между антителом и антигеном протекает в две стадии, первая из которых специфическая (непосредственное соединение активного центра антитела с антигенной детерминантой), вторая — неспецифическая, когда отличающийся плохой растворимостью иммунный комплекс антиген — антитело выпадает в осадок. Неспецифическая стадия, как правило, осуществляется в присутствии растворов электролитов и визуально проявляется по-разному в зависимости от физического состояния антигена.

В основе иммунологической специфичности, т. е. избирательности реакции определенного антигена с соответствующим ему антителом, лежит структурная комплементарность (стерическое и химическое соответствие) антитела и антигена. Для возникновения сил притяжения эти два компонента системы должны сблизиться своими реагирующими поверхностями на расстояние не более $0,1...0,2$ нм. Существенную роль в реакциях на 1-й стадии играет взаимодействие неполярных (гидрофобных) молекул с водной средой. Контакт этих молекул с молекулами воды ослабевает вследствие стремления гидрофобных групп к ассоциации. В результате возникает неполярное (гидрофобное) связывание и система антиген — антитело стабилизируется, что и приводит к появлению сил притяжения. Сила неполярных взаимодействий возрастает с температурой, так как возникновение этих взаимодействий является эндотермическим процессом.

Межмолекулярные взаимодействия антигена и антитела обусловлены также кулоновскими (ионными) силами, т. е. взаимным притяжением положительно (группа NH_3^+) и отрицательно (группа COO^-) заряженных токовых цепей иммуногена и стимулированного им антитела. Чем больше соответствие полярных групп реагирующих молекул, тем прочнее комплекс антиген — антитело.

Стерические силы отталкивания возникают между атомами при взаимном проникновении их электронных облаков. Чем комплементарней электронные облака, тем меньше силы отталкивания. Стерические силы отталкивания важны для сохранения прочности комплекса антиген — антитело, так как именно они определяют степень соответствия между антигенной детерминантой и активным центром антитела.

— Реакция, происходящая между антителами и антигеном и начинающаяся быстрым соединением детерминантной группы антигена со специфическим активным центром антитела (1-я стадия), осложняется далее образованием длинных цепей из чередующихся молекул антигена и антител, а также разветвлением этих цепей (2-я стадия). Во второй стадии реакции происходит образование решетки антиген — антитело.

Необходимое условие образования решетки — наличие более трех антигенных детерминант на каждую молекулу антигена и по два активных центра на каждую молекулу антитела. На рис. 11 изображены варианты соединения молекул антител с молекулами антигена. Молекулы антигена являются узлами решетки, а молекулы антител — связующими звеньями. В зоне избытка антител (рис. 11, а, б) часть антигенсвязывающих участков свободна и формирование комплекса тормозится. Область оптимальных соотношений (зона эквивалентности) концентраций

антигена и антител, когда в надосадочной жидкости после образования осадка не обнаруживаются ни свободные антигены, ни свободные антитела, представлена на рис. 11, в. В зоне же избытка антигена (рис. 11, г, д) комплекс антиген — антитело растворяется, так как свободные и связанные в решетку молекулы антигена конкурируют между собой за двухвалентные молекулы антител, в результате чего решетка распадается на ряд растворимых комплексов типа АГ—АТ—АГ.

Окончательное формирование системы антиген — антитело протекает намного медленнее, чем 1-я стадия реакции. Это неспецифический процесс, в который могут включаться различные посторонние белки, захватывающиеся решетчатой структурой антиген — антитело и неспособные диффундировать сквозь узкие петли этой решетки в надосадочную жидкость. Скорость образования решетки зависит от температуры, ионной силы раствора и других условий. Оптимальными условиями реакции антиген — антитело *in vitro* считаются следующие: $t=37^{\circ}\text{C}$; ионная сила 0,05...0,1 и рН 6,4...8,6.

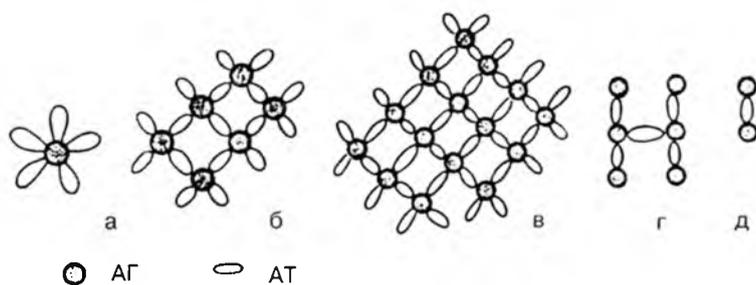


Рис. 11. Структура агрегатов АГ—АТ и их молекулярные соотношения:
а — 5:1; б — 3:1; в — 2,5:1; г — 1:1,25; д — 1:2

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АФФИННОСТИ АНТИТЕЛ

Для определения аффинности антител предложено много методов:

- ✓ равновесный диализ;
- ✓ модифицированный метод осаждения сульфатом аммония;
- ✓ гашение флуоресценции;
- ✓ усиление флуоресценции;
- ✓ торможение преципитации гаптеном.

Метод осаждения сульфатом аммония

Принцип метода. Для оценки аффинности необходимо определение свободного (с) и связанного (в) гаптана. Иммуноглобулины осаждают-

ся в мягких условиях из раствора при 33–55 % насыщения сульфатом аммония без потери сродства к гаптену. Затем измеряется количество гаптена, связанного находящимися в осадке антителами, и свободного гаптена в надосадочной жидкости.

Методика. Используют очищенные антитела или антисыворотку.

Очищенные антитела растворяют в нормальной сыворотке, разведенной в соотношении 1:5 или 1:10, обладающей низким сродством к соответствующему гаптену. Исследуемые антисыворотки также разводят в соотношении 1:5 или 1:10.

К 50 мкл раствора антител приливают пипеткой 50 мкл раствора гаптена.

В качестве контроля неспецифического связывания используют нормальную сыворотку в разведении 1:5 или 1:10.

В зависимости от необходимой точности определения аффинности применяют 5–20 различных концентраций гаптена, охватывающих область концентраций трех порядков (например, от 10^{-5} М до 10^{-7} М). Оба компонента тщательно перемешивают и выдерживают при 4 °С в течение 1 ч. Затем прибавляют равный объем (100 мкл) насыщенного раствора сульфата аммония при температуре 4 °С и немедленно перемешивают, чтобы избежать денатурации антител. После 30-минутной инкубации при 4 °С, в течение которой дважды проводят кратковременное встряхивание, пробирки центрифугируют в течение 15 мин при 5000 об/мин при той же температуре. Надосадочную фракцию в количестве 100 мкл, в которой определяют концентрацию свободного гаптена, переносят в 10 мл сцинтиллятора. Измеряют радиоактивность образца с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика.

Количество свободного гаптена (с) определяют непосредственно по радиоактивности материала. Количество связанного с антителами гаптена (в) вычисляют по разности между радиоактивностью надосадочной фракции раствора, содержащего специфические антитела, и раствора, содержащего нормальную сыворотку. Если концентрация антител известна, то (в) может быть преобразовано в молярное соотношение Г/АТ.

Метод равновесного диализа

Принцип метода. Раствор антител известной концентрации приводится в соприкосновение с раствором гаптена через полупроницаемую мембрану. Оба компонента растворены в одинаковом буфере для того, чтобы исключить разницу рН и ионной силы. Молекулы антител не проходят через мембрану, молекулы гаптена диффундируют через нее в раствор антител и частично связываются с ними. Состояние равновесия

достигается, когда концентрация свободного гаптена становится одинаковой по обе стороны мембраны. Время диффузии зависит от проницаемости мембраны, природы гаптена и температуры. Измерив концентрацию свободного гаптена по обе стороны мембраны, можно определить количество гаптена, связанного с антителами.

ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ И АНТИГЕНОВ

Методы определения антител и антигенов основаны на различных способах регистрации их взаимодействия. С некоторой степенью условности их можно разделить на следующие группы:

- ✓ методы, основанные на реакции преципитации;
- ✓ методы, основанные на реакции агглютинации;
- ✓ методы, основанные на использовании меченых антител или антигенов.

МЕТОДЫ, ОСНОВАННЫЕ НА РЕАКЦИИ ПРЕЦИПИТАЦИИ

Основная модель реакции антиген — антитело представлена преципитацией, в ходе которой антиген из раствора осаждается специфически антителами. Комплекс антиген — антитело выпадает в осадок только при определенных соотношениях концентраций реагирующих молекул. Область этих соотношений, при которых в надосадочной жидкости после образования преципитата не обнаруживаются ни свободные антигены, ни свободные антитела, называется зоной эквивалентности. Вне этой зоны, когда существует избыток антител или антигена, феномен преципитации не развивается, так как образуется растворимый комплекс антиген — антитело. Если в пробы с постоянной концентрацией антител добавлять возрастающие количества антигена и в образовавшихся, отмытых физиологическим раствором преципитатах определять содержание азота микрометодом Къельдаля, можно получить количественное выражение реакции преципитации. В зависимости от вариантов постановки преципитации выявляемое количество антител колеблется от 2 до 18 мкг азота белка антител в 2 мл.

Существуют различные модификации постановки реакции преципитации. Самый простой способ — кольцепреципитация.

Методика. В узкую пробирку (диаметр 0,5 см) наливают 0,3–0,5 мл неразведенной преципитирующей сыворотки. Пастеровской пипеткой медленно настилают по стенке (пробирку держат в наклонном положении) антиген в таком же объеме. Затем пробирку осторожно,

чтобы не смешать жидкости, ставят вертикально. При правильном наложении антигена на сыворотку четко видна граница между двумя слоями жидкости. РП должна обязательно сопровождаться контролем сыворотки и антигена.

Результаты реакции учитывают в зависимости от вида антигена и антител 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.

Реакция преципитации широко применяется в лабораторной практике для диагностики инфекционных заболеваний бактериальной этиологии (сибирская язва, чума, острая респираторная инфекция и др.).

В судебной медицине РП используется для определения видовой принадлежности белка (кровавых 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.

Реакция преципитации может быть поставлена в агаровом геле (иммунодиффузия). Различают простую и двойную иммунодиффузию. В первом случае диффундирует один компонент реакции, во втором — оба. В зависимости от того, происходит ли диффузия по одной общей оси, во все стороны радиально или под углом, иммунодиффузия называется линейной, радиальной или угловой. Общая схема методов представлена на рис. 12.

	Одномерная, т. е. линейная	Двухмерная	
		Радиальная	Угловая
Простая			
Двойная			

Рис. 12. Схема классификации методов иммунодиффузии по Ухтерлони (темные области — растворы АГ; заштрихованные области — АТ или гель с антисывороткой; белые области — нейтральный гель)

ДВОЙНАЯ РАДИАЛЬНАЯ ИММУНОДИФFUЗИЯ

Принцип метода. В лунки, вырезанные в агаровом или агарозном геле, помещают антиген и антисыворотку, которые диффундируют навстречу друг другу. В том участке геля, где их соотношения эквивалентны, образуется видимый преципитат (рис. 13). Двойную радиальную иммунодиффузию проводят на предметных стеклах (микрометод).

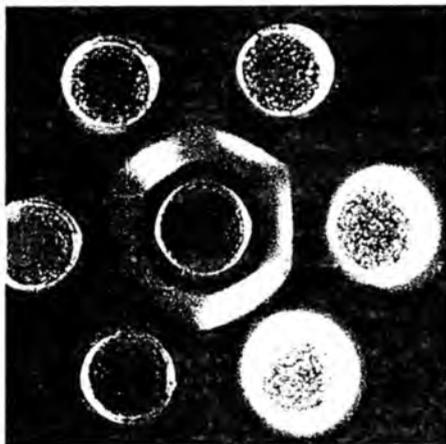


Рис. 13. Реакция преципитации в геле

Методика. Расплавляют 1,5 г агара в 100 мл буфера (0,15 М NaCl) на водяной бане. Порциями по 3 мл горячий агаровый гель наносят на строго горизонтально установленные предметные стекла, для того чтобы получить равномерный слой агара толщиной приблизительно 1,5 мм. После застывания агара пластинки готовы к употреблению. В зависимости от характера иммунохимических исследований в агаре делают лунки при помощи готовых штампов или вы-

резают стеклянной (можно металлической) трубочкой. Лунки должны отстоять друг от друга на расстоянии от 4 до 10 мм. В одни лунки вносят сыворотку, в другие — антигены. После внесения растворов иммунодиффузию проводят во влажной камере при температуре 4, 20 или 37 °С. Продолжительность диффузии зависит от целей исследования, она должна быть не менее 24 ч и в некоторых случаях может достигать 6–7 дней. По окончании иммунодиффузии можно непосредственно оценивать результаты по влажному препарату. Возможен другой способ оценки результатов. Для этого нужно сначала отмыть непреципитирующие субстанции замачиванием пластины 2–3 раза на 12 ч в 0,15 М растворе NaCl. Затем на поверхность геля кладут фильтровальную бумагу, смоченную дистиллированной водой, и гель высушивают при 40–50 °С или при комнатной температуре. Высушенные пластины геля окрашивают обычно амидочерным 10 В, после чего оценивают результаты иммунодиффузии.

Принципиально возможны четыре варианта расположения линий преципитации:

1. Обе линии преципитации полностью сливаются. Это говорит об идентичности обоих антигенов.

2. Линии преципитации пересекаются. Это значит, что реагирующие с антисывороткой детерминанты антигенов неидентичны и, следовательно, сами антигены различны.

3. Одна линия длиннее и продолжастся в виде так называемой «шпоры». «Шпора» часто бывает тоньше основной линии преципитации. Линия преципитации от второй лунки с антигеном сливается с первой линией. Это означает, что оба антигена обладают некоторыми общими детерминантами и образуют с соответствующими антителами иммунные комплексы, приводящие к слиянию линий. Кроме того, один из антигенов имеет больше детерминант, чем другой, что при наличии соответствующих антител в антисыворотке приводит к образованию «шпоры».

4. Обе линии преципитации перекрещиваются и сливаются одновременно. Это означает, что оба антигена содержат как одинаковые, так и различные детерминанты, которые вступают в реакцию с антителами полиспецифической антисыворотки.

Основные типы преципитации представлены на рис. 14.

Вышеописанная методика иммунодиффузии на предметных стеклах представляет собой микровариант метода, предложенного Ухтерло-ни в 1949 г. В условиях макрометода слой геля, создаваемый в чашках Петри, составляет 2–3 мм, лунки и соответственно объемы реагентов довольно велики, лунки отодвинуты друг от друга на значительные расстояния, линии преципитации длинные и хорошо выраженные.

Титрование. Для титрования растворов антигена и антисыворотки располагают лунки так, как показано на рис. 15.

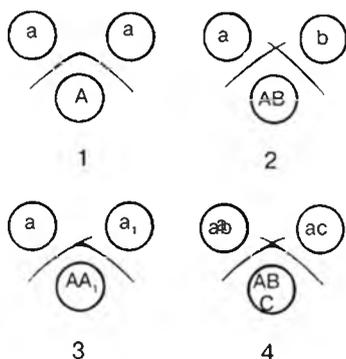


Рис. 14. Расположение линий преципитации при сравнительных исследованиях методом двойной радиальной иммунодиффузии

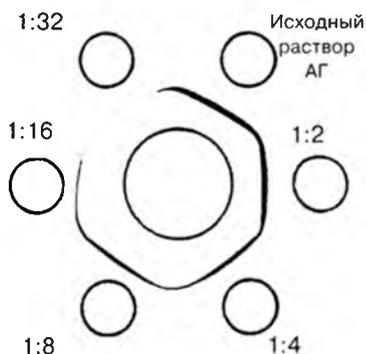


Рис. 15. Двойная радиальная иммунодиффузия. Титрование раствора АГ (титр 1:16)

Одинаковые объемы растворов антигена, приготовленных двукратным разведением, вносят в периферические лунки. Такой же объем антисыворотки вносят в центральную лунку. При оценке иммунодиффузии учитывают:

1. Расстояние от линии преципитации до центральной и периферической лунок.

2. Наибольшее разведение антигена, при котором еще заметно образование преципитата.

3. Интенсивность и ширину полос преципитации.

Наибольшее разведение, при котором образуются видимые преципитаты, дает значение титра. Этим способом можно также определять количество преципитирующих антител в различных антисыворотках, которые можно сравнивать в реакции иммунодиффузии со стандартным раствором антигена.

Полуколичественное определение антигенов. Титрование часто используют для полуколичественного определения антигена. Вокруг центральной лунки с антисывороткой формируют четыре лунки для антигена. Чем выше концентрация антигена, тем ближе к центральной лунке будут расположены полосы преципитации. Путем сравнения со стандартным раствором антигена можно определить неизвестную концентрацию антигена.

ПРОСТАЯ РАДИАЛЬНАЯ ДИФфуЗИЯ

Принцип метода. Этот метод отличается более высокой чувствительностью, чем предыдущий, так как антисыворотка входит в состав агара, в который из лунки диффундирует антиген. По мере удаления от лунки концентрация антигена постепенно падает, пока не станет эквивалентной концентрации антител в агаре. Этот метод впервые описал Манчини в 1963 г.

Методика. Растворяют 1,5 г агара в 100 мл буфера (0,15 М NaCl) на водяной бане, охлаждают до 48 °С и смешивают с АС, желательно подогретой до той же температуры, в небольшой пропорции. Наносят пипеткой 2 мл смеси на предметное стекло, установленное строго горизонтально на подставке, нагретой до 35–40 °С. Золь агара, содержащий антитело, распределяется по поверхности предметного стекла и застывает слоем толщиной 1 мм. На предметном стекле в слое геля вырезают по 8 лунок при помощи стеклянной трубки, соединенной с водоструйным насосом (таким образом создают пониженное давление). В каждую из лунок вносят по 2 мкл раствора антигена. Реакцию простой радиальной иммунодиффузии проводят во влажной камере. Если линии

преципитации достаточно выражены, оценку результатов можно проводить прямо на влажной пластинке. В других случаях пластинки с гелем отмывают 2–3 раза в 0,15 М NaCl; каждая отмывка длится 12 ч. Этим достигается удаление непреципитированных белков. После отмывки препараты высушивают и окрашивают, например, амидочерным 10В. При этом образуется хорошо различимое кольцо преципитации. Чем выше концентрация внесенного антигена, тем больше диаметр кольца. Если в реакции используется несколько стандартов с известной концентрацией антигена, то путем сравнения или построения калибровочной кривой можно проводить количественное определение антигена в образцах.

Для определения титра антител смешивают гель в установочной пропорции с антигеном, антитела диффундируют в гель (обратная радиальная иммунодиффузия). Радиус колец преципитации пропорционален титру.

ИММУНОЭЛЕКТРОФОРЕЗ

Иммуноэлектрофоретический анализ представляет собой сочетание электрофореза в агаровом геле с иммунодиффузией. Существуют различные варианты иммуноэлектрофореза. Иммуноэлектрофорез (ИЭФ) впервые описан Грабар и Уильямс в 1953 г. В 1955 г. Шейдеггер предложил микромодификацию этого метода, применив обычные предметные стекла.

Принцип ИЭФ состоит в следующем. Вначале проводят электрофоретическое разделение белков (антигенов) в забуференном геле агара; после снятия напряжения вдоль направления движения белков в электрическом поле в геле вырезают канавку, в которую вносят преципитирующую иммунную сыворотку. Антиген и антисыворотка диффундируют в геле навстречу друг другу, и в месте их взаимодействия возникают дугообразные линии преципитации, число, положение и форма которых дают представление о составе исходной смеси антигенов (рис. 16).

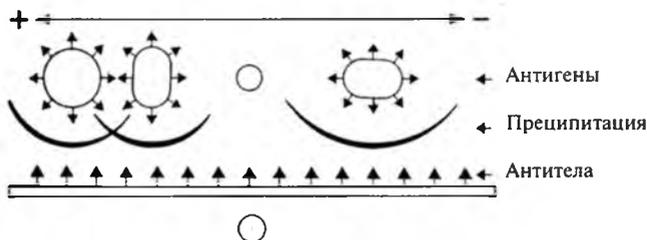


Рис. 16. Принцип иммуноэлектрофореза

С помощью данного метода в клинической иммунологии полуколичественно определяют концентрацию иммуноглобулинов различных классов, идентифицируют миеломные белки. Также ИЭФ используется при диагностике иммунодефицитных состояний. Метод незаменим в последовательном наблюдении за процессом очистки белковых препаратов. Его часто применяют также для контроля подлинности и чистоты этих препаратов.

Для разделения сложной смеси антигенов используют двухмерный (перекрестный) электрофорез. Метод включает два этапа. На первом этапе белки диффундируют под влиянием электрического поля в агарозном геле, содержащем антитела. На втором этапе пластину поворачивают на 90° и подвергают повторной разгонке в направлении, перпендикулярном первому. Таким образом удастся количественно охарактеризовать каждый из антигенов смеси. Этот метод, в частности, применяют для оценки степени конверсии белка системы комплемента С3 в инактивированную форму С3с в сыворотке больных СКВ или синовиальной жидкости больных ревматоидным артритом.

ЭЛЕКТРОИММУННЫЙ АНАЛИЗ

Метод впервые был предложен Лореллом в 1966 г. Гель агарозы, содержащий антисыворотку, распределяют равномерным слоем по плоской поверхности. Препарат, содержащий антиген, вносят в различных разведениях в серию последовательных лунок в геле. Из лунок под воздействием постоянного электрического тока антигены мигрируют в слой агарозы, где взаимодействуют с иммуноглобулинами. В результате этого взаимодействия образуются преципитаты АГ-АТ, приобретающие вытянутую, заостренную форму, напоминающую ракету. Отсюда другое название метода — ракетный иммуноэлектрофорез. Длина зоны преципитации при прочих равных условиях (концентрация геля, концентрация антисыворотки в геле, толщина слоя геля, режим электрофореза) находится в прямой зависимости от концентрации антигена. ЭИА используют для количественного определения белков в жидкостях организма.

ВСТРЕЧНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

Принцип встречного электрофореза применил в 1969 г. Бедарида для обнаружения преципитатов АГ-АТ. Иммунопреципитация происходит в слое носителя, причем в отличие от метода Ухтерлони контакт антигена с антителом происходит не вследствие свободной диффузии, а под влиянием постоянного электрического поля. Белки представляют

собой амфолиты; ввиду различий аминокислотного состава они могут мигрировать в щелочной среде с разной скоростью и в разных направлениях (анодном, катодном). Если антиген и соответствующая преципитирующая антисыворотка мигрируют в разных направлениях, становится возможным их движение навстречу друг другу в слое геля или на ацетатцеллюлозной пленке. Преципитация наблюдается между стартовыми лунками обоих компонентов в течение 30–180 мин в зависимости от приложенного напряжения. Встречный иммуноэлектрофорез (ВИЭФ) предназначен для обнаружения и идентификации преципитирующих систем АГ–АТ при условии, что антиген обладает электрофоретической подвижностью, отличной от той, которой обладают иммуноглобулины. ВИЭФ используют для идентификации антигенов вирусного гепатита В, антител к *Aspergillus* при бронхолегочном аспергиллезе, антител к *N. meningitidis*, антител к ДНК при СКВ.

МЕТОДЫ, ОСНОВАННЫЕ НА РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ

Различают прямую и непрямую, или пассивную, агглютинацию.

В прямой агглютинации антигеном является сама микробная клетка или структурные компоненты ее поверхностной оболочки. Предел чувствительности реакции агглютинации микробов — 0,01 мкг азота белка антител/мл. Количественные результаты реакции могут быть получены химическим определением содержания азота белка иммуноглобулинов.

Агглютинация определяется в большей степени особенностями клеточной оболочки и ее функциями, нежели свойствами агглютининов. Агглютинации способствует расположение антигенных рецепторов клеточной поверхности в виде скоплений. Если многовалентные агглютинины взаимодействуют одновременно с несколькими антигенными рецепторами, константа ассоциации K_a повышается по сравнению с K_a для случаев соединения антитела с антигеном единичной связью.

Ориентировочная реакция агглютинации. Ориентировочную РА проводят на предметных стеклах. Для этого на обезжиренное стекло наносят пастеровской пипеткой несколько капель сыворотки небольших (1:10–1:20) разведений и каплю изотонического раствора натрия хлорида для контроля. В каждую каплю сыворотки, а также в каплю контроля вносят петлю суточной живой культуры микроорганизма, взятой с поверхности плотной питательной среды, или пастеровской пипеткой вводят одну каплю взвеси убитых микроорганизмов (диагностикума). Внесенную культуру тщательно перемешивают, чтобы капля жидкости была равномерно мутной.

Реакция происходит при комнатной температуре. Результаты ее учитывают невооруженным глазом через 5–10 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 через 30–40 мин.

При положительной реакции в капле с сывороткой отмечают появление хлопьев (крупных или мелких), хорошо видимых при покачивании покровного стекла. При отрицательной — жидкость остается равномерно мутной.

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 на отдельных участках наблюдается их скопление. При отрицательной реакции микроорганизмы равномерно распределены по всему полю зрения. Эта реакция получила название микроагглютинации.

Развернутая реакция агглютинации используется для определения серогруппы, серовара микроорганизмов; проводят ее по схеме, представленной в таблице 19. Все ингредиенты разливают по пробиркам в определенной последовательности. Сыворотку разводят 2-кратно — 1:100, 1:200, 1:400 и т. д.

Таблица 19

Схема проведения реакции агглютинации

Ингредиент	Номер пробирки						
	1	2	3	4	5	6 Контроль антигена	7 Контроль сыворотки
Изотонический раствор натрия хлорида, мл	1	1	1	1	1	1	—
Сыворотка больного в разведении 1:50, мл	1	1	1	1	1	—	1
Полученное разведение сыворотки	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	—	1:50
Взвесь бактерий, капли	2	2	2	2	2	2	—
Инкубация при температуре 37 °С в течение 2 ч, затем при комнатной температуре 18–20 ч							

В каждую пробирку с разведенной сывороткой вносят по 1–2 капли антигена (1–2 млрд. микроорганизмов в 1 мл), энергично встряхивают и помешают на 2 ч в термостат при температуре 37 °С, после чего предварительно учитывают результаты реакции, начиная с контроля (сыворотки и антигена). Отсутствие агглютинации в контрольных пробирках и наличие взвешенных хлопьев в опытных пробирках свидетельствует о положительной реакции. Пробирки оставляют при комнатной температуре на 18–20 ч, после чего окончательно учитывают результаты. Интенсивность реакции выражается плюсами. При полной агглютинации (++++) жидкость совершенно прозрачная, а на дне пробирки осадок из хлопьев склеивающихся микроорганизмов. Чем меньше микроорганизмов агглютинировалось, тем мутнее жидкость и тем меньше хлопьевидный осадок на дне (+++, ++, +). При отрицательной реакции (–) осадка нет, взвесь остается равномерно мутной и по виду неотличима от содержимого пробирки с контролем антигена.

Применение РА для серологической диагностики инфекционных заболеваний — брюшного тифа и паратифов (реакция Видаля), сыпного тифа (реакция Вейгля), бруцеллеза (реакции Райта и Хаддлсона), туляремии и других заболеваний — основано на определении антител (агглютининов) в сыворотке больных.

Для проведения реакции берут у взрослого 3–5 мл крови из локтевой вены или пальца, мочки уха, а у маленьких детей — 1 мл из пятки. Отделяют сыворотку крови и разводят изотоническим раствором натрия хлорида от 1:50 или 1:100 до 1:800 или 1:1600. Более низкие концентрации антител обычно не используют потому, что в крови могут находиться нормальные антитела, которые способны в небольших разведениях вызывать реакцию агглютинации.

В качестве антигена в этой реакции используют диагностикумы — взвеси заведомо известных убитых и в отдельных случаях живых микроорганизмов. Диагностикумы из убитых организмов весьма устойчивы, не теряют своих свойств в течение нескольких лет и не представляют опасности заражения.

Техника проведения и учет результатов РА с сывороткой больного не отличаются от таковых при развернутой реакции агглютинации для определения вида микроорганизмов.

Реакция непрямой агглютинации (гемагглютинации) (РНГА)

При пассивной агглютинации растворимые антигены (белки, полисахариды и их комплексы микробного происхождения) соединяют с нерастворимым носителем, выполняющим исключительно индикаторную

функцию. Носителем могут быть эритроциты, частицы латекса, полиакриламида, бентонита и др. Связывание антигена с носителем происходит в результате адсорбции или химического соединения. Микробные полисахариды, например, можно адсорбировать на нативных эритроцитах без какой-либо их предварительной обработки. Различные белки (в том числе микробные ферменты) возможно присоединять к эритроцитам, только обработав их различными химическими веществами, обладающими дубильным действием: танином, хрома хлоридом, формальдегидом или бисдиазотированным бензидином. Такая обработка предотвращает разрушение красных кровяных клеток, которое может произойти при непосредственном контакте антигена с эритроцитами. Когда антиген, связанный с носителем, соответствует антителу, наблюдается агглютинация частиц носителя. Чувствительность прямой реакции агглютинации 0,02... 0,04 мкг азота белка антител/мл.

Методика. 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 изотоническом растворе натрия хлорида, осадок ресуспендируют в нем и добавляют 5-кратный объем 4 % формалина (рН 7,0), в котором оставляют эритроциты на 3–4 дня при температуре 4 °С. Затем эритроциты вновь осаждают и повторяют процедуру со свежим раствором формалина, после чего их отмывают 20-кратным объемом изотонического раствора натрия хлорида и доводят до 20 % концентрации. Фиксированные эритроциты хранят при температуре 4 °С.

Пригодность эритроцитов контролируют следующим образом: 1) после замораживания и оттаивания 5 % взвеси эритроцитов в дистиллированной воде гемолиза не наблюдается; 2) при смешивании 0,1 мл 0,2 % взвеси эритроцитов с изотоническим раствором натрия хлорида спонтанной агглютинации не наблюдается.

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

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

В качестве контроля используют формализированные эритроциты, сенсibilизированные другим антигеном, или формализированные несенсибилизированные эритроциты.

РНГА удобно ставить на микропанелях аппарата Такачи, используя для разведения материала микротитратор. Исследуемые сыворотки прогревают 30 мин при температуре 56 °С для удаления неспецифических гемагглютининов, готовят 2-кратные разведения на стабилизирующем растворе и по 1 капле каждого разведения вносят в две лунки U-образного микротитратора Такачи. В первый ряд добавляют по одной капле 1 % суспензии сенсibilизированных антигеном эритроцитов, во второй ряд — такое же количество контрольных эритроцитов. Пластины тщательно встряхивают и помещают на 30–40 мин в термостат при температуре 37 °С.

Результаты реакции учитывают по наличию гемагглютинации. Положительна она в том случае, если титр гемагглютинации с опытными эритроцитами по меньшей мере в 4 раза превышает титр гемагглютинации с контрольными эритроцитами. Обязателен контроль сенсibilизированных эритроцитов на отсутствие спонтанной агглютинации.

Реакция торможения непрямой гемагглютинации (РТНГА)

Реакцию проводят для обнаружения антигенов возбудителей в исследуемом материале, добавляя к нему иммунную сыворотку. При наличии гомологичного антигена происходит связывание антител, поэтому после добавления сенсibilизированных антигеном эритроцитов их агглютинации не происходит, что оценивается как положительный результат. Для большей чувствительности реакции специфическую иммунную сыворотку добавляют к исследуемому материалу в минимальном количестве (2 гемагглютинирующие единицы). Титр иммунной сыворотки определяют предварительно с помощью РНГА. За одну гемагглютинирующую единицу принимают предельное разведение сыворотки, которое вызывает склеивание эритроцитов.

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

При проведении этой реакции к контролю для РНГА добавляют контроль специфичности иммунной сыворотки, состоящий из

специфического антигена, иммунной сыворотки (2, 1, 0,5 гемагглютинирующей единицы) и взвеси сенсibilизированных эритроцитов.

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

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

Перед проведением реакции испытуемые сыворотки разводят 1:5–1:10 и инактивируют при температуре 56 °С в течение 30 мин. Для адсорбции гемагглютининов к сывороткам добавляют 50 % 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 температуре 37 °С или 1 ч при комнатной температуре, после чего эритроциты осаждают центрифугированием. Можно для осаждения эритроцитов оставить сыворотки в холодильнике до следующего дня.

При проведении опыта исследуемый материал разводят в 1 % растворе нормальной сыворотки кролика в объеме 0,025 мл в лунках панели микротитратора. Затем в каждую лунку добавляют по 2 нейтрализующих дозы антигена в объеме 0,025 мл. Пластины встряхивают и оставляют на 30 мин при температуре 37 °С или на 1 ч при комнатной температуре. Затем во все лунки вносят по 0,025 мл антительного эритроцитарного диагностикума. Пластины встряхивают и инкубируют 1,5–2 ч при комнатной температуре, после чего учитывают результаты реакции. Учет можно производить также и на следующий день. Титром исследуемой сыворотки считают ее максимальное разведение, в котором не происходит склеивания эритроцитов.

Опыт сопровождают следующими видами контроля:

1) стабильности сенсibilизированных эритроцитов (эритроциты + 1 % 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 антигена (2, 1 и 0,5 нейтрализующей дозы антигена + антительный эритроцитарный диагностикум).

Реакция обратной непрямой гемагглютинации (РОНГА) применяется для индикации бактериальных и вирусных антигенов в исследуемых материалах, а также для экспресс-диагностики ряда инфекций.

В отличие от РНГА при данной реакции эритроциты сенсибилизируют не антигеном, а антителами, агглютинация которых происходит при добавлении антигена.

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 происходит с помощью хлорида хрома. Для этого к 8 объемам дистиллированной воды добавляют 1 объем иммуноглобулинов, выделенных из иммунной сыворотки, 1 объем 50 % взвеси формализированных эритроцитов и 1 объем 0,1–0,2 % раствора хлорида хрома. Смесь оставляют на 10–15 мин при комнатной температуре, затем обрабатывают эритроциты, как при реакции пассивной гемагглютинации.

Специфичность антительного диагностикума проверяют в реакции торможения пассивной гемагглютинации гомологичным антигеном. Реакция должна тормозиться гомологичным антигеном не менее чем в 16 раз и не тормозиться гетерологичным. 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 % суспензию указанных органов на изотоническом растворе натрия хлорида, центрифугируют их в течение 30–60 мин при 10 000 об/мин и используют надосадочную жидкость в качестве антигена.

Методика. Готовят 2-кратные разведения исследуемого материала (антигена) на стабилизирующем растворе. Вносят по 1 капле каждого разведения антигена в 3 соседние лунки микропанели (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 контролем специфичности реакции. Смесь оставляют на 20 мин при комнатной температуре.

Во все лунки добавляют по 1 капле 1 % суспензии сенсибилизированных эритроцитов (эритроцитарный антительный диагностикум)

и тщательно встряхивают пластины. Результаты реакции учитывают через 30–40 мин. При наличии специфического антигена гемагглютинация отмечается в первом и третьем ряду (с гетерологичной сывороткой) и отсутствует во втором ряду, где антиген предварительно нейтрализован гомологичной сывороткой.

Реакцию сопровождают контролями сенсibilизированных эритроцитов на спонтанную агглютинацию.

Реакция торможения обратной непрямо́й гемагглютинации (РТОНГА) позволяет определить наличие антител в сыворотках людей и животных.

Методика. Сыворотки разводят в 10 раз изотоническим раствором натрия хлорида, прогревают 20 мин при температуре 65 °С для разрушения неспецифических ингибиторов, а затем готовят 2-кратные разведения сывороток на стабилизирующем растворе и рабочую дозу антигена, содержащую 4 агглютинирующие единицы. Вносят по 1 капле каждого разведения сыворотки в лунки микропанели и добавляют в них по 1 капле антигена, разведение которого соответствует рабочей дозе. После контакта компонентов смеси в течение 20 мин при комнатной температуре во все лунки вносят по 1 капле эритроцитарного антительного диагностикума и тщательно встряхивают. Через 1,5–2 ч инкубации при комнатной температуре по гемагглютинации учитывают результаты реакции. Титром сыворотки является ее наибольшее разведение, которое полностью тормозит реакцию гемагглютинации с четырьмя агглютинирующими единицами антигена.

Реакцию сопровождают контролями сенсibilизированных эритроцитов на спонтанную агглютинацию в присутствии: а) стабилизирующего раствора; б) нормального антигена (из материала, не содержащего вирус); в) исследуемой сыворотки. Преимущество реакции заключается в ее универсальности и возможности использования для выявления различных антигенов.

Оценка результатов гемагглютинации. Результаты РНГА, РОНГА и РТОНГА учитывают по степени агглютинации эритроцитов: (++++) — полная агглютинация; (++++) — почти 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 антигена или антитела положительный.

МЕТОДЫ, ОСНОВАННЫЕ НА ИСПОЛЬЗОВАНИИ МЕЧЕНЫХ РЕАГЕНТОВ

В настоящее время разработано много методов, предусматривающих применение меченых антител и антигенов. Чаще с этой целью используют радиоактивную или ферментную метку.

РАДИОИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

В радиоиммунологическом анализе специфичность реакции антиген — антитело сочетается с высокой чувствительностью, обеспечиваемой применением радиоактивной метки. В качестве метки чаще применяют радионуклиды йода (^{131}J или ^{125}J). Возможность проводить конкурентный анализ, а также анализ в жидкой или твердой фазе приводит к созданию большого числа различных методик.

Для определения антигенов используют классический радиоиммунологический анализ (РИА). В основу РИА положен принцип конкурентного взаимодействия определяемого немеченного антигена и известного количества меченого антигена с активными центрами антител. При этом происходит вытеснение меченого антигена из его комплекса с антителом вследствие последующего добавления больших концентраций немеченого антигена или гаптена той же специфичности. Реакция (при высоком разведении ингредиентов) подчиняется закону действующих масс: вытеснение меченого антигена пропорционально введенному количеству немеченого антигена или гаптена. Конкуренцию между определяемым и меченым антигенами можно оценить количественно с помощью радиометрии, предварительно определив образовавшиеся иммунные комплексы от несвязавшегося меченого антигена. Концентрацию определяемого антигена рассчитывают, исходя из сравнения соотношений свободного и связанного меченых реагентов с соответствующим стандартом.

Применяют также так называемые твердофазные методы. В качестве твердофазного носителя используют: поверхность планшетов с лунками, поверхность бус, поверхность пленок из полистирола или других полимерных синтетических материалов. Адсорбированные (иммобилизованные) антигены и антитела длительное время сохраняют способность вступать в серологические реакции. Существуют различные модификации проведения твердофазного РИА: конкурентный метод, обратный метод, непрямой метод.

РИА используют для определения антигенов вирусов гепатита, СПИДа, в лабораторной диагностике легионеллеза, дифтерии и других

инфекций. Этот метод весьма эффективен при диагностике аллергии. Аллерген, иммобилизованный на сорбенте, инкубируют с сывороткой больного, после чего добавляют радиоактивно меченные анти-IgE-антитела (рис. 17).

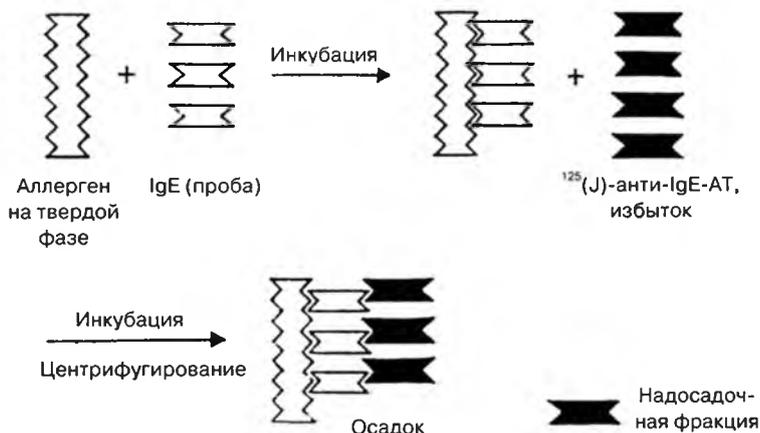


Рис. 17. Схема «сэндвич-метода»

МЕТОД ИММУННОГО ОКРАШИВАНИЯ ПОСЛЕ ПЕРЕНОСА НА НИТРОЦЕЛЛЮЛОЗНЫЕ МЕМБРАНЫ (ИММУНОБЛОТТИНГ)

Этот метод применяется для количественного определения белков и гликопротеинов, которые после электрофоретического разделения в полиакриламидном геле переносят на микропористую нитроцеллюлозную мембрану. Неспецифически связанные с мембраной антигены обрабатывают специфическими антителами, связывание которых проявляют антиглобулиновыми антителами, конъюгированными с радиоактивной или ферментной меткой (рис. 18).

Методика

- ✓ Лоскут нитроцеллюлозной мембраны, соответствующий по размерам пластинке геля, смачивают, погрузив целиком в буфер на 20 мин.
- ✓ Приготовленный к блоттингу гель также погружают в буфер для насыщения на 20 мин.
- ✓ На пористую прокладку накладывают 1–2 смоченных буфером листа фильтровальной бумаги.



Рис. 18. Схема последовательных этапов иммуноблоттинга

- ✓ Сверху на фильтровальную бумагу помещают пластинку геля.
- ✓ На гель накладывают нитроцеллюлозную мембрану, тщательно следя за тем, чтобы между гелем и мембраной не образовались пузырьки воздуха.
- ✓ Поверх мембраны накладывают два листа фильтровальной бумаги и завершают приготовление «сэндвича» еще одной пористой прокладкой.
- ✓ Кассету с «сэндвичем» погружают в камеру для блоттинга, наполненную буфером. При переносе из геля, содержащего ДСН, в буфере с рН 8,3 молекулы белков имеют отрицательный заряд и движутся к положительно заряженному аноду. Поэтому необходимо проследить, чтобы мембрана прилегала к гелю именно со стороны анода.
- ✓ Закончив перенос, «сэндвич» раскладывают, отделяя гель и мембрану друг от друга.
- ✓ Окрашивают гель кислотным (кумасси) ярко-синим, чтобы определить, насколько полно прошел перенос белков.

- ✓ Для выявления белков, перенесенных на мембрану, последнюю окрашивают 0,55 % раствором амидочерного в смеси метанол-уксусная кислота-вода (1:5:1) в течение 3 мин. Затем отмывают в воде и обесцвечивают смесью метанол-уксусная кислота-вода (9:2:100).
- ✓ Прежде чем инкубировать мембрану с препаратами специфических антител, необходимо заблокировать все ее участки неспецифической адсорбции белка. Для этого нитроцеллюлозную мембрану инкубируют на качалке в течение 2 ч при комнатной температуре в буфере, содержащем блокирующий раствор. Для удаления избытка постороннего белка мембрану дважды ополаскивают в буфере.
- ✓ Антитела растворяют в буфере.
- ✓ Полоски мембраны помещают между двумя листками термостойкой пленки и запаивают с трех сторон. Наполняют сделанный таким образом чехол раствором антител, удаляют пузырьки воздуха и запаивают сверху.
- ✓ Полоски мембраны инкубируют в растворе антител в течение 1–2 ч при комнатной температуре. После инкубации полоски мембраны в течение 15–30 мин промывают в 3–5 сменах буферного раствора.
- ✓ После отмывания полоски мембраны инкубируют в растворе биотинированных антител в течение 1 ч при комнатной температуре. Если используют антиглобулины, меченные ^{125}J , инкубацию рекомендуется продлить до 6–16 ч.
- ✓ Полоски мембраны отмывают так же, как после инкубации с первыми антителами. Если вторые антитела были помечены ^{125}J , то полоски мембраны после отмывания высушивают. Высушенную мембрану помещают на фильтровальную бумагу, накрывают рентгеновской пленкой и экспонируют.
- ✓ Для выявления антигенов, связавших через первые антитела вторые биотинированные антитела, полоски мембраны инкубируют с биотинированным ферментом (пероксидаза хрена) в присутствии авидина или стрептавидина, через молекулы которых фермент присоединяется к антителам. Инкубируют в течение 1 ч при 4 °С.
- ✓ После инкубации полоски мембраны дважды отмывают в буфере.
- ✓ На полоски мембраны наносят раствор диаминобензидина с 0,33 % H_2O_2 .
- ✓ Цветная реакция развивается в пределах 1–15 мин после добавления субстрата. Для остановки реакции полоски мембраны дважды отмывают в дистиллированной воде и высушивают.
- ✓ Полоски мембраны следует защищать от света, иначе возможно их выцветание.

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЕ МЕТОДЫ

В основу метода положена конъюгация антитела или гаптена с ферментом, которая не приводит к утрате антителом или гаптенем специфичности, а ферментом — каталитической активности. Однако в составе комплекса антиген — антитело конъюгаты гаптен-фермент или антитело-фермент теряют свою каталитическую активность.

Соединение молекул антитела с ферментом осуществляется с помощью преимущественно глутаральдегида — бифункционального реагента, взаимодействующего с Е-аминогруппами белковых молекул. В качестве фермента успешно применяют в зависимости от модификации метода либо пероксидазу, β -галактозидазу, щелочную и кислую фосфотазы (реже ацетилхолин, глюкоамилазу, глюкозооксидазу), либо лизоцим, глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназу и малатдегидрогеназу. Используемый для маркирования антител фермент не должен присутствовать в исследуемых, содержащих антиген клетках, так как эндогенная ферментативная активность недопустима.

Известно много вариантов постановки ИФА. Различают гомогенный и гетерогенный вариант иммуноферментного анализа. В основе гомогенного ИФА, применяемого для определения низкомолекулярных субстанций (гаптены), лежит ингибирование активности фермента при соединении его с гаптенем (активность фермента восстанавливается в результате реакции АГ—АТ) либо, наоборот, потеря активности маркерного фермента в результате реакции АГ—АТ. Поэтому удаление свободного АГ из смеси, содержащей АГ в связанном виде, в составе иммунных комплексов невозможно. В противоположность этому при гетерогенном ИФА АГ или АТ фиксируется на твердой фазе (как правило, пластик), а непрореагировавшие компоненты реакции удаляются многократным отмыванием.

В ИФА различают методы конкурентного и неконкурентного анализа.

Конкурентный метод твердофазного ИФА может быть проведен при необходимости количественного определения антигена, который может быть получен в чистом виде (рис. 19). Первым этапом в этом случае будет присоединение антитела к носителю за счет химической реакции или физико-химических взаимодействий. Избыток антитела удаляют отмыванием и, внося строго определенное количество меченого антигена и различные количества немеченого антигена, строят калибровочную кривую. По окончании реакции иммунные комплексы АГ—АТ оказываются присоединенными к твердой фазе за счет антитела, и избыток антигена удаляют отмывкой, добавляют субстрат для

фермента, останавливают реакцию по истечении определенного времени и проводят колориметрическое определение продуктов ферментативной реакции.

В другом варианте конкурентного ИФА с твердой фазой первично связывается антиген. После отмывки добавляют меченные энзимом антитела и стандартный или исследуемый антиген. Связывание меченых антител конкурентно тормозится растворенным антигеном. Количество продуктов ферментативной реакции обратно пропорционально концентрации растворенного антигена (рис. 20).

К числу неконкурентных методов относится метод двойных антител или, как его иногда называют, «сэндвич-метод» (рис. 21).

Фиксированные на твердой фазе антитела инкубируют со стандартным или анализируемым антигеном. После отмывания добавляют избыток меченых антител (специфичных к этому же антигену), несвязавшиеся антитела отмывают. Продукт ферментативной реакции образуется в количествах, пропорциональных количеству связанного антигена.



Рис. 19. Схема конкурентного ИФА, антитела сорбированы на твердой фазе, антиген мечен ферментом (1 — АТ, связывание с твердой фазой; 2 — отмывка; 3 — инкубация с меченым ферментом АГ в присутствии (а) и в отсутствие (б) исследуемой пробы; 4 — отмывка; 5 — инкубация с субстратом (светлые кружочки) и измерение количества продуктов реакции (темные кружочки))



Рис. 20. Схема конкурентного ИФА, антиген сорбирован на твердой фазе, антитела мечены ферментом (1 — связывание АГ с твердой фазой; 2 — отмывка; 3 — инкубация меченных ферментов АТ в присутствии (а) или в отсутствие (б) исследуемой пробы; 4 — отмывка; 5 — инкубация с субстратом (светлые кружочки) и измерение количества продуктов реакции (темные кружочки))

Довольно часто используют немеченные вторые антитела; о реакции в данном случае судят по связыванию энзим-меченных антител, специфичных по отношению к IgG (вторые антитела). В любом случае первые и вторые антитела должны принадлежать животным разных видов. Для иммуноферментного определения антител часто используется непря- мой, неконкурентный ИФА (рис. 22).

Антиген фиксируют на твердой фазе, после отмывания проводят инкубацию с раствором антител. Если произошло специфическое связыва- ние антител, их можно количественно определить при помощи меченной ферментом антиглобулиновой сыворотки, ферментативной реакции.

Кроме описанных, известны следующие модификации твердофазно- го ИФА. Вместо совместной инкубации меченых и немеченных антиге- нов со связанными антителами можно непосредственно инкубировать

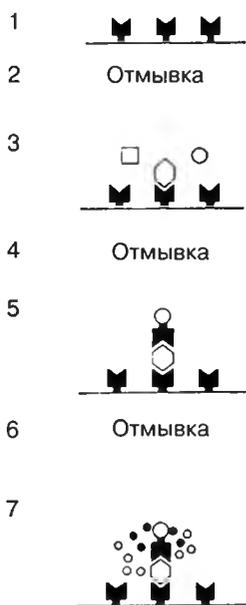


Рис. 21. Схема «сэндвич-ИФА» (метод двойных антител для определения антигена)

(1 — АТ, связывание с твердой фазой; 2 — отмывка; 3 — инкубация с пробой, содержащей АГ; 4 — отмывка; 5 — инкубация с конъюгатом АТ-фермент; 6 — отмывка; 7 — инкубация с субстратом (светлые кружочки) и измерение количества продукта реакции (темные кружочки))



Рис. 22. Схема непрямого ИФА для определения антител при помощи фермент-меченного антиглобулина

(1 — связывание АГ с твердой фазой; 2 — отмывка; 3 — инкубация с пробой, содержащей АТ; 4 — отмывка; 5 — инкубация с конъюгатом антиглобулин-фермент; 6 — отмывка; 7 — инкубация с субстратом (светлые кружочки) и измерение количества продукта реакции (темные кружочки))

только стандартный или анализируемый антиген, а затем после отмывания проводить инкубацию с избытком энзимомеченного антигена, который взаимодействует с «незанятыми» антителами.

Кроме того, стандартный или анализируемый антиген можно инкубировать с избытком энзимомеченных антител и по окончании иммунной реакции добавлять эту смесь к антигену, фиксированному на твердой фазе. Определяют количество свободных энзимомеченных антител, связанных антигеном на твердой фазе. В обоих случаях концентрация продукта ферментативной реакции пропорциональна концентрации анализируемого антигена. Результаты учитывают фотометрически.

В настоящее время выпускается большое количество разнообразных иммуоферментных диагностических наборов как для определения антител в сыворотке или других биологических жидкостях, так и для определения антигенов. В качестве последних могут выступать возбудители различных заболеваний (вирусы коксаки В, гепатита А и В, СПИДа, простого герпеса, краснухи; бруцеллы, холерный вибрион, сальмонеллы, трепонемы, кишечная палочка), а также различные белки, определение содержания которых в крови или секретах представляет диагностический интерес (аутоантитела, факторы неспецифической защиты, гормоны, цитокины, белки острой фазы и др.).

Методика. Для проведения ИФА необходимы следующие буферные растворы.

1. *Буфер присоединения* — 0,05 М натриево-карбонатно-бикарбонатный буфер (КББ) (рН 9,5–9,7) для сорбции антигена или антител на твердый носитель. 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.

2. *Буфер инкубации* — фосфатно-солевой раствор (рН 7,3–7,5), который используют для разведения компонентов, вносимых в реакцию после сорбции первого компонента на носитель. 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 твин-20. Объем буфера доводят до 5 л дистиллированной водой, хранят при температуре 20–25 °С.

3. *Буфер для отмывки* — изотонический раствор натрия хлорида, содержащий 0,05 % твин-20. В качестве отмывочного буфера можно также использовать фосфатно-солевой раствор с 0,05 % твин-20. Субстратом для пероксидазы служит ортофенилендиамин или 5-аминосалициловая кислота.

Ортофенилендиамин готовят ex tempore следующим образом: 10 мг ортофенилендиамина, 6,1 мл 0,1 М лимонной кислоты, 6,4 мл 0,2 М

Na₂HPO₄·12H₂O (для полного растворения подогреть на водяной бане), 12,5 мл дистиллированной воды, 0,35 мл 3 % H₂O₂.

Растворяют 80 мг 5-аминосалициловой кислоты в 100 мл дистиллированной воды, доводят рН раствора до 6,0 ex tempore с помощью 1 М NaOH. Перед использованием на каждые 9 мл раствора добавляют 1 мл 0,05 % H₂O₂.

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

Методика реакции. Первый этап ИФА — сорбция соответствующего разведения антител или антигена (в концентрации 10–20 мкг/мл) на карбонатно-бикарбонатном буфере в объеме 0,2 мл на твердую фазу в течение 1–2 ч при температуре 37 °С и 10–12 ч при температуре 4 °С. Затем отмывают лунки (для удаления несорбированного на носителе антитела или антигена) водопроводной водой, отмывочным буфером с 0,05 % твин-20 в течение 5 мин (2 раза) при комнатной температуре. После этого вносят в каждую лунку по 0,2 мл 1 % раствора бычьего сывороточного альбумина на КББ и инкубируют в течение 1 ч при температуре 37 °С для закрытия участков поверхности лунок, оставшихся свободными после сорбции первого компонента реакции на твердый носитель. Лунку отмывают от несвязанного бычьего сывороточного альбумина и вносят исследуемый материал (антиген или антитела) по 0,2 мл в разведениях на фосфатно-солевом растворе (рН 7,2) с 0,05 % твин-20. Каждое разведение материала вводят в две лунки и помещают в термостат на 1–3 ч при температуре 37 °С. Отмывают непрореагировавшие в иммунной реакции антигены или антитела и вносят по 0,2 мл конъюгированных антител против исследуемого антигена или антител в рабочем разведении на фосфатно-солевом растворе с 0,05 % твин-20. Затем их инкубируют в течение 2 ч при температуре 37 °С. Несвязанный конъюгат отмывают с помощью буфера 3 раза по 10 мин.

В лунку вносят 0,1 мл раствора субстрата (хромогена) и выдерживают 30 мин в темноте при комнатной температуре. В процессе инкубации в присутствии пероксидазы ортофенилендиамин окрашивается в желтый цвет, а аминсалициловая кислота — в коричневый.

Для остановки реакции расщепления субстрата в лунку добавляют по 0,1 мл 1 М NH₂SO₄ (или 1 М NaOH).

Контроль реакции — исследуемые антиген или антитела заменяют гомологичным компонентом реакции.

Контроль конъюгата — 0,2 мл 1 % бычьего сывороточного альбумина на КББ + 0,2 мл конъюгированных антител в рабочем разведении.

Результаты реакции учитывают визуально или инструментально. При визуальном учете выявляют то наибольшее разведение исследуемого материала, в котором окраска интенсивнее, чем в контроле (бычьим сывороточным альбумином). При учете результатов реакции с помощью спектрофотометра положительным считается то наибольшее разведение исследуемого материала, где уровень экстинции превышает не менее чем в 2 раза уровень экстинции соответствующего разведения гетерологичного компонента реакции.

ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ МЕТОДЫ

В основу флуоресцентного метода положено такое взаимодействие антигена с антителом, при котором один из компонентов реакции обладает способностью к вторичной флуоресценции благодаря предварительному ковалентному соединению с флуоресцентным красителем. Образовавшиеся таким образом иммунные комплексы становятся хорошо видимыми, ярко светящимися структурами на темном фоне под флуоресцентным микроскопом. В качестве флуоресцентных красителей используют флуоресценизотиоцианат, родамин, В-изотиоцианат, мессамин-родамин В200-сульфохлорид и др., имеющие реакционно-способные группы (сульфохлорид, изотиоцианат и др.). Эти группы соединяют со свободными аминогруппами молекул антител, которые не теряют при обработке флуорохромами специфического сродства к соответствующему антигену.

Известны различные варианты постановки иммунофлуоресцентного анализа (рис. 23).

Прямая РИФ — предполагает применение иммунофлуоресцирующих сывороток против каждого изучаемого антигена.

Непрямая РИФ — основана на использовании двух различных антисывороток. Вначале применяют немеченные антитела против изучаемого антигена, а на втором этапе реакции образовавшийся комплекс антиген — антитело обрабатывают меченой антисывороткой, содержащей антитела против гамма-глобулинов того вида животных, на которых были получены антисыворотки, использованные на первом этапе реакции (антивидовая сыворотка).

Антикомплементарная РИФ — предполагает применение меченых антител против комплемента. Используется в тех случаях, когда комплекс антиген — антитело способен фиксировать комплемент. Добавление к такой системе антикомплементарной меченой сыворотки

позволяет выявлять антиген по специфическому свечению в люминесцентном микроскопе.

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

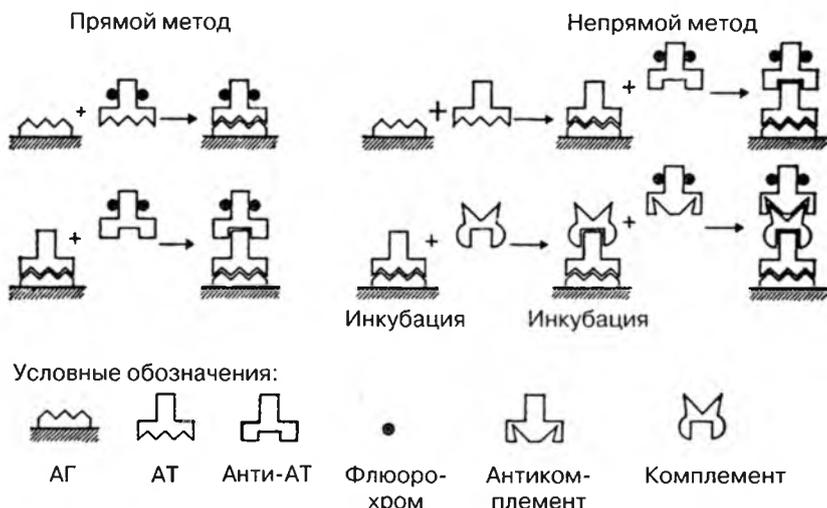


Рис. 23. Принцип иммунофлуоресцентного анализа

РИФ может быть использована для изучения различных микробных антигенов в препаратах из материала больных, срезов тканей, инфицированных культур клеток и др., а также для определения количества антител в иммунной сыворотке. Важнейшей областью применения непрямого иммунофлуоресцентного анализа является обнаружение аутоантител в сыворотках пациентов с аутоиммунными заболеваниями.

Методика. Исследуемый материал помещают на стекло и фиксируют в ацетоне 10 мин при комнатной температуре, после чего высушивают в течение 20 мин при температуре 37 °С. Дальнейшая обработка препаратов зависит от применяемого варианта РИФ.

При прямой РИФ препарат окрашивают специфической меченой антисывороткой во влажной камере 30 мин при температуре 25 °С, после чего промывают буферным солевым раствором (рН 7,2) 10 мин при температуре 25 °С.

При непрямой РИФ препарат вначале обрабатывают немеченой специфической антисывороткой во влажной камере 30 мин при температуре

25 °С, после чего промывают буферным солевым раствором (рН 7,2) 10 мин при температуре 25 °С. Далее препарат окрашивают антивидовой меченой сывороткой во влажной камере 30 мин при температуре 25 °С и промывают буферным солевым раствором (рН 7,2).

При антикомплементарной РИФ препарат вначале обрабатывают немеченой специфической антисывороткой и компонентом морской свинки (1:10) во влажной камере в течение 30 мин при температуре 25 °С, после чего промывают и окрашивают антикомплементарной (против глобулинов морской свинки) меченой сывороткой во влажной камере 30 мин при температуре 25 °С и промывают буферным солевым раствором (рН 7,2).

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

Для исключения ложноположительных результатов реакцию сопровождают рядом контролей, среди которых особое значение имеет контроль с гетерологичным антигеном. Для исключения аутофлуоресценции и неспецифического связывания меченых антител с поверхностью клеток при изучении инфицированных культур клеток обязательно используют контроль с нормальной, неинфицированной культурой. Для подавления аутофлуоресценции препаратов можно использовать бычий альбумин, меченный сульфарадамином.

ПРИМЕНЕНИЕ ДВОЙНОЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МЕТКИ

Для одновременного анализа различных антигенов в одной и той же ткани, например, в клетках одного типа, применяют антисыворотки, меченные различными флуорохромами (ФИТЦ, ТРИТЦ).

Иммуноферритиновый (иммуно-электронно-микроскопический) метод выявления антигенов основан на применении антител, меченных ферритином. Ферритин представляет собой железосодержащий белок с молекулярной массой 750 кДа, где содержание железа может достигать до 23 %. Ферритин хорошо выявляется в электронном микроскопе и поэтому используется как маркер при иммуно-электронной микроскопии.

РЕАКЦИЯ ЛИЗИСА

Реакцией лизиса называется растворение корпускулярного антигена при взаимодействии со специфическим антителом, адсорбирующим на своей поверхности комплемент. Важно подчеркнуть тот факт, что в связывании антигена и комплемента участвуют различные домены молекулы антитела: антиген связывается с N-концевыми участками тяжелых цепей, а комплемент, наоборот, — с участками, расположенными в C-концевых областях (Fc) тяжелых цепей молекул иммуноглобулинов.

Если иммуноглобулины при содействии комплемента разрушают эритроциты, из последних выходит гемоглобин и реагирующая смесь из мутной взвеси эритроцитов преобразуется в прозрачную красную жидкость, так называемую «лаковую кровь». Реакцию в данном случае называют реакцией гемолиза. Это очень чувствительная реакция, способная выявить 0,0002 мг азота белка антител в 1 мл.

Принцип гемолиза положен в основу метода локального гемолиза в геле, предложенного Н.К. Эрне и А.А. Нордин (1963) для выявления клеток, образующих антитела. В основе метода лежит контакт антигена (эритроцитов барана) в гелевой среде с лимфоидными клетками иммунизированных животных. Антитела (гемолизины) от синтезирующих их клеток диффундируют в гель и связываются с эритроцитами. Последующее добавление комплемента обуславливает лизис эритроцитов вокруг антителопродуцирующих клеток, образуя просветы (зоны гемолиза) на розовом фоне. В центре каждой зоны находится клетка, образующая антитела к эритроцитам. Сосчитав число зон, можно определить число этих клеток. Зная общее число внесенных в гель лимфоидных клеток, можно рассчитать число клеток, образующих антитела, на 10^6 или 10^7 клеток исследуемого органа

Бактериолиз — лизис бактерий в результате разрушения оболочки бактериальной клетки иммуноглобулинами также при содействии комплемента.

Методика. Иммунную сыворотку прогревают в течение 30 мин при температуре 56°C для инактивации в ней комплемента. Взвесь микроорганизмов готовят из суточной культуры (1 млрд. микроорганизмов в 1 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 — контроль инактивации комплемента в иммунной сыворотке — комплемент не добавляют. В третьей пробирке — контроль

комплемента на отсутствие лизинов — иммунную сыворотку заменяют изотоническим раствором натрия хлорида (табл. 20).

Таблица 20

Схема проведения реакции лизиса

Ингредиент, мл	Номер пробирки		
	1	2	3
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
Изотонический раствор натрия хлорида	1,3	1,4	1,8

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

РЕАКЦИЯ СВЯЗЫВАНИЯ КОМПЛЕМЕНТА

Реакция связывания комплемента (РСК) — это метод серологического анализа, который по своей чувствительности сравним с методами преципитации, агглютинации и нейтрализации. РСК представляет собой метод, где используются две системы антиген — антитело:

первая — специфическая;

вторая — индикаторная (гемолитическая).

Для проведения РСК необходимы 5 компонентов: диагностируемый антиген, диагностические антитела, антиген-индикатор (эритроциты барана), индикаторные антитела (кроличьи гемолизины), комплемент.

Специфическое взаимодействие антигена и антитела сопровождается связыванием комплемента. Образовавшийся комплекс визуально не проявляется. В качестве индикатора используется гемолитическая система. Гемолитическая сыворотка сенсибилизирует эритроциты

к действию комплемента, в присутствии которого происходит лизис эритроцитов (гемолиз). Если гемолиза нет, значит, комплемент связан первой системой, и, следовательно, антиген в ней соответствует анти телу — положительный ответ. Если антитело не соответствует антигену, комплекс не образуется и комплемент, оставаясь свободным, соединяется со второй системой, вызывая гемолиз — реакция отрицательная.

Для постановки РСК все ингредиенты реакции подготавливают и титруют до проведения основного опыта.

1. Сыворотку (больного или диагностическую) накануне проведения реакции прогревают на водяной бане при температуре 56 °С в течение 30 мин для инактивации ее собственного комплемента. Некоторые сыворотки, особенно иммунизированных животных, обладают антикомплемментарными свойствами, т. е. способностью связывать комплемент в отсутствие гомологичного антигена. Антикомплемментарность устраняют путем обработки их углекислым газом, прогреванием при температуре 57–58 °С, однократным замораживанием при температуре –20 °С или –70 °С и удалением осадка центрифугированием, добавлением к сыворотке комплемента в объеме 1:10 сыворотки и прогреванием ее после инкубации на холоде в течение 18–20 ч. Для предотвращения антикомплемментарности 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 антигены из микроорганизмов получают производственным путем. Антикомплемментарность антигенов устраняют при помощи таких методов, как термолиз (многократное замораживание и оттаивание), обработка жирорастворителями (эфиром, хлороформом, ацетоном), спиртами (метанолом, этанолом) и т. д.

3. В качестве комплемента используют сыворотку морской свинки, взятую непосредственно перед опытом; можно также применять сухой комплемент. Чтобы получить основной раствор для последующего титрования, комплемент разводят 1:10 изотоническим раствором натрия хлорида.

4. Эритроциты барана используют в виде 3 % взвеси на изотоническом растворе натрия хлорида. 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 3 раза изотоническим раствором натрия хлорида, доливая его

к осадку эритроцитов до первоначального объема крови. Эритроциты можно хранить 5–6 дней при температуре 4–6 °С. Срок хранения эритроцитов увеличивается при их консервировании с формалином.

5. Гемолитическую сыворотку для РСК получают следующим образом: иммунизируют кроликов путем введения им в вену уха 50 % взвеси отмытых 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 температуре 56 °С. Для предупреждения бактериального пророста в гемолитическую сыворотку добавляют консервант (мертиолят 1:10 000 или 1 % борную кислоту).

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

Титрование гемолитической сыворотки. Сыворотку титруют путем соединения 0,5 мл ее (в разведениях 1:600, 1:1200, 1:1600, 1:3200 и т. д.) с 0,5 мл 3 % взвеси эритроцитов и 0,5 мл свежего комплемента в разведении 1:10. Объем смеси для реакции в контрольных пробирках доводят до 1,5 мл, добавляя изотонический раствор натрия хлорида. Результаты реакции учитывают через 1 ч инкубации при температуре 37 °С (табл. 21). Титром гемолитической сыворотки считают ее наибольшее разведение, вызывающее полный гемолиз. Хранят сыворотку в лиофилизированном виде.

Таблица 21

Схема титрования гемолитической сыворотки

Ингредиент	Номер пробирки			
	1 Опыт	2 Контроль комплемента	3 Контроль гемолитической сыворотки	4 Контроль эритроцитов
Гемолитическая сыворотка в разведениях 1:600, 1:1200, 1:1600 и т. д.	0,5	0,5	—	—
Взвесь эритроцитов барана	0,5	0,5	0,5	0,5
Комплемент в разведении 1:10	0,5	—	0,5	—
Изотонический раствор натрия хлорида	—	0,5	0,5	1,0
Термостат при температуре 37 °С в течение 1 ч				

Титрование комплемента. Перед проведением опыта основной раствор комплемента (1:10) разливают в ряд пробирок от 0,05 до 0,5 мл и добавляют в каждую изотонический раствор натрия хлорида, доводя объем жидкости до 1,5 мл. Пробирки помещают в термостат при температуре 37 °С на 45 мин, затем добавляют в них гемолитическую систему и выдерживают в термостате в течение 30 мин, после чего определяют титр комплемента (табл. 22).

Для опыта берут рабочую дозу комплемента (содержащуюся в объеме 0,5 мл), которая выше титра на 20–30 %.

Таблица 22

Схема титрования комплемента

Ингредиент, мл	Номер пробирки											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
											Контроль	
Комплемент в разведении 1:10	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5	0,5	–
Изотонический раствор натрия хлорида	1,45	1,4	1,35	1,3	1,25	1,2	1,15	1,1	1,05	1,0	1,5	1,5
Термостат при температуре 37 °С в течение 45 мин												
Гемолитическая система	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,5	1,0
Термостат при температуре 37 °С в течение 30 мин												

Титрование антигена. Антигены, используемые для РСК, могут адсорбировать какое-то количество комплемента, т. е. обладать антикомплементарными свойствами. Поэтому перед проведением опыта антигены титруют в присутствии рабочей дозы комплемента. В меньшей степени антикомплементарные свойства выражены у специфических антигенов, выпускаемых промышленным путем. Их титр определяют не перед каждым опытом, а один раз в месяц, учитывая возможность его уменьшения в процессе хранения.

Для определения титра антигена его разливают в ряд пробирок в уменьшающемся количестве от 0,5 до 0,05 мл, доводя объем в них до 1 мл путем добавления раствора натрия хлорида. Затем в каждую пробирку добавляют 0,5 мл рабочей дозы комплемента и помещают их в термостат на 1 ч при температуре 37 °С. После этого во все пробирки добавляют по 1 мл гемолитической системы, снова выдерживают их в течение 1 ч в термостате и учитывают результаты реакции (табл. 23).

Таблица 23

Схема титрования антигена

Ингредиент, мл	Номер пробирки					
	1	2	3	4	5	6
Антиген в основном разведении	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0,05
Изотонический раствор натрия хлорида	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	0,95
Комплемент (рабочая доза)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Термостат при температуре 37 °С в течение 1 ч						
Гемолитическая система	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Термостат при температуре 37 °С в течение 1 ч						

Титром антигена считают наименьшее его количество, при котором наступает полный гемолиз. Для РСК используют рабочую дозу антигена, составляющую примерно 1/2–1/3 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. В первую пробирку вносят сыворотку в соответствующем разведении, антиген и комплемент, во вторую — сыворотку в соответствующем разведении, комплемент и изотонический раствор натрия хлорида (контроль сыворотки), в третью — антиген, комплемент и изотонический раствор натрия хлорида (контроль антигена). Одновременно готовят гемолитическую систему, смешивая по 2 мл гемолитической сыворотки в тройном титре (по отношению к указанному в инструкции) и 3 % взвеси эритроцитов барана (по отношению к исходному объему крови). Пробирки выдерживают в термостате при температуре 37 °С в течение 1 ч, затем в первые 3 пробирки (первая система) добавляют по 1 мл гемолитической системы

(вторая система). После тщательного смешивания ингредиентов пробирки вновь помещают в термостат на 1 ч при температуре 37 °С (табл. 24).

Таблица 24

Схема проведения основного опыта РСК

Но- мер сис- темы	Ингредиент, мл	Номер пробирки		
		1 Опыт	2 Контроль сыворотки	3 Контроль антигена
1	Исследуемая сыворотка в разведениях 1:5, 1:10, 1:20, 1:40 и т. д.	0,5	0,5	—
	Антиген (рабочая доза)	0,5	—	0,5
	Комплемент (рабочая доза)	0,5	0,5	0,5
	Изотонический раствор натрия хлорида	—	0,5	0,5
Термостат при температуре 37 °С в течение 1 ч				
2	Гемолитическая система (гемолитическая сыворотка в тройном титре + 3 % взвесь эритроцитов барана)	1,0	1,0	1,0
Термостат при температуре 37 °С в течение 1 ч				

Результаты реакции учитывают предварительно — после извлечения пробирок из термостата и окончательно — после пребывания их в течение 15–18 ч в холодильнике или при комнатной температуре.

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»).

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. Для капельной РСК берут 1 каплю сыворотки + 1 каплю антигена + 1 каплю комплемента + 2 капли гемолитической системы.

Реакция связывания комплемента нашла самое широкое распространение в микробиологической и серологической диагностике.

С помощью РСК обнаруживают комплементсвязывающие антитела в сыворотке крови больных сифилисом, сапом, хронической гонореей, риккетсиозами, вирусными заболеваниями и др.

Особый интерес РСК представляет для клинической иммунологии. Реакцию применяют для выделения различных субпопуляций лимфоцитов, для выявления антигенов HLA на тромбоцитах, перевиваемых лимфобластах, фибробластах, опухолевых клетках и тромбоцитоспецифических антигенов, а также соответствующих антител.

РЕАКЦИЯ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ

В основе этой реакции лежит способность специфических антител нейтрализовать токсическое действие антигена.

Роль антигена может выполнять микробный экзотоксин. В этом случае обезвреживание токсина в ходе физико-химической реакции нейтрализации происходит за счет связывания его свободных аминок групп, что приводит к потере токсичности.

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.

Если антиген — вирусный материал, антитела нейтрализуют инфекционное и цитопатическое действие вирусов в чувствительных к вирусу живых системах.

Реакция нейтрализации инфекционного и цитопатического действия вирусов воспроизводится в чувствительных к вирусу живых системах. Из материала, содержащего вирус, готовят серийные разведения и добавляют к ним специфическую сыворотку в разведении в соответствии с титром, указанным в инструкции. Смесь инкубируют 30–60 мин при температуре 37 °С, после чего заражают ею культуру ткани, куриные эмбрионы или лабораторных животных. Контролем служит чувствительная система, зараженная вирусом, обработанным нормальной сывороткой.

Положительной считают РН при отсутствии ЦПД в культуре клеток, изменений в куриных эмбрионах, а также заболевания или гибели животных. На основании результатов РН определяют индекс нейтрализации — отношение титра вируса 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). РН позволяет определить видовую и типовую принадлежность вируса.

ФЕНОМЕН ИММУНОКЛЕТОЧНОГО ПРИЛИПАНИЯ

Метод, разработанный Г.Дж.В. Носселом с соавт. (1961), основан на способности бактерий прилипать к поверхности малых лимфоцитов — клеток, вырабатывающих специфические антитела после иммунизации животных соответствующими микроорганизмами, и получил название иммуноклеточного прилипания, или скучивания. Феномен иммуноклеточного прилипания был использован для дальнейшего совершенствования методов выявления клеток, образующих антитела к антигенам микробного происхождения. В частности, заслуживает внимания модификация метода с использованием в качестве антигена эритроцитов, нагруженных различными микробными гаптенами. Такие эритроциты приобретают способность специфически прикрепляться в опытах *in vitro* к поверхности изолированных лимфоидных клеток животного, иммунизированного тем микроорганизмом, из которого выделен гаптен. При этом под микроскопом удается наблюдать так называемые розетки, каждая из которых представляет собой лимфоидную антителопродуцирующую клетку, окруженную прочно приставшими к ней эритроцитами. Просмотрев в общей сложности 3000...4000 лимфоидных клеток в нескольких препаратах, определяют процент розеткообразующих клеток, адсорбировавших не менее двух эритроцитов,— процент адсорбции. Описанный метод был разработан Я.С. Шварцманом и А.В. Исполатовой (1966) и получил название непрямой гемадсорбции по аналогии с реакцией непрямой гемагглютинации. Реакция непрямой гемадсорбции по чувствительности не уступает реакции прилипания бактерий и превосходит ее по специфичности, особенно в тех случаях, когда изучают образование антител к антигенам неподвижных бактерий.

ЗАДАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ЗАНЯТИЮ

1. Постановка развернутой реакции агглютинации.
2. Постановка реакции кольцепреципитации.
3. Демонстрация результатов реакции гемолиза.
4. Демонстрация результатов иммуноферментного анализа.
5. Оформление протокола занятия.

Тема: ИММУНОТРОПНЫЕ ПРЕПАРАТЫ

Цель: Знать принципы технологии, применения и хранения иммунных препаратов; освоить методы приготовления убитых аутовакцин, антителообразующих гибридов; уметь определять титр сыворотки по Рамону.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Вакцины, их назначение, виды вакцин.
2. Способы получения живых ослабленных вакцин. Понятие об аттенуации. Преимущества и недостатки живых вакцин. Примеры.
3. Способы получения убитых вакцин. Преимущества. Примеры. Понятие об аутовакцинах.
4. Принципы получения химических вакцин. Преимущества. Примеры.
5. Анатоксины: получение, примеры.
6. Методы генной инженерии в разработке новых вакцин. Искусственные вакцины.
7. Аллергены, их получение и использование.
8. Иммунные сыворотки, классификация, назначение.
9. Этапы получения антитоксических сывороток в производственных условиях (иммунизация и гипериммунизация лошадей, получение нативной сыворотки, очистка и концентрация, титрование и контроль).
10. Получение иммуноглобулинов.
11. Моноклональные антитела, применение. Использование гибридных технологий в получении моноклональных антител.
12. Бактериофаги: получение, применение.
13. Система производства и контроля бактериальных и вирусных препаратов.
14. Методы и условия введения бактериальных и вирусных препаратов.
15. Методика введения гетерогенных (из крови животных) сывороток и иммуноглобулинов с предварительной внутрикожной пробой.
16. Реактогенность бактериальных и вирусных препаратов. Факторы, обуславливающие реактогенность.

17. Оценка и учет послепрививочных реакций. Основные клинические формы поствакцинальных осложнений.

18. Иммунотропные препараты: классификация, применение.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дикий И.Л., Холуляк И.Ю., Шевелева Н.Е., Стегний М.Ю. Микробиология.— Х.: Прапор: Изд-во УкрФА. 1999.— С. 183—212.
2. Елинов Н.П., Заикина Н.А., Соколова И.П. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии.— М.: Медицина, 1988.— С. 115—123.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА, ОСНОВЫ ПРОИЗВОДСТВА И ПРИМЕНЕНИЯ БАКТЕРИЙНЫХ И ВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Бактерийные и вирусные препараты, применяемые в практике здравоохранения, в соответствии с целевым назначением и принципами изготовления можно разделить на следующие группы: вакцины, анатоксины, сыворотки, иммуноглобулины, моноклональные антитела, бактериофаги и аллергены.

Общей характерной особенностью всех видов бактериальных и вирусных препаратов, используемых для профилактики, лечения и диагностики инфекционных заболеваний, является специфичность их действия, что отличает эти препараты от химиопрепаратов и антибиотиков.

Вакцины. Большую группу составляют наиболее широко применяемые в практике профилактические препараты, предназначенные для создания активного иммунитета против определенных инфекционных заболеваний. В нее входят различного типа вакцинные препараты. В настоящее время в практике здравоохранения с целью профилактики инфекционных заболеваний применяют следующие вакцинные препараты: 1) вакцины живые, изготавливаемые на основе использования живых ослабленных, апатогенных микроорганизмов, так называемых вакцинных штаммов; 2) вакцины убитые, получаемые путем инактивации различными методами патогенных возбудителей инфекционных заболеваний; 3) вакцины — химические антигены, извлекаемые из микроорганизмов различными химическими методами; 4) анатоксины, получаемые путем обезвреживания формалином токсинов, являющихся продуктом метаболизма некоторых патогенных микроорганизмов; 5) вакцины искусственные — единая синтетическая макромолекула, в которой совмещены гаптенная или слабоантигенная детерминанта с синтетической полиэлектролитной структурой.

Вакцинные, или аттенуированные, штаммы микроорганизмов получают различными методами. В некоторых случаях в качестве вакцинных штаммов используют культуры, полученные путем отбора из числа выделяемых от больных людей и животных микроорганизмов, так называемых спонтанных мутантов, обладающих присущими вакцинным штаммам свойствами. В других случаях для получения вакцинных штаммов используют воздействие на патогенные культуры различных физических, химических и биологических факторов с последующим отбором из обработанной популяции апатогенных вариантов. Одним из главных требований, предъявляемых к вакцинным штаммам, является стойкая, наследственно закрепленная утрата ими патогенных свойств.

Живые вакцины, полученные на основе аттенуированных вакцинных штаммов микроорганизмов, обладают рядом существенных преимуществ перед вакцинами других типов — убитыми и химическими. Главными их преимуществами являются высокая напряженность, прочность и длительность обусловливаемого ими иммунитета, приближающегося к постинфекционному. Важным достоинством живых вакцин является возможность для большинства из них однократного введения. Развитие «вакцинальной инфекции», сопровождающееся размножением вакцинного штамма в организме, образованием и поступлением в организм в течение достаточно длительного времени активных антигенных субстанций, полностью обеспечивает формирование напряженного иммунитета и исключает в большинстве случаев необходимость повторных инъекций, производимых при использовании вакцин других типов.

Важным преимуществом живых вакцин перед другими видами является возможность применения не только путем подкожного введения, но и другими, более простыми путями (накожно через скарифицированную кожу, перорально, интраназально), более удобными при проведении в первую очередь массовой вакцинации.

Живые вакцины наряду с отмеченными преимуществами имеют и недостатки, связанные с тем, что действующим началом этих препаратов являются живые микроорганизмы.

Строгое соблюдение условий транспортировки, хранения и применения живых вакцин является одним из основных факторов, определяющих их эффективность в практике. Живые вакцины должны транспортироваться и храниться обязательно при температуре не выше 4–8 °С. Отрицательные температуры при транспортировке и хранении не влияют на активность сухих препаратов. Совершенно недопустимо

нарушение вакуума в ампулах с живыми вакцинами: попадание в ампулы воздуха и влаги приводит к инактивации препарата.

Живые вакцины не содержат консервантов, поэтому при вскрытии ампул и растворении их содержимого необходимо строго соблюдать правила асептики. В то же время следует помнить, что совершенно недопустим контакт с живыми вакцинами любых дезинфицирующих средств, инактивирующих микроорганизмы, и воздействие высокой температуры на всех этапах подготовки препарата к применению.

Учитывая особенности формирования иммунитета в ответ на введение живых вакцин, основанные на развитии «вакцинальной инфекции», очень важно в случаях применения живых бактериальных вакцин исключить за 1–2 дня до прививки и по меньшей мере на 1-й неделе после нее прием таких препаратов, как антибиотики, сульфаниламиды, иммуноглобулины, применение которых при вакцинации живыми бактериальными препаратами может резко уменьшить интенсивность «вакцинальной инфекции» и, следовательно, снизить эффект прививки. Живые вирусные вакцины можно применять одновременно с антибиотиками, так как на размножение вирусов в организме последние не влияют.

Вакцины убитые в отличие от живых представляют собой препараты, приготовленные с использованием так называемых производственных штаммов возбудителей соответствующих инфекций, обладающих полноценными антигенными свойствами и высокой вирулентностью. При изготовлении убитых вакцин специально отобранные и проверенные производственные штаммы бактерий выращивают на искусственных питательных средах (плотных или жидких), а штаммы вирусов — в организме животных или культурах тканей. Получаемые после культивирования взвеси бактерий или вирусов подвергают инактивации различными физическими и химическими методами, основными требованиями к которым являются надежность инактивации и минимальное повреждающее действие на антигены бактерий и вирусов.

В зависимости от вида микроорганизма применяют тот или иной метод инактивации, оптимальный для данного возбудителя. Полученные после инактивации взвеси микроорганизмов разводят до необходимой концентрации и затем разливают в ампулы или флаконы. Некоторые убитые вакцины готовят в сухом виде. Высушивание обеспечивает их большую стабильность, а также приводит к удалению из препаратов инактивирующих агентов (формалина, фенола) и тем самым снижает их реактогенность.

Убитые вакцины более устойчивы при хранении, чем живые. Тем не менее, чтобы исключить возможность изменения их свойств, убитые

вакцины необходимо хранить при низких температурах (2–10 °С). Замораживание жидких убитых вакцин недопустимо, так как при последующем оттаивании могут измениться физические свойства препарата: в нем могут появляться хлопья, происходит разрушение и лизис микробных клеток. Это приведет к повышению реактогенности вакцины за счет выхода бактериальных антигенов в жидкую фазу препарата. Хранение и транспортировка сухих препаратов при отрицательных температурах допускается, так как они не представляют для них опасности.

Эффективность убитых бактериальных и вирусных вакцин в целом ниже, чем живых. Основной способ их применения — подкожные инъекции, которые необходимо повторять из-за относительно короткого срока создаваемого убитыми вакцинами иммунитета.

Так называемые химические вакцины представляют собой наиболее активные по иммунологическим свойствам специфические компоненты — антигены, извлекаемые из микробных клеток физико-химическими методами. Это сложные комплексы органических соединений — полисахаридов, полипептидов, липидов. Изготовление и применение химических вакцин основано на предпосылке, что выделенные из микробной клетки иммунологически активные субстанции, освобожденные от балластных, иммунологически неактивных веществ клетки, должны быть более эффективны и менее реактогенны по сравнению с так называемыми корпускулярными вакцинами, изготовленными путем инактивации цельных микробных клеток. Это позволяет вводить человеку большие дозы антигенов, что повышает иммунологический эффект, а также создает возможность применения ассоциированных препаратов, направленных одновременно против нескольких инфекций. Кроме того, извлеченные из микробной клетки антигены более стабильны и их легче стандартизировать, чем корпускулярные вакцины.

Наряду с токсичностью, т. е. способностью вызывать патологические процессы в живом организме, токсины обладают весьма важным в практическом отношении свойством — антигенностью, т. е. способностью при введении в организм в небольших дозах вызывать образование специфических антител — антитоксинов. После добавления 0,3–0,4 % формалина и выдерживания в течение нескольких дней при 37–40 °С токсины полностью теряют токсичность, но сохраняют антигенные свойства. Полученные таким образом из токсинов препараты были названы Рамоном анатоксинами. В ряде стран такие препараты называют токсоидами.

Анатоксины, предназначенные для иммунизации людей, готовят в виде очищенных, концентрированных препаратов, адсорбированных на гидрате окиси алюминия. Необходимость очистки и концентрации

первоначально полученных так называемых нативных анатоксинов связана с тем, что изготовленные на искусственных питательных средах препараты содержат большое количество балластных веществ питательной среды, не обладающих специфической активностью и способных при введении в организм вызывать различные местные и общие реакции. Для очистки от балластных веществ нативные анатоксины подвергают специальной обработке различными химическими и физическими методами, в результате чего препараты не только освобождаются от балластных веществ, но и концентрируются по объему, что позволяет вводить необходимую дозу препарата в значительно меньшем объеме, а также осуществлять одновременную иммунизацию несколькими препаратами. Иммуногенность анатоксинов, как и ряда других вакцин, зависит не только от качества антигена, т. е. специфической активности, степени чистоты и концентрации, но и от физико-химического состояния используемого для иммунизации препарата. Адсорбция препаратов на различных минеральных адсорбентах (гидрат окиси алюминия, фосфат алюминия, фосфат кальция и др.) обуславливает резкое повышение эффективности вакцинации. Это объясняется прежде всего созданием в месте инъекции адсорбированного препарата депо антигена, а также замедленным его всасыванием: дробное поступление антигена из места инъекции обеспечивает эффект суммации антигенного раздражения (по принципу физиологического закона суммации раздражения), резко повышает иммунологический эффект. Помимо этого, депонирующее вещество вызывает в месте инъекции воспалительную реакцию, которая, с одной стороны, препятствуя всасыванию антигена, усиливает его депонирующее действие, а с другой, являясь неспецифическим стимулятором, усиливает плазмоцитарные реакции в лимфатических тканях организма, участвующих в иммуногенезе.

Адсорбированные препараты перед употреблением необходимо взбалтывать, чтобы обеспечить равномерное распределение во всем объеме активного начала, которое перед взбалтыванием находится в осадке вместе с адсорбентом.

Искусственная вакцина представляет собой соединение специфического естественного или синтетического антигена (гаптены, белки, полисахариды) с иммунопотенциатором.

Получение искусственных антигенов проводится в двух основных направлениях:

первое — химический синтез антигенных молекул, копирующих полностью или частично природные белковые или полисахаридные антигены бактерий, вирусов и т. д.;

второе — генно-инженерный синтез необходимых антигенов.

При конструировании искусственных вакцин наиболее перспективными являются те антигены, против которых удастся стимулировать иммунный ответ вопреки природной «неотвечаемости» организма, и те, которые являются наиболее общими для разновидностей данного возбудителя, поскольку они открывают возможность создания полиспецифических вакцин, эффективных сразу против нескольких серотипов данного возбудителя.

Иммунопотенциаторы — это агенты разнообразной природы, неспецифически стимулирующие иммунный ответ к специфическим антигенам (полисахариды бактериального и растительного происхождения; бактериальные гликопептиды; нуклеиновые кислоты; синтетические полипептиды, гликопептиды, полинуклеотиды; синтетические карбоцепные и гетероцепные полианионы и поликатионы).

На схеме (рис. 24) представлены этапы получения искусственных вакцин на основе выделенных или синтезированных антигенов и их иммунопотенциаторов.

В настоящее время разработаны и испытаны искусственные противосальмонеллезные вакцины, вакцины против гриппа. Определены перспективы создания алерговакцин и противораковых вакцин.

Современные биотехнологические разработки предусматривают создание рекомбинантных вакцин и вакцин-антигенов. Вакцины обоих типов основаны на генно-инженерном подходе.

Для получения рекомбинантных вакцин обычно используют хорошо известный вирус коровьей оспы (осповакцины). В его ДНК встраивают чужеродные гены, кодирующие иммуногенные белки различных возбудителей (гемагглютинин вируса гриппа, гликопротеин D вируса герпеса, поверхностный антиген вируса гепатита В, антиген малярийного плазмодия). Получаются вакцины против соответствующих инфекций. К их достоинствам относится возможность создания поливалентных вакцинных препаратов на основе объединения участков ДНК различных патогенов «под эгидой» ДНК вируса осповакцины.

Вакцины-антигены получают, клонируя гены возбудителя в *E. coli*, дрожжах, клетках насекомых и млекопитающих. Клонирован ген поверхностного антигена НВS-вируса гепатита В, ген белка оболочки VP1-вируса ящура. Вакцины-антигены высокостабильны при хранении и перевозке, сравнительно просты в изготовлении, содержат минимальное количество белка и поэтому малоопасны как аллергены. Они гарантированы от остаточной инфекционности. Проблемой является низкая иммуногенность, к повышению которой ведет добавление иммунопотенциаторов (метод, используемый при создании искусствен-

ных вакцин); иммобилизация вакцин на носителях; включение в липосомы. В случае использования липосомальных вакцин иммунный ответ усиливается вследствие того, что антигены, ассоциированные с липосомами, попадают непосредственно в антигенпредставляющие клетки. На рис. 25 дается схема конструкции липосомальной вакцины против гепатита А. В липосому включают, кроме антигена (вирусный капсид), еще белки, способствующие слиянию мембран липосом и клеток, в данном случае гемагглютинин вируса гриппа. Для таких препаратов сейчас используют термин «виросомы». В США заканчиваются клинические испытания нескольких оральных вакцин (против возбудителей рода *Shigella* и патогенных *E. coli*). Липосомы представляют возможность конструировать поливалентные вакцины, например, против нескольких штаммов гриппа и др.



Рис. 24. Этапы создания искусственной вакцины

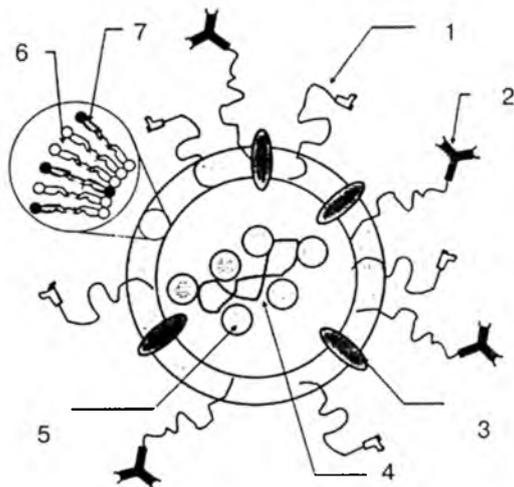


Рис. 25. «Идеальная» конструкция липосомы для направленной доставки лекарственного вещества в клетку: 1 — полимер для стерической защиты от РЭС (например, ПЭГ); 2 — «молекулярный адрес» на полимерной ножке (в основном, иммуноглобулины); 3 — белки слияния (например, гемагглютинин); 4 — лекарственное вещество (например, ДНК); 5 — липидные положительно заряженные частицы для компактизации ДНК; 6 — мембранообразующие липиды (фосфатидилхолин); 7 — липиды, дестабилизирующие мембрану (например, ФЭ)

Сывороточные препараты позволяют создавать пассивный иммунитет в очень короткие сроки, что особенно важно при экстренной профилактике заболеваний с коротким инкубационным периодом и лечении уже развившейся болезни.

Эти препараты получают путем специальной обработки крови искусственно иммунизированных животных, а также крови людей, перенесших соответствующее инфекционное заболевание или иммунизированных соответствующим вакцинным препаратом.

По направленности действия лечебно-профилактические сывороточные препараты можно разделить на три группы: антитоксические, антибактериальные и противовирусные.

Антитоксические сыворотки, действующим началом которых являются антитоксины, применяют с целью профилактики и лечения так называемых токсинемических инфекций, т. е. инфекций, в основе которых лежит действие на организм ядовитых продуктов жизнедеятельности микробов — токсинов. К числу таких инфекций относятся столбняк, дифтерия, ботулизм, газовая и стафилококковая инфекции. Антитоксическими являются также сыворотки против ядов змей, содержащие в достаточно высокой концентрации антитела к змеиным

ядам. Антитоксины антитоксических сывороток способны нейтрализовать действие соответствующих токсинов, что и обеспечивает их лечебно-профилактический эффект.

Антибактериальные сыворотки, ранее широко применявшиеся в практике, в настоящее время используют в ограниченных количествах. Это объясняется, с одной стороны, их относительно малой эффективностью, а с другой — широким внедрением в практику высокоэффективных химиотерапевтических препаратов и антибиотиков. Действующим началом антибактериальных сывороток является комплекс антител-агглютининов, бактериолизин и опсоцинов, способствующих фагоцитозу и лизису микробных клеток в организме.

Антивирусные сыворотки в последнее время находят все более широкое применение как для профилактики, так и лечения ряда вирусных заболеваний — кори, гриппа, бешенства, клещевого энцефалита, гепатита. В ряде случаев эти препараты можно использовать с целью профилактики поствакцинальных осложнений и осложнений после применения живых вакцин — оспенной и коревой. Действующим началом антивирусных сывороток являются вируснейтрализующие антитела, способные инактивировать соответствующие вирусы.

Антитоксические, антибактериальные и некоторые антивирусные сыворотки готовят путем гипериммунизации (по специально разработанным схемам) крупных животных, главным образом, лошадей. Лошади являются наиболее подходящим для этой цели видом животных; от них удается получать высокоактивные сыворотки в достаточно больших количествах. Гипериммунные сыворотки, получаемые из крови животных путем удаления форменных элементов и фибрина и называемые нативными, перед практическим применением подвергаются очистке и концентрации. Принципы очистки основаны на выделении из сыворотки специальными методами активных белковых фракций, преимущественно глобулиновых, и удалении балластных фракций, не являющихся носителями антител. Выделенные активные фракции растворяют в меньшем по сравнению с исходным объеме, что в итоге позволяет вводить препарат в меньших объемах и с меньшим содержанием чужеродных для организма белков сыворотки.

С целью уменьшения возможности побочных реакций, в частности, анафилактических, некоторые сыворотки в процессе очистки подвергают обработке протеолитическими ферментами. Получаемые путем такой обработки препараты содержат расщепленные белковые молекулы с меньшим молекулярным весом, что обуславливает их меньшую анафилактогенность.

Сывороточные препараты, получаемые из крови животных, имеют два существенных недостатка, связанных с их гетерогенностью, т. е. чужеродностью для человека. Первый недостаток заключается в том, что введение их в организм может сопровождаться различными реакциями, связанными с сенсибилизирующим действием сывороточных белков (сывороточная болезнь, анафилактический шок). Из них наибольшую опасность представляет реакция немедленного типа — анафилактический шок, развивающийся, как правило, у лиц, получавших ранее сыворотку и, следовательно, уже сенсибилизированных к гетерогенному белку. Перед введением любых гетерогенных сывороток необходимо определять индивидуальную чувствительность организма к белкам данной сыворотки путем постановки специальной внутрикожной пробы. Вторым недостатком гетерогенных сывороток является кратковременность обуславливаемого ими пассивного иммунитета, длительность которого ограничивается 1–2 нед. Выведение антител из организма происходит как за счет естественного процесса распада белков введенной сыворотки, так и за счет образования антител к белкам введенной сыворотки, являющейся для организма чужеродным антигеном. После повторного введения сыворотки длительность пребывания антител в организме еще больше сокращается в результате действия ранее образовавшихся антител к белкам введенной сыворотки.

Иммуноглобулины, получаемые из крови человека, выгодно отличаются от сывороточных препаратов животного происхождения тем, что, не являясь для человеческого организма чужеродными, практически не реактогенны. При введении таких препаратов человеку антитела циркулируют в организме значительно дольше, чем антитела гетерогенных сывороток, обеспечивая состояние невосприимчивости в течение 4–5 нед.

Иммуноглобулины получают путем фракционирования (по методу Кона) из донорской, плацентарной и абортной крови человека. Их выпускают в очищенном и концентрированном виде.

Получение **моноклональных антител** базируется на гибридной технологии, в основе которой слияние клетки-продуцента с раковой клеткой и клонирование полученной гибридной клеточной линии.

При слиянии В-лимфоцита с миеломной клеткой получают В-гибридомные клоны, применяемые как продуценты моноклональных антител. Важное преимущество моноклональных антител — их однородность, способность избирательно связываться с протективной частью антигена, инактивируя его, что имеет большое практическое значение для распознавания и лечения заболеваний, вызываемых чужеродными агентами. Моноклональные антитела успешно применяют

в аналитических целях для изучения клеточных органелл, их структуры или отдельных биомолекул. В современной фармацевтической промышленности моноклональные антитела используют для очистки лекарственных препаратов.

На первых этапах для гибридизации использовали исключительно миеломные клетки и В-лимфоциты мышей и крыс. Продуцируемые ими моноклональные антитела имеют ограниченное терапевтическое применение, так как они сами представляют чужеродный белок для человеческого организма. Сегодня уже получены гибридомы человека — продуценты моноклональных антител.

Общая схема получения гибридом на основе миеломных клеток и иммунных лимфоцитов включает следующие этапы:

1. Получение мутантных опухолевых клеток. Стандартным подходом является выведение линий миеломных клеток, не способных к синтезу ферментов биосинтеза пуринов и пиримидинов из гипоксантина и тимидина соответственно.

2. Получение лимфоцитов — продуцентов антител к заданным антигенам. Животное (мышь, реже крысу, кролика) иммунизируют введением антигена в брюшную полость внутривенно или подкожно. Для получения человеческих гибридом прибегают к иммунизации лимфоцитов человека в культуре ткани.

3. Слияние лимфоцитов с опухолевыми клетками: сливающим агентом служит полиэтиленгликоль, реже лизолецитин или вирус Сендай, а также мощное электрическое поле.

4. Скрининг гибридомных клеток. Применяют селективную среду НАТ, на которой родительские миеломные клетки погибают как генетически дефектные по ферментам биосинтеза нуклеотидов. Родители-лимфоциты, не слившиеся с миеломными клетками, тоже погибают, поскольку они не способны расти вне организма. Гибридомные клетки сочетают в себе способность к неограниченному росту и к синтезу нуклеотидов и поэтому накапливаются в культуре.

5. Проверка способности гибридомных клеток продуцировать моноклональные антитела к заданному антигену. Для этого используют метод иммуносорбентов. Образец культуральной жидкости с гибридомными клетками вводят в реакцию с соответствующим антигеном, прочно закрепленным на носителе. Существуют радиоиммунный и иммунофлуоресцентный варианты метода.

6. Клонирование гибридомных клеток, прошедших проверку на образование моноклональных антител, с постоянным контролем на стабильность их иммунных свойств.

7. Массовое культивирование гибридомы, выделение, концентрирование и очистка продуцируемых антител. Помимо выращивания гибридомных клеток в культуре, для получения больших количеств моноклональных антител используют внутрибрюшинное заражение мышей гибридомными клетками (рис. 26).

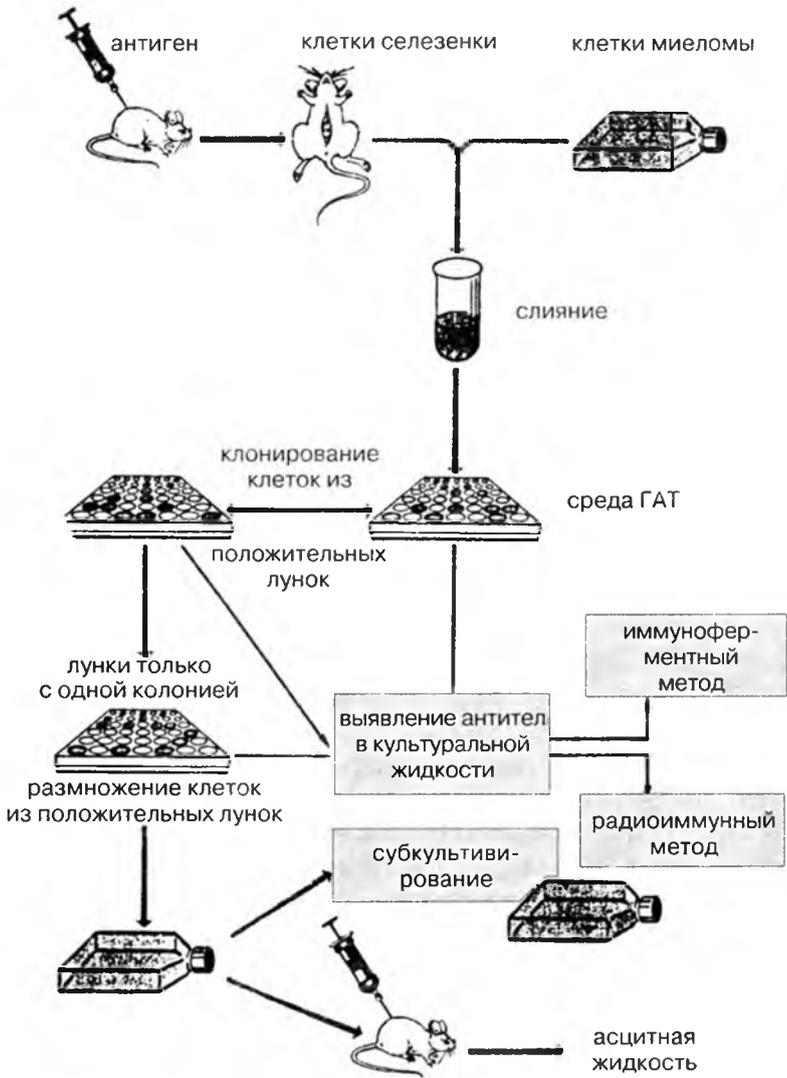


Рис. 26. Основные этапы получения гибридомы, синтезирующих моноклональные антитела

Бактериофаги представляют собой живые агенты, близкие по своей природе к вирусам и паразитирующие внутри бактериальных клеток. Проникая внутрь бактериальных клеток, они размножаются, вызывая их разрушение. На этом свойстве основано их применение с лечебно-профилактической целью.

Учитывая эту специфичность, бактериофаги для практического применения готовят в виде поливалентных препаратов, включающих набор бактериофагов, активных в отношении различных типов и рас возбудителя. При получении бактериофагов производят систематический контроль за специфичностью фагов в отношении циркулирующих в природе рас возбудителей и, по мере необходимости, заменяют производственные расы бактериофага.

Производство бактериофагов основано на заражении активно растущей в жидкой питательной среде бактериальной культуры соответствующего возбудителя специфическим бактериофагом, что приводит к интенсивному размножению фагов, разрушению бактериальных клеток и выходу в жидкую среду большого числа фаговых частиц. Культуральная жидкость, освобожденная (при помощи стерилизующих фильтров) от оставшихся микробных клеток и их разрушенных частиц, представляет собой активный препарат бактериофага, поскольку фильтры не задерживают частиц фага. К полученному фильтрату добавляют в качестве консерванта раствор хинозола, препятствующий размножению в нем случайно попавших единичных бактерий. Препараты бактериофагов в основном применяют перорально.

Прием бактериофага не сопровождается выработкой активного иммунитета, и его применение не может заменить вакцинацию, поэтому целесообразно сочетание фагопрофилактики и вакцинации.

Для диагностики ряда инфекционных заболеваний и аллергических состояний человека инфекционной и неинфекционной природы широко используются разнообразные препараты, объединенные под общим названием «аллергены». Применение аллергенов основано на способности кожи сенсибилизированного к определенному агенту организма реагировать на его введение усиленной реакцией. Применяемые в практике аллергены разнообразны по своей природе, методам изготовления и химическому составу. Все аллергены могут быть разделены на две основные группы — бактериальные, или инфекционные, и неинфекционные.

Бактериальные аллергены готовят из соответствующих микроорганизмов. Препараты представляют собой взвесь убитых микробных клеток или извлеченных из них различных активных фракций. К группе

бактериальных аллергенов относятся туберкулин, тулярин, бруцеллин, антраксин, малеин, дизентерин. Эти аллергены используют в практике как для диагностики соответствующих инфекционных заболеваний, так и для выявления состояния иммунитета после активной иммунизации вакцинными препаратами.

Группа бактериальных аллергенов включает также большое число препаратов, применяемых с целью диагностики разнообразных аллергических заболеваний человека инфекционной природы, вызываемых различными микроорганизмами — стафилококками, стрептококками, палочками кишечной группы и др. К числу таких аллергических заболеваний относятся бронхиальная астма, хронические процессы в носоглотке, отиты, полиартриты и др. Помимо диагностических целей, эти аллергены после определения сенсибилизирующего агента успешно применяют также с целью десенсибилизирующей терапии.

Группа аллергенов неинфекционной природы включает разнообразные препараты, основными из которых являются бытовые, эпидермальные и пыльцовые аллергены. Бытовые аллергены готовят из домашней пыли (пыль подушек, матрацев, ковров, книг). Эпидермальные аллергены представляют собой экстракты из шерсти животных, перьев птиц. Пыльцовые аллергены готовят из пыльцы разнообразных растений, вызывающей у человека сезонные заболевания аллергического характера.

Все аллергены неинфекционной природы используют как для определения аллергизирующего агента, так и с целью последующей десенсибилизирующей терапии.

Профессор Дикий И.Л. (кафедра микробиологии НФаУ) с соавт. предложили новый усовершенствованный способ получения тканевого аллергена для диагностики аутоаллергических процессов при хроническом тонзиллите. Способ осуществляется следующим образом:

- ✓ Удаленные во время оперативных вмешательств небные миндалины отмывают физиологическим раствором NaCl, взвешивают и измельчают в блендере в присутствии 15 мл физиологического раствора NaCl в течение 10 мин при 3000 об/мин. Полученный гомогенат центрифугируют 5 мин при 1000 об/мин. Осадок трижды отмывают избытком физиологического раствора центрифугированием в течение 5 мин при 1000 об/мин.
- ✓ Полученный осадок отжимают между листами фильтровальной бумаги.
- ✓ Полученный осадок гомогената миндалин подвергают кислотному гидролизу 1 N раствором HCl (200 мл на 4 г влажной массы осадка). Гидролиз ведут в течение 30 мин при кипячении.

- ✓ Гидролизат охлаждают до 20 °С, после чего нейтрализуют 1 N раствором NaOH под потенциометрическим контролем до pH 7,1.
- ✓ Нейтрализованный продукт центрифугируют в течение 30 мин при 8000 об/мин. Осадок отбрасывают.
- ✓ 1 мл надосадочной жидкости упаривают досуха под вакуумом при 10 мм рт. ст. и 50 °С до постоянного веса. Взвешивают.
- ✓ Аллерген стандартизируют по навеске органических веществ до значений 10 мг/мл.
- ✓ Полученный стандартный раствор аллергена подвергают стерилизующей фильтрации.
- ✓ Раствор аллергена в стерильных условиях разливают в ампулы и лиофилизируют.

Основу биологически активного начала алергодиагностикума составляют олигосахариды, представленные в ткани миндалин в составе соединительнотканых и ретикулярных волокон. Последнее объясняет высокую диагностическую ценность полученного аллергена и дает возможность его химической идентификации.

СИСТЕМА ПРОИЗВОДСТВА И КОНТРОЛЯ БАКТЕРИЙНЫХ И ВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Бактерийные и вирусные препараты представляют собой вид продукции, к производству и контролю которой предъявляются особо жесткие требования. Это обусловлено прежде всего тем, что их готовят, как правило, на основе патогенных или ослабленных микроорганизмов. Это обстоятельство требует соблюдения четко регламентированных условий технологии производства, гарантирующих, с одной стороны, безопасность работающего персонала, с другой — безвредность, эффективность и стандартность препаратов.

Основным условием для производства любого препарата является наличие специальной, утвержденной Министерством охраны здоровья Украины технической документации, включающей технические условия (ТУ) и регламент производства.

Технические условия на препараты регламентируют основные показатели качества, которыми должны обладать выпускаемые в практику препараты. В этом документе кратко и четко изложены следующие данные: название препарата, характеристика его действующего начала, критерии качества, назначение препарата с включением «Наставления по применению», которое прилагается к препарату при его выпуске, методы контроля, при помощи которых оценивается соответствие препарата установленным качественным показателям, характеристика

лекарственной формы, условия хранения и транспортировки препарата, срок годности и порядок его продления.

Регламент производства является вторым обязательным документом, необходимым для организации производства бактериальных и вирусных препаратов, утверждаемым также Министерством охраны здоровья Украины. Этот документ детально регламентирует технические и технологические условия производства, которые должны обеспечить изготовление и выпуск препаратов, полностью отвечающих требованиям, изложенным в технических условиях.

Контроль препаратов осуществляется на всех этапах производства, начиная с оценки качества исходного сырья и реактивов, используемых в производстве, качества производственных штаммов микроорганизмов, питательных сред, полуфабрикатов и кончая готовой продукцией.

АСПЕКТЫ GMP

Основная идея GMP (Good Manufacturing Practice) связана с обеспечением надлежащей системы производства и контроля, гарантирующей получение качественных лекарственных средств. При этом правила GMP предусматривают строгое документирование процесса производства, а директивы ЕС — обеспечение соответствия качества промышленных серий препаратов требованиям регистрационной и лицензионной документации.

К основному тексту Европейской GMP даются 14 Приложений. Действие Приложения 2 к GMP по производству биологических лекарственных препаратов для человека распространяется на:

- ✓ микробные культуры, за исключением полученных методом ДНК-технологии;
- ✓ микробные и клеточные культуры, включая ДНК рекомбинантные и гибридные;
- ✓ вытяжки из биологических тканей;
- ✓ воспроизводство живых организмов в эмбрионах и животных.

При производстве биологических лекарственных препаратов необходимо руководствоваться «Общими требованиями ВОЗ к производственным предприятиям и контрольным лабораториям».

В Приложении по биологическим препаратам не даются подробные требования к отдельным классам биологических препаратов, которые изложены в других руководствах, изданных Комитетом по патентованным лекарственным препаратам (Committee for Proprietary Medicinal Products — CPMP), например, руководство по моноклональным анти-

телам, руководство по препаратам, получаемым методом ДНК-рекомбинантной технологии, и др.

Производство биологических лекарственных препаратов имеет свои особенности, вытекающие из природы продуктов и процессов. В отличие от обычных лекарственных препаратов, которые получают химическими или физическими методами с высокой степенью постоянства, производство биологических лекарственных препаратов сопряжено с биологическими процессами и материалами, такими, как культивирование клеток или экстракция материала из живого организма. Изменчивость биологических процессов приводит к непостоянству диапазона и природы побочных продуктов.

При контроле биологических лекарственных препаратов часто необходимо использовать биологические и аналитические методы контроля. Особое значение приобретает контроль во время процесса производства биологических лекарственных препаратов.

В Приложении, по сравнению с основным текстом GMP, значительно расширены требования к персоналу: к его обучению, иммунологическому статусу, контролю состояния здоровья, подчеркивается недопустимость переходов в течение рабочего дня из помещения, где обрабатываются одни микроорганизмы, в помещение с другими организмами, а если такой переход неизбежен — необходимость особых мер предосторожности.

Персонал

1. Весь персонал (включая занимающийся уборкой, обслуживанием и контролем качества), работающий в зонах, где производится биологическая лекарственная продукция, должен пройти дополнительное обучение, которое специфично для выпускаемой продукции и их работы. Персонал должен получить соответствующую теоретическую и практическую подготовку по гигиене и микробиологии.

2. Лица, ответственные за производство и контроль качества, должны иметь адекватную подготовку в области соответствующих научных дисциплин, таких, как бактериология, биология, биометрия, химия, медицина, фармация, фармакология, вирусология, иммунология, ветеринарная медицина, наряду с достаточным практическим опытом, что даст им возможность выполнять их функции по управлению соответствующим процессом.

3. Для безопасности продукции необходимо учитывать иммунологический статус персонала. Персонал, занимающийся производством, обслуживанием, испытаниями и уходом за животными, а также

инспекторы должны быть при необходимости вакцинированы соответствующими вакцинами и регулярно проходить медицинский контроль. Помимо проблем, связанных с предотвращением воздействия на персонал источников инфекции, потенциальных токсинов и аллергенов, необходимо предотвращать возможность попадания инфекции в партию продукции.

4. Любые изменения в иммунологическом статусе персонала, которые могут отрицательно повлиять на качество продукции, должны исключать возможность работы в производственной зоне. Производство БЦЖ-вакцин и туберкулиновых продуктов должно поручаться персоналу, который регулярно проходит контроль иммунологического статуса и рентгеновский контроль грудной клетки.

5. В течение рабочего дня персонал не должен переходить из зон, где есть возможность воздействия живых организмов или животных, в зоны, где работают с другой продукцией или организмами. Если такой переход неизбежен, меры по обеззараживанию должны быть четко определены, включая смену одежды и обуви, а при необходимости и душ.

Помещения и оборудование

1. Степень загрязнения окружающей среды частицами и микроорганизмами в производственных помещениях должна соответствовать этапу производства и конечному продукту.

2. Риск перекрестного загрязнения между биологическими лекарственными препаратами, особенно на тех стадиях производственного процесса, на которых используются живые организмы, может потребовать дополнительных мер предосторожности. Характер продукта, а также используемое оборудование будут определять уровень разделения, необходимый для того, чтобы избежать перекрестного загрязнения.

3. В принципе, специальные помещения должны использоваться для производства БЦЖ-вакцин и обработки живых организмов, применяемых в производстве туберкулиновых продуктов.

4. Для обработки *Bacillus anthracis*, *Clostridium botulinum* и *Clostridium tetani* до выполнения процедуры инактивации необходимы специальные помещения.

5. Производство на основе технологических циклов может быть приемлемым для других спорообразующих организмов при условии, если помещения приспособлены для этой группы продукции и в одно и то же время обрабатывается только один продукт.

6. Одновременное производство в одной и той же зоне с использованием закрытых систем биоферментаторов может быть приемлемым для таких продуктов, как моноклональные антитела, и продуктов, получаемых методом рекомбинантной ДНК-технологии.

7. Этапы обработки после сбора могут выполняться в той же производственной зоне при условии, что предприняты адекватные меры предосторожности для предотвращения загрязнения. Для убитых вакцин и токсидов (анатоксинов) такая параллельная обработка может выполняться только после инактивации или после детоксификации.

8. Зоны положительного давления должны использоваться для обработки стерильной продукции, но по причинам загрязнения допускается отрицательное давление в специальных зонах, там, где возможно давление патогенов. Если используются зоны отрицательного давления или шкафы безопасности для асептической обработки патогенов, они должны быть окружены стерильной зоной с положительным давлением.

9. Зоны фильтрации воздуха должны быть специфичны для соответствующей зоны обработки, не должно быть рециркуляции воздуха из зон, где обрабатываются живые патогенные организмы.

10. Планировка и исполнение производственных зон и оборудования должны позволять эффективную очистку и деконтаминацию (например, окуриванием). Адекватность процедур очистки и деконтаминации должна подтверждаться валидацией.

11. Оборудование, используемое во время обработки живых организмов, должно быть спроектировано таким, чтобы культуры были чистыми и не загрязнялись от внешних источников во время обработки.

12. Системы труб, клапаны и вентиляционные фильтры должны быть сконструированы надлежащим образом для упрощения очистки и стерилизации. Рекомендуется использование систем CIP (clean in place), SIP (sterile in place). Клапаны на сосудах ферментации должны полностью стерилизоваться паром. Воздушные вентиляционные фильтры должны быть гидрофобными и проходить валидацию согласно графику во время их срока службы.

13. Первичное загрязнение должно быть спланировано и испытано для демонстрации отсутствия возможности утечек.

14. Стоки, которые могут содержать патогенные микроорганизмы, должны эффективно обеззараживаться.

15. В связи с большим разнообразием биологических препаратов и процессов некоторые ингредиенты или добавки должны отмеряться или взвешиваться в ходе процесса (например, буферы). В этом случае разрешается хранение небольшого запаса этих веществ в производственной зоне.

Помещения для животных и уход за ними

1. Животные используются для получения целого ряда биологических продуктов, например, роію вакцины (обезьяны), змеиного противоядия (лошади, козы), вакцины против бешенства (кролики, мыши, хомячки), сывороточного гонадотропина (лошади). Дополнительно животные могут также использоваться в контроле качества большинства сывороток и вакцин, например, противокклюшевой вакцины (мыши), пирогенности (кролики), БЦЖ-вакцины (морские свинки).

2. Общие требования к помещениям для животных, уходу за ними, карантину изложены в Директиве 86/609/ЕЕС. Помещения для животных, используемых при производстве и контроле биологических продуктов, должны быть отделены от производственных зон и зон контроля. Должно контролироваться и регистрироваться состояние здоровья животных, из которых получают некоторые исходные материалы, а также тех, которые используются в производстве, контроле качества и испытаниях на безопасность.

Документация

1. Спецификации для биологического исходного сырья могут потребовать дополнительной документации относительно источника, происхождения, способа производства и применяемых методов контроля, особенно микробиологического контроля.

2. В плановом порядке необходимы спецификации для промежуточных и in-vitro биологических лекарственных продуктов.

Производство. Исходные материалы

1. Источник, происхождение и пригодность исходных материалов должны быть четко определены. Если необходимые испытания продолжительны, может быть разрешена обработка исходных материалов до получения результатов испытаний. В таких случаях выпуск конечной продукции обуславливается удовлетворительными результатами испытаний.

2. Если необходима стерилизация исходных материалов, она должна быть, по возможности, термической. Если необходимо, могут использоваться другие подходящие методы для инактивации биологических материалов (например, иррадиация).

Партии посевного материала и система банков клеток

1. Для того чтобы избежать нежелательного дрейфа свойств, который может наблюдаться при повторяющемся субкультивировании

или множественном воспроизведении, производство биологических лекарственных препаратов, получаемых с помощью микробных культур, клеточных культур или размножением в эмбрионах и животных, должно основываться на системе главных и рабочих партий посевного материала и/или банков клеток.

2. Количество поколений (удвоений, переходов) между партией посевного материала или банком клеток и конечным продуктом должно согласовываться с дозе препарата для получения разрешения на продажу. Масштабирование процесса не должно менять этого фундаментального соотношения.

3. Партии посевного материала и банки клеток должны адекватно характеризоваться и испытываться на содержание загрязнения. Их пригодность к использованию должна быть впоследствии показана постоянством характеристик и качества последовательных партий продукции. Партии посевного материала и банки клеток должны быть созданы, храниться и использоваться таким образом, чтобы свести к минимуму риск загрязнения или изменения.

4. Создание партий посевного материала и банков клеток должно осуществляться в соответствующим образом контролируемой среде для защиты партий посевного материала и банков клеток и, если необходимо, персонала, их обрабатывающего. Во время создания партии посевного материала и банка клеток ни один другой живой или инфицированный материал (например, вирусы, линии клеток или штаммы клеток) не должен обрабатываться одновременно в той же самой зоне или теми же людьми.

5. Доказательство стабильности и восстанавливаемости посевного материала и банков должно документироваться. Контейнеры для хранения должны быть герметично запаяны, четко этикетированы и храниться при определенной температуре. Перечень должен тщательно храниться. Температура хранения должна постоянно записываться для морозильных камер и должным образом контролироваться для жидкого азота. Любое отклонение от установленных пределов и любые предпринятые действия по корректировке должны протоколироваться.

6. Только уполномоченному персоналу должна быть разрешена работа с материалами. Эта работа должна выполняться под контролем ответственного лица. Доступ к хранящемуся материалу должен контролироваться. Различные партии посевного материала или банки клеток должны храниться таким образом, чтобы предотвратить путаницу или перекрестное загрязнение. Желательно делить партии

посевного материала и банки клеток и хранить части в различных местах для сведения к минимуму риска полной потери.

7. Со всеми контейнерами главных или рабочих банков клеток и партий посевного материала необходимо обращаться во время хранения одинаково. Однажды снятый с хранения контейнер не должен возвращаться на хранение.

Принципы работы

1. Должна быть продемонстрирована способность культуральной среды поддерживать рост.

2. Добавление материалов или культур в ферментаторы или другие сосуды и отбор проб из них должны выполняться в тщательно контролируемых условиях для обеспечения отсутствия загрязнения. Необходимо принимать меры предосторожности для обеспечения правильного соединения сосудов при пробоотборе.

3. Центрифугирование и смешивание продуктов может привести к образованию аэрозоля. Необходимо принимать меры предосторожности для предотвращения переноса живых микроорганизмов.

4. Если возможно, среды должны стерилизоваться на месте. По возможности должны использоваться встроенные фильтры для регулярного добавления в ферментатор газов, сред, кислот, щелочей, противоположенных агентов и т. д.

5. Валидация необходимого удаления вирусов и выполняемая инактивация должны быть тщательно рассмотрены.

6. В случаях, если инактивация вирусов или процессы удаления выполняются в процессе производства, должны быть предприняты меры для предотвращения риска повторного загрязнения обработанных продуктов необработанными.

7. Для хроматографии используется целый ряд оборудования и, как правило, такое оборудование должно быть предназначено для очистки одного продукта, стерилизоваться и проходить санитарную обработку между партиями. Не рекомендуется использование одного и того же оборудования на различных этапах обработки. Должны быть определены критерии приемлемости, срок службы и способы санитарной обработки и стерилизации колонок.

Контроль качества

1. Особо важную роль в обеспечении постоянства качества биологических лекарственных препаратов играет контроль в ходе процесса. На соответствующих этапах производства, которые критичны для

качества (например, удаление вирусов), должен быть выполнен контроль, если он не может быть выполнен на конечном продукте.

2. Для обеспечения возможности повторения контроля партии или подтверждения его результатов может быть необходимым хранение образцов промежуточных продуктов в достаточных количествах и при соответствующих условиях хранения.

3. Необходим непрерывный мониторинг определенных процессов производства, например, ферментации. Такие данные должны составлять часть протокола партии.

4. Если используется постоянная культура, особое внимание должно быть уделено требованиям к контролю качества, которые вытекают из этого способа производства.

МЕТОДЫ И УСЛОВИЯ ВВЕДЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ

Способы введения в организм бактериальных и вирусных препаратов зависят от их свойств и механизма действия. Большинство вакцинных и сывороточных препаратов вводят при помощи шприца подкожно, внутривенно, внутримышечно или интравенно. Для некоторых препаратов приняты также другие методы введения: накожный (путем скарификации), энтеральный, интраназальный. В настоящее время рекомендуется вводить некоторые препараты путем распыления при помощи специальной аппаратуры. Широко испытан и рекомендован для практики метод введения при помощи безыгольных инъекторов различной конструкции, позволяющих применять препараты подкожно, внутривенно, внутримышечно.

При всех методах введения препаратов требуется соблюдение определенных правил в отношении помещений, в которых осуществляется вакцинация, подготовки рук персонала и кожи прививаемого, а также стерильности используемого инструментария (шприцы, иглы, скарификаторы, аппаратура для интраназального, аэрозольного и безыгольного введения).

Бактериальные и вирусные препараты являются биологическими веществами белковой природы, легко теряющими специфические свойства, поэтому одним из важнейших моментов, определяющих эффективность вакцинопрофилактики, является хранение препаратов в условиях, обеспечивающих стабильность их специфической активности на протяжении установленного срока годности. Особенности хранения каждого препарата указаны на этикетке коробок и в наставлении по применению. Хранение препаратов должно осуществляться для большинства препаратов при температуре 3–10 °С, обеспечиваемой

обычными бытовыми холодильниками. Нарушение правил хранения ведет к денатурации препаратов, изменению биологических свойств и потере их активности, т. е. к снижению эффективности вакцинопрофилактики. Так, хранение живых вакцин приводит к ускоренному отмиранию живых микробных клеток или вирусных частиц, являющихся действующим началом живых вакцин, и, следовательно, к потере активности препарата. При заморзании и последующем оттаивании препаратов, адсорбированных на геле гидрата окиси алюминия, происходит хлопкование и денатурация геля с десорбцией препарата, что значительно снижает его иммуногенность и повышает реактогенность. Замораживание и оттаивание вакцинных препаратов, содержащих убитые микробные клетки, сопровождается повышением их реактогенности вследствие лизиса микробных клеток и выхода растворимых антигенов в жидкую фазу препарата.

Перед применением препарата медицинский работник, ответственный за проведение вакцинации, обязан тщательно проверить правильность фасовки препарата, наличие в коробке наставления по применению, целость и правильность этикеток на коробках и ампулах, целость ампул и физические свойства препаратов. Каждая коробка, в которую зафасованы ампулы или флаконы с препаратом, должна иметь этикетку, включающую название учреждения-изготовителя, его адрес, полное название препарата, его дозировку и способ введения, номер серии препарата, контрольный номер, срок годности и условия хранения. На каждой ампуле должна быть четкая этикетка (или маркировка на стекле), на которой указаны название города, где изготовлен препарат, количество препарата в ампуле, номер серии, контрольный номер, срок годности. Препараты нельзя применять в следующих случаях: при отсутствии этикеток или полных сведений на них, при любых повреждениях ампулы или флакона, наличии в препарате посторонних включений (осколки стекла, хлопья, нити и т. д.), любом изменении физических свойств препаратов, истекшем сроке годности.

МЕТОДИКА ВВЕДЕНИЯ ГЕТЕРОГЕННЫХ (ИЗ КРОВИ ЖИВОТНЫХ) СЫВОРОТОК И ИММУНОГЛОБУЛИНОВ С ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ВНУТРИКОЖНОЙ ПРОБОЙ

Для предупреждения различных реакций, связанных с сенсibiliзирующим действием чужеродных сывороточных белков на организм человека, и выявления лиц, обладающих повышенной чувствительностью к сывороточным белкам, перед введением таких препаратов обя-

зательно определяют индивидуальную чувствительность организма путем постановки внутрикожной пробы.

Для постановки внутрикожной пробы используют разведенную 1:100 лошадиную сыворотку, которую специально готовят с этой целью и вкладывают в коробки с лечебно-профилактической сывороткой. При отсутствии специально изготовленной сыворотки ее необходимо приготовить путем разведения 0,1 мл имеющейся лечебно-профилактической сыворотки в 9,9 мл стерильного физиологического раствора. Для проведения внутрикожной пробы необходимо иметь шприц с делениями 0,1 мл и тонкие иглы. Для каждой пробы используют индивидуальный стерильный шприц и иглу. Инъекцию производят в сгибательную поверхность предплечья. Внутрикожно вводят 0,1 мл разведенной сыворотки и наблюдают за реакцией в течение 20 мин. Пробу считают отрицательной, если диаметр образующейся на месте инъекции папулы не превышает 0,9 см и краснота вокруг нее ограничена. Проба считается положительной, если диаметр папулы достигает 1 см и более и последняя окружена большой зоной красноты.

При получении отрицательного результата внутрикожной пробы введение лечебно-профилактических сывороток начинают с подкожной инъекции 0,1 мл и только в случае отсутствия в течение 30 мин каких-либо реакций вводят остальное количество сыворотки.

При получении положительной внутрикожной пробы, свидетельствующей о повышенной чувствительности организма к белкам лошадиной сыворотки и возможности развития анафилактических реакций, сыворотки вводят только по безусловным показаниям, т. е. при прямой угрозе жизни больного. В этих случаях вводить сыворотку нужно с особыми предосторожностями при непосредственном участии врача. Вначале вводят подкожно разведенную сыворотку, применяемую для постановки внутрикожной пробы. Вводить ее нужно дробно с 20-минутными интервалами в дозах 0,5; 2 и 5 мл. Эти инъекции позволяют более четко выявить чувствительность к лошадиному белку и вместе с тем десенсибилизируют больного. Если реакция на эти дозы отсутствует, вводят подкожно 0,1 мл неразведенной лечебной сыворотки и при отсутствии реакции на эту дозу через 30 мин вводят всю назначенную дозу сыворотки. В случае появления каких-либо реакций на одну из упомянутых выше доз лечебную сыворотку вообще не вводят либо вводят под наркозом, имея наготове шприц с адреналином или эфедрином.

Во всех случаях применения сыворотки необходимо помнить о возможности возникновения, хотя и в редчайших случаях, анафилактического

шока. В обязательном порядке должно быть обеспечено медицинское наблюдение за привитыми в течение часа после инъекции.

РЕАКТОГЕННОСТЬ БАКТЕРИЙНЫХ И ВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Вакцинальный процесс, возникающий после применения живых и убитых вакцин, наряду с иммунологической перестройкой сопровождается комплексом адаптационных реакций, отражающих кратковременное расстройство уравновешенного состояния организма. У многих привитых возникают нестойкие и не резко выраженные изменения со стороны различных функций организма, выявляемые лабораторными методами. Изменяются показатели неспецифического, а иногда и ранее приобретенного специфического иммунитета, морфологический состав и белковый спектр крови, ферментативная активность лейкоцитов, состояние свертывающей системы и некоторых ферментных систем крови, функций надпочечников, различных гуморальных факторов, биохимические показатели состояния системы соединительной ткани и т. д. Эти изменения не имеют патологического характера и продолжаются 2–3 нед, а некоторые — до 2 мес. Степень и выраженность их зависят от вида препарата и индивидуальных особенностей организма.

Профилактические прививки, особенно повторные, могут оказывать побочное сенсibiliзирующее и парасенсибилирующее действие и создавать условия для возникновения аллергических реакций. Эти побочные реакции у большинства привитых внешне ничем не проявляются и лишь в части случаев сопровождаются выраженными клиническими симптомами. Последние обычно именуется поствакцинальными реакциями.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕАКТОГЕННОСТИ

Послепрививочные реакции принято подразделять на общие и местные. К общим реакциям относят такие объективные и субъективные показатели измененного состояния организма, как повышение температуры, чувство недомогания, головная боль, расстройство сна, боли в суставах, животе, тошнота, рвота, кратковременное обморочное состояние и т. п. Показателями, характеризующими общую реакцию, являются и те изменения, которые можно выявить лабораторными методами исследования.

Под местной реакцией, как указывает сам термин, подразумевают реакции, развивающиеся непосредственно в месте введения препарата. При парентеральном способе иммунизации местная реакция может про-

являться в виде болезненности в месте введения, развития гиперемии, отека, инфильтрата, а также регионарного лимфаденита. При этом могут наблюдаться как отдельные, так и все перечисленные симптомы.

При аэрозольной, интраназальной, оральной иммунизации к местной реакции следует относить катаральные явления со стороны верхних дыхательных путей и конъюнктивит.

ОЦЕНКА И УЧЕТ ПОСЛЕПРИВИВОЧНЫХ РЕАКЦИЙ

Выраженность общей реакции принято оценивать в основном по степени повышения температуры как наиболее объективному показателю. Реакцию считают слабой при температуре 37–37,5 °С, средней — при 37,6–38,5 °С и сильной — при температуре выше 38,5 °С. К сильным общим реакциям после оспенной вакцинации относят температуру свыше 39 °С. Помимо степени повышения температуры, могут быть использованы и другие критерии, например, понижение артериального давления, рвота, кратковременное обморочное состояние после введения тифозных вакцин, диспептические расстройства после применения холерной вакцины, выраженность конъюнктивита, катаральных явлений в носоглотке, интенсивность сыпи после иммунизации коревой вакциной.

Интенсивность местной реакции, развившейся после применения корпускулярных и химических бактериальных вакцин, анатоксинов и сывороточных препаратов, оценивают следующим образом: гиперемия без инфильтрата или инфильтрат диаметром 2 см — слабая реакция, инфильтрат диаметром 2,6–5 см — реакция средней силы, инфильтрат диаметром свыше 5 см, а также инфильтрат при наличии лимфангита с лимфаденитом — сильная реакция. В отношении большинства живых бактериальных и вирусных вакцин подобной регламентированной оценки интенсивности местной реакции не имеется.

Патологические процессы, возникающие в поствакцинальном периоде, можно разбить на следующие группы:

1) собственно поствакцинальные осложнения, развитие которых явилось прямым следствием проведенной прививки (поствакцинальный энцефалит, генерализованная вакцинация, анафилактический шок и т. д.);

2) осложнения, связанные с нарушением правил асептики при производстве прививки и инокуляцией вместе с вакциной посторонних микробов;

3) обострение хронических болезней и оживление латентной инфекции (обострение туберкулеза, ревматизма, хронического гепатита,

нефрита, хронической дизентерии, бронхиальной астмы и пр.; развитие клинически выраженной менингококковой, нейровирусной и других инфекций при наличии у привитого субъекта носительства);

4) патологические процессы, связанные с интеркуррентной инфекцией, присоединившейся в поствакцинальном периоде; в этих случаях вакцинальный процесс может способствовать утяжелению и осложненному течению интеркуррентной инфекции (например, респираторной вирусной, стафилококковой, менингококковой и др.). В свою очередь, интеркуррентная инфекция может обусловить более тяжелое течение вакцинального процесса.

ОСНОВНЫЕ КЛИНИЧЕСКИЕ ФОРМЫ ПОСТВАКЦИНАЛЬНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ

Согласно современным представлениям, в генезе большинства поствакцинальных осложнений, развившихся после введения вакцинных и сывороточных препаратов, основная роль принадлежит аллергическим процессам. Подобного рода аллергические реакции чаще всего возникают в тех случаях, когда вакцинации подвергают субъекта, организм которого находится в состоянии аллергической перестройки, неспецифической сенсibilизации, вызванной различными факторами (инфекции, лекарственные вещества, различные предшествующие вакцинации и т. д.).

В этих случаях, как и при специфической сенсibilизации, могут возникать реакции аллергического характера: полиморфная сыпь, отек Квинке, артралгии, бурные общие реакции вплоть до анафилактического шока, наконец, нервные поражения, в том числе поствакцинальный энцефалит.

Анафилактический шок является наиболее тяжелой формой общей аллергической реакции немедленного типа, развивающейся чаще всего при повторном парентеральном введении сывороток, реже — вакцин. Однако анафилактический шок может возникнуть и при первичном введении указанных препаратов как проявление неспецифической параллергии, причем разрешающая доза препарата, вводимая повторно или первично и провоцирующая внезапное появление симптомов шока, может быть чрезвычайно мала (например, 0,1–0,2 мл в случаях шока, вызываемого постановкой кожной пробы с сывороткой). Степень выраженности отдельных симптомов шока может быть различной — от легких проявлений до молниеносных смертельных форм.

С целью предупреждения анафилактического шока необходимо соблюдать следующие предосторожности:

1) перед назначением препарата, который может быть аллергеном, необходимо выяснить анамнестические данные, касающиеся как данного препарата, так и вообще аллергического анамнеза субъекта, которому предполагается введение вакцины или сыворотки;

2) при необходимости введения указанных препаратов лицам с неблагоприятным в отношении аллергии анамнезом одновременно ввести парентерально антигистаминные вещества или новокаин;

3) дробно (по способу Безредки или его модификации) вводить лечебные и профилактические сыворотки после предварительного испытания чувствительности к чужеродному белку.

Эндотоксинный шок наблюдается после введения убитых бактериальных вакцин (как при первичном, так и повторном введении) как проявление повышенной чувствительности организма к эндотоксину. Эндотоксинный шок в отличие от анафилактического, возникающего после введения сывороток, развивается обычно более медленно.

Сывороточная болезнь возникает как проявление аллергической реакции на чужеродный белок при парентеральном введении содержащих его препаратов, чаще всего антитоксических (особенно лошадиных) сывороток.

Хотя сывороточная болезнь обычно заканчивается выздоровлением, все же она не безразлична для организма, так как может ухудшать течение основного заболевания, провоцировать обострение латентно протекающих процессов, например, таких, как ревматизм и др., и изменять реактивность организма в сторону снижения его сопротивляемости по отношению к инфекции. У детей клинические проявления болезни выражены тем слабее, чем младше ребенок.

Инкубационный период сывороточной болезни зависит от того, первично или повторно введена сыворотка. При первом введении он колеблется от 7 до 12 дней. При повторном (интервал 12–40 дней) сывороточная реакция может возникнуть немедленно (через несколько минут или часов) или по типу ускоренной реакции (интервал 1/2–6 мес и больше), т. е. через 3–6 дней после введения сыворотки. Однако изредка и при первичном введении может наблюдаться ускоренная реакция, особенно у лиц с аллергически измененной реактивностью.

Аллергические реакции со стороны кожи (сыпь и отеки) наиболее часто наблюдаются после введения АКДС, оспенной, антирабической, реже — после применения других вакцин.

Неврологические поствакцинальные осложнения могут проявляться в форме поражения как центральной нервной системы (энцефалит, менингоэнцефалит и т. д.), так и периферической (моновневрит, полиневрит, полирадикулоневрит и пр.).

Местные реакции на прививки (помимо специфических при оспопрививании и вакцинации против туберкулеза и указанных выше аллергических) чаще наблюдаются при введении адсорбированных препаратов (например, вакцины АКДС) и заключаются в образовании в глубине мягких тканей плотных инфильтратов (стерильные абсцессы). В некоторых случаях при проникновении гнойной инфекции (экзогенным или эндогенным путем) на месте инфильтрата могут возникнуть абсцесс, флегмона, рожа. В очень редких случаях последние могут послужить источником генерализации инфекции и последующего развития септического состояния, вплоть до септикопиемии. Подобного рода осложнения могут быть вызваны и внесением в организм инфекции вместе с вакциной при нарушении правил асептики.

ИММУНОТРОПНЫЕ ПРЕПАРАТЫ

Существуют разнообразные способы модуляции иммунных реакций. Эти способы условно можно разделить на методы иммуностимуляции и иммунодепрессии. Стратегия вмешательства в деятельность иммунной системы в первую очередь зависит от того иммунологического эффекта, который нуждается в коррекции. В некоторых случаях иммунной недостаточности возможно проведение заместительной терапии (введение гормонов тимуса, пересадка костного мозга и др.), но чаще возникает необходимость усиления либо подавления тех или иных иммунных реакций. С этой целью могут применяться как различные препараты, обладающие иммуностропной активностью, так и немедикаментозные методы воздействия. К иммуностропным препаратам относятся иммуностимуляторы, или иммунокорректоры, и иммунодепрессанты; кроме того, принято выделять противовоспалительные препараты.

Иммуностимулирующие препараты

Стимуляторы Т-лимфоцитов: тактивин, тималин, тимоген, тимоптин, вилозен, декарис, диуцифон, нуклеинат натрия, цинка ацетат, спленин.

Стимуляторы В-лимфоцитов: миелопид, продигозан, пирогенал.

Стимуляторы фагоцитоза: нуклеинат натрия, метилурацил (стимулирует также Т- и В-лимфоциты), полиоксидоний.

Стимуляторы эндогенного интерферона: дибазол, арбинол.

Кроме перечисленных иммунокорректоров, следует отметить следующие группы лекарственных средств:

- ✓ иммуноглобулины — интраглобулин Ф, сандоглобулин (препараты IgG) показаны для заместительной терапии при врожденных

и приобретенных дефицитах синтеза антител, профилактики и лечения инфекций, при хроническом лимфолейкозе; пентаглобулин (препарат IgM) показан для заместительной терапии и стимуляции фагоцитов;

- ✓ цитокины — роферон (препарат интерферона); ИЛ-1, ИЛ-2 (препараты интерлейкинов); лейкинферон, лейкомакс или молграмостин (препараты на основе комбинации интерферона и интерлейкинов);
- ✓ микробные субстраты — гликопин (препарат на основе микробных гликопротеинов); рибомунил (препарат на основе микробных рибосом); имудон, IRS-19 (препараты на основе лизатов микроорганизмов) стимулируют противомикробный иммунитет, повышая фагоцитарную активность нейтрофилов и макрофагов, активизируя синтез ИНФ α , ИЛ-1, ИЛ-6 и продукцию IgA, нормализуя соотношение Т- и В-лимфоцитов;
- ✓ адьюванты — гидроокись алюминия, алюмокалиевые квасцы, компоненты бактериальной клетки (эндотоксины, липополисахариды, протеин А), поликатионы, полианионы, производные поливинилпирролидона применяются в качестве компонентов вакцин для усиления иммунного ответа на слабые антигены за счет стимуляции фагоцитоза и поликлональной стимуляции Т- и В-лимфоцитов;
- ✓ биогенные стимуляторы (адаптогены) — экстракт алоэ, биосед, ФиБС, взвесь плаценты, сок каланхоэ, румалон, стекловидное тело, препараты женьшеня, пантокрин, элеутерококка, родиолы розовой, чабреца, чаги показаны при гипотрофических и атрофических процессах.

Глюкокортикостероидные гормоны (преднизолон, дексаметазон, преднизолона ацетат и др.) являются физиологическими регуляторами деятельности иммунной системы. Активированные гормоном глюкокортикостероидные рецепторы изменяют транскрипцию многих генов, что влечет за собой модификацию иммунного ответа. При этом направленность действия ГКС зависит от их концентрации в крови. При тяжелом стрессе или при длительном воздействии умеренных стрессовых нагрузок, когда в крови повышается количество ГКС, функции иммунной системы могут существенно угнетаться. При этом снижается показатель CD4/CD8, содержание секреторного IgA в слюне, интенсивность пролиферативного ответа лимфоцитов на антигены и митогены, угнетаются функции неспецифического иммунитета. Кроме того, ГКС модулируют практически все функции макрофагов: снижают уровень свободнорадикального окисления и активность протеолитических ферментов, продукцию цитокинов. Высокие дозы ГКС могут угнетать функцию антителообразующих клеток.

Основными показаниями для применения ГКС в клинике являются различные аутоиммунные заболевания, тяжелые случаи аллергопатологии. Кроме того, ГКС используются в иммунодепрессивной терапии при трансплантации органов.

Нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП)

Аспирин (салицилаты) подавляет синтез простагландинов; применяется для лечения инфекционно-аллергических, аутоиммунных заболеваний.

Индометацин, инбуклин, ибупрофен и др. применяются при системных васкулитах и других аутоиммунных заболеваниях.

Препараты золота, D-пеницилламин и противомаларийные препараты применяются при ревматоидном артрите и некоторых других заболеваниях.

Иммунодепрессанты

Большинство из применяемых иммунодепрессантов является цитостатиками, которые были созданы для химиотерапии злокачественных новообразований. Данные препараты могут быть классифицированы в зависимости от механизма действия или источника получения. Принято различать антиметаболиты, алкилирующие препараты, антибиотики, алкалоиды и ингибиторы ферментов (табл. 25). Применение иммунодепрессантов вызывает развитие многих осложнений. Кроме специфических для отдельных препаратов побочных реакций, практически любая иммунодепрессивная терапия может вызвать: угнетение гемопоэза; снижение сопротивляемости инфекциям; возможное тератогенное действие; провокацию злокачественного роста.

ЗАДАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ЗАНЯТИЮ

1. Приготовление убитой стафилококковой аутовакцины (имитационная постановка).

Убитую аутовакцину готовят из штамма возбудителя, выделенного непосредственно от больного. Этапы приготовления:

- ✓ посев стафилококка в пробирку со скошенным питательным агаром;
- ✓ проверка чистоты выросшей культуры — приготовьте мазок со скошенного МПА, окрасьте по Граму, промикроскопируйте;
- ✓ получение маточной взвеси микробных клеток — смойте культуру 5 мл изотонического раствора хлорида натрия;
- ✓ прогревание бактериальной взвеси на водяной бане: температура прогревания 80 °С, время прогревания 30 мин;
- ✓ контроль на стерильность — высейте на МПА каплю прогретой взвеси бактерий;

Основные группы иммунодепрессантов

Группа	Препараты	Механизм действия	Применение в иммуномодулирующей терапии
Антиметаболиты	Меркаптопурин	Ингибирует синтез ДНК, являясь структурным аналогом предшественников нуклеиновых кислот (аденина, гипоксантина), в результате чего тормозится клеточное деление	Для лечения острого лейкоза; для лечения аутоиммунных заболеваний (гемолитическая анемия, коллагенозы и др.)
	Азатиоприн (имурель, имуран)	Нарушает синтез нуклеиновых кислот, особенно РНК; нарушает процесс распознавания антигена за счет торможения развития циторецепторов на лимфоидных клетках	Для подавления реакции тканевой несовместимости при трансплантации почек; для лечения аутоиммунных заболеваний (системная красная волчанка, гемолитическая анемия, ревматоидный артрит, бронхиальная астма и др.)
Алкилирующие соединения	Циклофосфамид (циклофосфан, эндоксан)	Нарушает процессы репликации и транскрипции за счет ковалентного связывания алкильных группировок с пиримидиновыми и пуриновыми основаниями	Для лечения острых лейкозов, злокачественных лимфом, рака молочной железы, матки и др. злокачественных опухолей
	Хлорбутин (хлорамбуцил, амбохлорин, лейкеран)	Нарушает процессы репликации и транскрипции за счет ковалентного связывания алкильных группировок с пиримидиновыми и пуриновыми основаниями	Для преодоления тканевой несовместимости; для лечения аутоиммунных заболеваний; для лечения хронического лимфолейкоза, лимфогранулематоза, рака яичников и др. злокачественных опухолей
Антибиотики	Актиномицин D	Тормозит деление клеток, а также ДНК-зависимый синтез РНК за счет образования комплекса с ДНК	Для подавления кризов отторжения при трансплантации почки, реже других органов
	Митомицин С	См. Алкилирующие соединения	Для лечения рака мочевого пузыря и желудка в онкологии
	Циклоспорин (циклоспорин А, сандиммун)	Подавляет клеточные иммунные реакции и зависимое от Т-лимфоцитов образование антител за счет подавления продукции ИЛ-2 Т-хелперами	При пересадке органов в трансплантологии
Антилимфоцитарные антитела	Антилимфоцитарные сыворотки (АЛС)	1) элиминация Т-лимфоцитов; 2) инактивация Т-клеточных рецепторов	Для купирования кризов отторжения при трансплантации; для лечения тяжелой аутоиммунной анемии

- ✓ стандартизация вакцины по оптическому стандарту: 1 мл прогретой микробной взвеси разведите стерильным изотоническим раствором хлорида натрия, сравнивая ее мутность с мутностью оптического стандарта № 10 (1 млрд. микробных тел в 1 мл), остальной объем взвеси бактерий разведите, добавляя соответствующее количество изотонического раствора хлорида натрия;
- ✓ упаковка вакцины — разлейте вакцину в ампулы по 1 мл и запаяйте их в пламени газовой горелки;
- ✓ этикетировка вакцины — оформите этикетку вакцины:

Министерство охраны здоровья Украины
 Национальный фармацевтический университет
 Кафедра микробиологии
 Стафилококковая вакцина (убитая)
 1 мл содержит 1 млрд. микробных тел

Дата изготовления
 Изготовитель
 Хранить при температуре 2–10 °С

2. Титрование дифтерийной антитоксической сыворотки методом флоккуляции по Рамону.

В результате взаимодействия токсина или анатоксина с антитоксической сывороткой выпадают хлопья флоккулята. Наиболее интенсивная и ранняя («инициальная») флоккуляция происходит в пробирке, где антиген и антитело содержатся в эквивалентных соотношениях. Реакцию ставят в два этапа:

1 — по стандартной сыворотке устанавливают количество Lf (Limes flocculation) в 1 мл токсина. Lf токсина определяется его количеством, которое дает «инициальную» флоккуляцию с международной единицей (МЕ) сыворотки. Установив силу токсина, приступают к определению силы сыворотки.

2 — в ряд пробирок наливают по 2 мл известной силы токсина и испытуемую антитоксическую сыворотку в количестве 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 мл (табл. 26). Пробирки выдерживают на водяной бане при температуре 45 °С в течение 30 мин до проявления «инициальной» флоккуляции (опалесценция, переходящая в помутнение). «Инициальная» флоккуляция проявляется в той пробирке, где количество токсина соответствует количеству международных единиц сыворотки.

3. Получение антителообразующих гибридом методом слияния В-лимфоцитов селезенки и миеломных клеток мышей.

После иммунизации мышей антигеном антитела вырабатываются главным образом В-лимфоцитами селезенки. В-лимфоциты не могут длительно культивироваться *in vitro* и после нескольких делений гибнут.

Клетки же лимфоидных опухолей костного мозга (плазмоцитом или миелом) обладают способностью бесконечно культивироваться *in vitro*.

Таблица 26

Схема титрования антитоксической сыворотки методом флоккуляции по Рабону

Ингредиенты	№ пробирки			
	1	2	3	4
Антитоксическая сыворотка, мл	0,1	0,2	0,3	0,4
Токсин, мл	2,0	2,0	2,0	2,0
Результаты				

Для того чтобы получить антителопродуцирующие клетки, синтезирующие моноклональные антитела известной специфичности (к определенному антигену), проводят гибридизацию В-лимфоцитов, выделенных от иммунизированных антигеном животных, и миеломных клеток. Полученные антителопродуцирующие клетки называются гибридами.

Этапы получения антителообразующих гибридом:

1. Иммунизация мышей антигеном.

Мышам многократно, по определенной схеме, вводят антиген внутривенно, внутримышечно или внутрибрюшинно. Для иммунизации подходят любые схемы введения антигена, которые стимулируют формирование гуморального иммунного ответа, опосредованного В-лимфоцитами селезенки. Клетки селезенки получают, как правило, на 4 день после последней инъекции антигена.

2. Получение клеток селезенки мышей:

а) убейте мышь цервикальной дислокацией или усыпите в сосуде (15 мин с эфиром при закрытой крышке);

б) закрепите мышь на парафиновой панели, вскройте брюшную полость, извлеките пинцетом селезенку (с соблюдением правил асептики) и поместите в гомогенизатор, в который предварительно внесите 5 мл среды для слияния клеток (содержит аминокислоты, витамины, углеводы, неорганические соли);

в) получите суспензию клеток селезенки, растирая ее пестиком о стенки гомогенизатора. Из каждой селезенки обычно получают $5 \cdot 10^7$ клеток;

г) отберите стерильной пипеткой 1 каплю взвеси клеток из гомогенизатора, приготовьте препарат «раздавленная капля» и промикроскопируйте клетки;

д) перенесите полученную суспензию клеток селезенки в стерильные центрифужные пробирки и отмойте их при центрифугировании. Для этого клетки осадите в течение 5 мин при 1500 об/мин, слейте надосадочную жидкость в колбу-приемник, ресуспендируйте осадок в 1 мл среды для слияния.

3. Гибридизация и культивирование гибридом:

а) внесите к 1 мл полученной суспензии клеток селезенки равный объем взвеси миеломных клеток (концентрация 10 клеток/мл), тщательно перемешайте и осадите клетки центрифугированием в течение 5 мин при 1500 об/мин;

б) надосадочную жидкость слейте в колбу-приемник, осадок клеток ресуспендируйте в 1–2 каплях среды для слияния, добавьте по каплям 1 мл полиэтиленгликоля (ПЭГ) и 4 мл среды того же состава, добиваясь равномерного распределения клеток во всем объеме;

в) осадите клетки при центрифугировании указанным выше способом и слейте надосадочную жидкость в колбу-приемник;

г) осадок аккуратно ресуспендируйте в 10 мл селективной среды, содержащей гипоксантин, аминоптерин и тимидин (ГАТ), которая способствует выживанию только гибридных клеток;

д) отберите из суспензии пробы по 0,2 мл и внесите в лунки микропланшет. Культуры клеток инкубируют в атмосфере CO_2 при 37 °С в течение 15–18 суток. Начиная с 4 дня, необходимо менять питательную среду в лунках. Быстрорастущие клоны в виде плотных колоний клеток становятся различимыми на 5–6 день. Контроль за образованием клонов осуществляют с помощью инвертированного микроскопа. По окончании культивирования проверяют антителообразующую способность клонов иммуноферментным анализом (ИФА).

4. Оформите протокол занятия.

Часть II

**Специальная
микробиология**



Тема: ПАТОГЕННЫЕ КОККИ

Цель: Знать принципы микробиологической диагностики заболеваний, вызванных патогенными кокками; изучить методы дифференциации и идентификации стафилококков, стрептококков и патогенных нейссерий; ознакомиться с препаратами для химио- и иммунотерапии вызываемых ими инфекций.

К патогенным коккам относят стафило-, стрепто-, менинго- и гонококки. Несмотря на различия в таксономической принадлежности и степени органотропности, они объединены рядом общих признаков: шаровидной формой, способностью вызывать гнойно-воспалительные процессы. Дифференциация и идентификация патогенных кокков проводится по морфологическим, культуральным, ферментативным и токсигенным свойствам.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Стафилококки: таксономическое положение, классификация, морфологические и культуральные особенности.
2. Факторы вирулентности. Роль стафилококков в инфекционной патологии человека.
3. Методы лабораторной диагностики стафилококковых инфекций.
4. Меры профилактики стафилококковых заболеваний. Химиотерапевтические и иммунобиологические препараты для их лечения.
5. Стрептококки: таксономическое положение, классификация, морфологические и культуральные особенности.
6. Факторы вирулентности. Нагноительные и ненагноительные стрептококковые инфекции.
7. Методы лабораторной диагностики стрептококковых заболеваний.
8. Профилактика и лечение стрептококковых инфекций.
9. Патогенные нейссерии, их общая характеристика.

10. Менингококк, его биологические особенности: морфологические, культуральные, ферментативные, токсинообразовательные.

11. Эпидемиология, патогенез, клиника, лабораторная диагностика, профилактика и лечение менингококковых инфекций.

12. Гонококк, его морфологические, культуральные, ферментативные, антигенные свойства. Характер токсинообразования.

13. Эпидемиология, патогенез, клиника, лабораторная диагностика, терапия и профилактика гонореи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дикий И.Л., Холуляк И.Ю., Шевелева Н.Е., Стегний М.Ю. Микробиология.— Х.: Прапор: Изд-во УкрФА, 1999.— С. 26, 214–224.

2. Елинов Н.П., Заикина Н.А., Соколова И.П. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии.— М.: Медицина, 1988.— С. 20, 133–141.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА СТАФИЛОКОККОВЫХ ИНФЕКЦИЙ

Используют: бактериоскопический и бактериологический методы исследований.

Бактериоскопический метод. В качестве материала при очаговой инфекции для исследования берут гнойное отделяемое, в случае сепсиса — кровь. Из исследуемого материала готовят мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют. Предварительный диагноз основывается на выявлении грамположительных шаровидных кокков размером 0,5–1,5 мкм, располагающихся беспорядочными скоплениями, короткими цепочками, попарно или одиночно (см. цв. вкл. XI).

Бактериологический метод. Проводят посев исследуемого материала (гной, мокрота, моча, кровь, в случае пищевых отравлений — рвотные массы, промывные воды желудка, испражнения, продукты) на МПБ и элективные среды: желточно-солевой, молочно-солевой агары, для выявления гемолитических свойств — на кровяной агар.

Выделенную чистую культуру идентифицируют по морфологическим, культуральным, биохимическим свойствам и токсигенности. Для выявления вирулентных штаммов: ставят коагулазный тест в реакции плазмокоагуляции с цитратной кроличьей плазмой; определяют способность продуцировать термостабильную ДНКазу при посеве на содержащий ДНК МПА; определяют фосфатазу, ацетоин; изучают ферментацию мочевины и углеводов.

При необходимости определения источника инфекции проводят фаготипирование. Для этого на засеянную газоном культуру стафилококка на МПА наносят по капле взвеси типовых бактериофагов, термо-

статируют в течение 18–20 ч, а затем учитывают результаты по появлению зон лизиса стафилококка в месте нанесения соответствующего типового бактериофага. Таким образом типировается до 80 % выделенных штаммов.

ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ СТАФИЛОКОККОВЫХ ИНФЕКЦИЙ

В связи с множественной устойчивостью клинических штаммов возбудителей к химиотерапевтическим препаратам перед началом этиотропной терапии необходимо определение антибиотикочувствительности выделенного штамма стафилококка.

Химиотерапевтические схемы лечения инфекций, которые обусловлены стафилококками, чувствительными к метициллину (оксациллину) и устойчивыми к метициллину (оксациллину), различны. Для лечения первой группы стафилококковых инфекций могут быть использованы антибиотики: цефалоспорины I–4 поколения, полусинтетические пенициллины, устойчивые к пенициллиназам (метициллин, оксациллин), аминопенициллины в сочетании с ингибиторами β -лактамаз (амоксциллин/клавуланат, ампициллин/сульбактам), карбапенемы, гликопептиды, фторхинолоны, аминогликозиды, макролиды, миноциклин, триметоприм/сульфаметоксазол. Химиотерапевтический спектр воздействия на метициллинустойчивые стафилококки очень узок и включает: гликопептиды (ванкомицин, тейкопланин) и фузидиевую кислоту.

При хронических формах стафилококковых инфекций рекомендуют аутовакцину, представляющую собой инактивированную взвесь чистой культуры клинического штамма, выделенного от данного пациента, а также стафилококковую инактивированную поливалентную вакцину из взвеси коагулазоположительных штаммов стафилококка.

Для иммунотерапии хронических стафилококковых инфекций применяют также антифагин стафилококковый (фильтрат культур инактивированных вирулентных штаммов стафилококков).

Для лечения стафилококковых инфекций и их профилактики у беременных, новорожденных, ослабленных лиц с иммунодефицитом используется очищенный, адсорбированный на гидроксиде алюминия стафилококковый анатоксин.

В случаях тяжелых интоксикаций и сепсиса показано применение человеческого антистафилококкового иммуноглобулина из крови доноров, иммунизированных стафилококковым анатоксином.

Для лечения и санации стафилококконосителей местно и парентерально используют стафилококковый бактериофаг.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА СТРЕПТОКОККОВЫХ ИНФЕКЦИЙ

Используют: бактериоскопический, бактериологический, серологический и биологический методы исследований.

Бактериоскопический метод. В качестве материала для исследования берут гнойное отделяемое, мокроту, в случае сепсиса — кровь. Из исследуемого материала готовят мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют. Предварительный диагноз основывается на выявлении грамположительных шаровидных кокков размером 0,6–1,0 мкм, располагающихся преимущественно цепочками и попарно.

Бактериологический метод. Проводят посев исследуемого материала (гной, мокрота, моча, кровь и др.) на специальные среды: сахарный бульон и агар, для выявления гемолитических свойств — на кровяной агар.

Выделенную чистую культуру идентифицируют по морфологическим, культуральным, биохимическим, антигенным и токсигенным свойствам. Наиболее важными тестами являются: вид гемолиза на кровяном агаре; каталазная активность; чувствительность к бацитрацину, сульфаметоксазолу и триметоприму; CAMP-тест; гидролиз гиппурата натрия; желчно-эскулиновый тест; рост в бульоне с 6,5 % NaCl; наличие пирролидонилариламидазы (PYR) и характер группового полисахаридного антигена.

По картине гемолиза на кровяном агаре стрептококки делят на три группы. β -гемолитические стрептококки вызывают полный лизис эритроцитов, наблюдаемый в виде полного просветления среды вокруг колонии. α -гемолитические или «зеленящие» стрептококки вызывают частичный гемолиз и образуют колонии, окруженные зоной зеленоватого оттенка, что обусловлено превращением гемоглобина в метгемоглобин. Третью группу составляют стрептококки, не вызывающие гемолиза на кровяном агаре.

Каталазная активность определяется по выделению пузырьков газа при смешивании исследуемой культуры с каплей 3–10 % раствора перекиси водорода на предметном стекле.

Чувствительность к вышеуказанным химиопрепаратам исследуют методом индикаторных («бумажных») дисков.

CAMP-тест основан на способности стрептококков продуцировать экстрацеллюлярный протеин, усиливающий лизис эритроцитов на кровяном агаре при совместном культивировании с золотистым стафилококком, продуцирующим β -лизин.

Для определения гидролиза гиппурата натрия петлю чистой культуры исследуемого штамма суспендируют в 0,4 мл 1 % водного раствора

гиппурата натрия, а через 2 ч инкубации добавляют 0,2 мл 3,5 % раствора нингидрина в смеси бутанола и ацетона (1:1). Положительным результатом является пурпурное окрашивание в течение 10 мин.

Для проведения желчно-эскулинового теста исследуемую культуру засевают на питательный агар с 40 % желчи, 0,1 % эскулина и 0,05 % цитрата железа. Положительным результатом является образование в питательной среде комплекса темно-коричневого цвета.

С целью обнаружения фермента пирролидонилариламидазы (PYR) исследуемую культуру засевают на питательный бульон, содержащий 0,01 % L-пирролидонил- β -нафтиламида. Положительной реакцией считают ярко-красное окрашивание среды при добавлении капли диметиламиноацетинальдегида через 4 ч.

Антигенную дифференциацию стрептококков проводят по группоспецифическому полисахариду клеточной стенки с помощью антигенных диагностикумов в реакциях преципитации и латекс-агглютинации.

Серологический метод. Для обнаружения пиогенного стрептококка в патологическом материале применяют реакцию коаггутинации и прямую реакцию иммунофлуоресценции (РИФ).

Реакция коаггутинации основывается на применении группоспецифических антител, сорбированных на клетках золотистого стафилококка, против β -гемолитического стрептококка. Тампон с исследуемым материалом вначале опускают в раствор для экстрагирования полисахаридного стрептококкового антигена. Затем полученный экстракт на предметном стекле смешивают с диагностикумом и через 2–3 мин учитывают результат. Положительной реакцией является выпадение хлопьев и просветление взвеси.

Для постановки РИФ используют меченные флуорохромом противострептококковые антитела. Реакцию используют для экспресс-диагностики в нативном материале и идентификации чистой культуры возбудителя.

Биологический метод. Используют для диагностики пневмококковых инфекций. С этой целью внутрибрюшинно заражают белых мышей, обладающих высокой чувствительностью к возбудителю, а затем через 1–5 дней из органов погибших животных делают мазки-отпечатки, проводят посев крови и перитонеального экссудата на питательные среды. Предварительный диагноз ставят при обнаружении ланцетовидных диплококков, окруженных капсулой (отличительная особенность *S. pneumoniae*). Последующую идентификацию проводят путем бактериологических и серологических исследований.

ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ СТРЕПТОКОККОВЫХ ИНФЕКЦИЙ

Для химиотерапии применяют антибиотики: природные и полусинтетические пенициллины, цефалоспорины, макролиды. В связи с малой чувствительностью возбудителей не применяют аминогликозиды и фторхинолоны.

При хронических формах рекомендуют использование аутовакцин и убитых поливалентных вакцин из вирулентных штаммов возбудителя.

Для лечения может быть использован стрептококковый бактериофаг жидкий, представляющий собой фильтрат фаголизата стрептококка.

Для специфической профилактики пневмококковых инфекций разработана поливалентная вакцина из 23 полисахаридных сероваров возбудителя. Иммунизация групп риска проводится двукратно с 5–10-летним интервалом.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА МЕНИНГОКОККОВЫХ ИНФЕКЦИЙ

Используют: бактериоскопический, бактериологический и серологический методы исследований.

Бактериоскопический метод. В качестве материала для исследования берут смыв с носоглотки, спинномозговую жидкость. Из исследуемого материала готовят мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют. Предварительный диагноз основывается на выявлении граммотрицательных бобовидных кокков размером 0,6–1,0 мкм, располагающихся попарно вогнутыми сторонами друг к другу, напоминая вид кофейных зерен.

Бактериологический метод. Проводят посев исследуемого материала (ликвор, кровь, смывы носоглотки) на специальные среды, содержащие кровь или сыворотку человека.

Выделенную чистую культуру идентифицируют по морфологическим, культуральным, биохимическим и антигенным свойствам.

ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ МЕНИНГОКОККОВЫХ ИНФЕКЦИЙ

Для лечения применяют антибиотики: природные и полусинтетические пенициллины, монобактамы, карбапенемы, цефалоспорины 2–4 поколения, рифампицин, сульфаниламиды, фторхинолоны.

С целью экстренной пассивной иммунопрофилактики лиц, находившихся в контакте с больным, можно использовать нормальный человеческий иммуноглобулин, дающий защиту в течение месяца.

Для специфической активной профилактики разработаны субъединичные менингококковые вакцины с высокими протективными свойствами на основе капсульных полисахаридов менингококков групп А и С. При этом иммунная защита обеспечивается комплементсвязывающими антителами в течение 5 лет.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ГОНОРЕИ

Используют: бактериоскопический, бактериологический и серологический методы исследований.

Бактериоскопический метод. В качестве материала для исследования берут гнойное отделяемое уретры, влагалища, шейки матки, предстательной железы, осадок мочи, сперму. Из исследуемого материала готовят мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют. Основание для идентификации дает обнаружение грамтрицательных бобовидных диплококков размером 0,7–0,8 мкм в виде кофейных зерен, располагающихся внутриклеточно (явление незавершенного фагоцитоза, характерное для гонореи) (см. цв. вкл. X).

Бактериологический метод. Проводят посев исследуемого материала (ликвор, смывы носоглотки) на специальные среды, содержащие сыворотку крови человека и асцитическую жидкость. Выделенную чистую культуру идентифицируют по морфологическим, культуральным, биохимическим свойствам.

Серологический метод. В сомнительных случаях, требующих уточнения диагноза, используют высокоспецифические методы прямой и непрямой иммунофлуоресценции. При хронической гонорее для диагностики используют РСК и реакцию непрямой гемагглютинации.

ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ ГОНОРЕИ

Для этиотропной терапии применяют антибиотики: полусинтетические пенициллины, цефалоспорины, амоксициллин/клавуланат, ампициллин/сульбактам, монобактамы, карбапенемы, фторхинолоны, триметоприм/сульфаметоксазол.

При хронических формах рекомендуют применение аутовакцины, убитой гретой гонококковой вакцины, проведение аутогемотерапии. В качестве иммуномодуляторов используют продигиозан, метилурацил.

ЗАДАНИЯ К ЛАБОРАТОРНЫМ ЗАНЯТИЯМ

1. Приготовить мазок из чистых культур авирулентных штаммов стафилококка золотистого, стрептококка пиогенного, окрасить по Граму, промикроскопировать, зарисовать.

2. Промикроскопировать готовые демонстрационные мазки гонококков в гное, окрашенные по методу Грама и метиленовым синим. Отметить характер расположения возбудителей в мазке (незавершенный фагоцитоз гонококков) и окраски по Граму.

3. Промикроскопировать демонстрационные мазки менингококков, обработанные иммунофлуоресцентными сыворотками, в люминесцентном микроскопе.

4. Поставить реакцию связывания комплемента, используемую для серодиагностики гонорей и менингита.

5. Изучить и записать схему бактериологического анализа при кокковых инфекциях.

6. Ознакомиться с препаратами для диагностики, лечения и специфической профилактики кокковых инфекций.

Тема: ВОЗБУДИТЕЛИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ — ЭШЕРИХИОЗОВ, БРЮШНОГО ТИФА, ПАРАТИФОВ А И В, САЛЬМОНЕЛЛЕЗОВ, ДИЗЕНТЕРИИ, ХОЛЕРЫ

Цель: Уметь охарактеризовать морфологические, культуральные, ферментативные, антигенные и другие свойства возбудителей эшерихиозов, сальмонеллезов, брюшного тифа и паратифов, холеры; знать эпидемиологию (источник, механизм и пути передачи), особенности патогенеза и клинического течения; знать принципы лабораторной диагностики, лечения и профилактики кишечных инфекций.

Возбудители бактериальных кишечных инфекций относятся к семейству Enterobacteriaceae, включающему 12 родов.

Возбудители эшерихиозов — *Escherichia coli* относятся к роду *Escherichia*. Возбудители брюшного тифа — *Salmonella typhi*, паратифов А и В — *Salmonella paratyphi A*, *Salmonella schottmuelleri*, а также возбудители сальмонеллезов — *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella cholerae suis* и др. относятся к роду *Salmonella*.

Возбудители дизентерии — *Shigella Flexneri*, *Shigella Sonnei*, *Shigella disenteriae* и др. относятся к роду *Shigella*.

Возбудитель холеры — *Vibrio cholerae* относится к семейству *Vibrionaceae* рода *Vibrio*.

Все представители семейства Enterobacteriaceae имеют общие морфологические, тинкториальные свойства, общую антигенную структуру, не образуют спор; факультативные анаэробы.

Кишечные инфекции имеют общие признаки: заражение через рот, поражение пищеварительного тракта, выделение возбудителя с фекалиями и др. Клиническое течение заболеваний, общие свойства, присутствующие энтеробактериям, механизм заражения затрудняют дифференциальную диагностику кишечных инфекций.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Таксономия возбудителей кишечных инфекций.
2. Морфология и тинкториальные свойства.

3. Культуральные свойства кишечной палочки, сальмонелл, шигелл, холерного вибриона.
4. Ферментативные свойства.
5. Антигенная структура возбудителей бактериальных кишечных инфекций.
6. Факторы вирулентности и резистентности.
7. Источник, механизм и пути передачи кишечных инфекций.
8. Патогенез и клиника эшерихиозов, брюшного тифа, паратифов А и В, сальмонеллез, дизентерии, холеры.
9. Иммуитет.
10. Принципы лабораторной диагностики кишечных инфекций.
11. Лечение и профилактика.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дикий И.Л., Холупяк И.Ю., Шевелева Н.Е., Стегний М.Ю. Микробиология.— Х.: Прапор: Изд-во УкрФА, 1999.— С. 224–236. 242–247.
2. Елинов Н.П., Заикина Н.А., Соколова И.П. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии.— М.: Медицина, 1988.— С. 142–153.

МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

Бактериологически исследуют: рвотные массы, промывные воды желудка и кишок, фекалии, мочу, желчь, гной или экссудат из очагов воспаления (при сальмонеллезе, эшерихиозе, шигеллезе); отделяемое из скарифицированных розеол, в отдельных случаях пунктат костного мозга, спинномозговую жидкость, некротизированные ткани (при брюшном тифе, паратифах А и В); а также пищевые продукты, подозреваемые в качестве источников инфекции — остатки пищи, продукты, из которых она готовилась, смывы со столов, разделочных досок, с рук обслуживающего персонала и др. (при пищевых токсикоинфекциях).

Для исследований выбирают наиболее измененные частицы свежих испражнений (слизь, прожилки крови, гной). Материал, который не может быть посеян без предварительной обработки (фекальные и рвотные массы густой консистенции, остатки пищи и др.), растирают в фарфоровых ступках и суспендируют в изотоническом растворе натрия хлорида.

СРЕДЫ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ МИКРОБОВ СЕМЕЙСТВА КИШЕЧНЫХ

Для выделения патогенных бактерий семейства кишечных применяют среды, которые позволяют их дифференцировать от постоянных обитателей кишечника — микробов, разлагающих лактозу. Это так на-

зываемые дифференциальные среды. Имеется несколько групп дифференциальных сред.

Среды первой группы содержат лишь лактозу и индикатор (среды с красным конго, бромкрезоловым пурпурным и др.). Они не обладают элективными свойствами для палочек семейства кишечных. На них растут также грамположительные микробы и вульгарный протей.

Бромкрезоловая среда имеет сине-фиолетовый цвет, содержит лактозу, спиртовой раствор бромкрезолового пурпурного и спирто-водный раствор метиленового синего. На этой среде колонии кишечной палочки имеют зеленый цвет, а колонии сальмонелл и шигелл — сине-голубой.

Среды второй группы — так называемые элективные — содержат дополнительные вещества (малахитовый зеленый, бриллиантовый зеленый, желчь, метиленовый синий), которые задерживают рост грамположительных микробов. Среди них наиболее широкое применение имеют среды Эндо и Левина.

Среда Эндо применяется при исследованиях на сальмонеллы и патогенные серотипы кишечной палочки; содержит лактозу и в качестве индикатора фуксин, обесцвеченный сульфитом натрия. Горячий агар имеет бледно-розовый цвет, при застывании он становится бесцветным. Колонии кишечной палочки на этой среде имеют фуксиново-красный цвет с металлическим блеском, тогда как колонии сальмонелл и шигелл бесцветные и прозрачные (см. цв. вкл. XXXIV).

Среда Левина применяется для выращивания всех энтеробактерий; содержит лактозу, эозин и метиленовый синий, имеет фиолетовый цвет. Колонии патогенных кишечных бактерий на этой среде прозрачны или имеют розовый оттенок. Кишечная палочка образует синие или черные колонии.

Среды третьей группы — селективные — содержат, кроме веществ, подавляющих рост кишечной палочки и других сопутствующих микробов, вещества, стимулирующие рост определенных патогенных энтеробактерий. Селективной средой для сальмонелл является **висмут-сульфитная среда**, на которой бактерии брюшного тифа и паратифа В растут в виде черных колоний с ободком, а паратифа А — нежных колоний с зеленоватым оттенком, другие сальмонеллы растут в виде колоний черного цвета с металлическим блеском (см. цв. вкл. XXXV).

Для дизентерийных бактерий (кроме бактерий Григорьева — Шига) селективной средой является среда Плоскирева. На ней хорошо растут тифозные и паратифозные бактерии; колонии сальмонелл и шигелл бесцветные, мутноватые, колонии кишечной палочки — розового цвета.

СРЕДЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРОБОВ СЕМЕЙСТВА КИШЕЧНЫХ

Для определения сахаролитических ферментов используют следующие среды:

1. Среда Гисса, содержащая 1 % углеводов и 1 % индикатор Андрее, в состав которого входит фуксин. Приготовленный реактив имеет соломенно-желтый цвет, в кислой среде дает покраснение. На этой среде выявляют разложение углеводов микроорганизмами. Среду разливают по пробиркам с поплавками (длина 25 мм, диаметр 3 мм). При наличии газа поплавок всплывает. При ферментации бактериями углеводов с образованием кислоты цвет среды меняется за счет находящегося в ней индикатора, что создает впечатление пестроты — «пестрый» ряд. Подбирают среды с соответствующими углеводами (глюкоза, мальтоза, лактоза, сахароза и др.), в процессе ферментации которых образуются кислоты и газообразные продукты.

2. Желчно-глицериновый агар по методу Рапорта. Среда позволяет уже на чашках, до выделения колоний, дифференцировать шигеллы Флекснера от прочих микробов, разлагающих глицерин.

3. Среда с рамнозой для сальмонелл (по Биттеру). К суточной культуре, выращенной на этой среде, прибавляют несколько капель 1,5 % спиртового раствора метилового красного. В зависимости от степени кислотности среда краснеет или остается желтой. *Salmonella typhimurium* дает красное окрашивание, остальные сальмонеллы — желтое.

4. Комбинированная среда Рессела. Содержит 1 % агара, 4 % индикатора Андрее, 1 % лактозы и 0,1 % глюкозы. Среду разливают в пробирки и смешивают так, чтобы нижняя половина оставалась столбиком, а верхняя имела скошенную поверхность.

При небольшом количестве глюкозы (0,1 %) сбрасывание ее происходит только в столбике, вследствие чего в нем изменяется цвет среды; сбрасывание лактозы, которая содержится в большей концентрации (1 %), происходит в столбике и в скошенной части, в результате чего вся среда изменяет свой цвет.

СРЕДЫ ДЛЯ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА

1. 1 % щелочная пептонная вода. Через 6 ч наблюдается обильный рост вибрионов в отличие от других микробов кишечной группы; рост в виде нежной голубоватой пленки, которая при наклоне пробирки или флакона прилипает к стенке.

2. Агар щелочной (рН 8,0–8,2). 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 и эмульгируются.

3. Среда Аронсона. Содержит сахарозу, обесцвеченный фуксин. Холерный вибрион образует вначале мелкие бесцветные колонии, а затем крупные блестящие с ярко-красным центром и бледно-розовой или бесцветной периферией.

4. Пептонная вода + 0,1 % растворимого крахмала. К посеву на этой среде прибавляют несколько капель раствора Люголя. В присутствии холерного вибриона синего окрашивания не наступит, так как истинные холерные вибрионы в отличие от холероподобных вибрионов обладают мощным диастатическим ферментом и за 5–6 ч полностью разлагают крахмал.

5. Лактозо-сахарозная среда Ресселя. Посев делают штрихом по скошенной поверхности и уколом в столбик. Холерные и холероподобные вибрионы расщепляют сахарозу, дают покраснение среды в столбике без образования газа.

6. Среда TCBS (тиосульфат-цитрат-бромтимол сахарозный). Среда имеет зеленый цвет. Холерные вибрионы, разлагающие сахарозу, дают плоские желтые колонии на фоне голубовато-серой среды через 12–14 ч. Кишечные палочки и все патогенные энтеробактерии не растут. Протей растет медленно в виде мелких изолированных прозрачных колоний в цвет среды. Кокки растут в виде мелких непрозрачных колоний желтого цвета.

7. Среда Монсура. Колонии холерного вибриона прозрачные или полупрозрачные, серовато-черного цвета с помутнением на краях.

Селективными для холерного вибриона являются среды Аронсона, Монсура, TCBS.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Основным методом лабораторной диагностики кишечных инфекций является *бактериологический*, основанный на выделении чистой культуры возбудителя и ее идентификации. Для идентификации бактерий кишечной группы используют изучение их ферментативной активности и антигенной структуры.

Этапы бактериологического исследования

1 день. Посев исследуемых материалов на дифференциально-диагностические среды (Эндо, Плоскирева, Левина).

Для выделения гемокультуры сальмонелл производят посев крови на 10–20 % желчный бульон или на среду Рапопорт. Соотношение крови и среды должно составлять 1:10. Инкубация 18–24 ч при температуре 37 °С.

2 день. Просмотр и описание колоний. Микроскопия материала из колоний и окраска по Граму. Пересев материала из колоний на скошенный МПА, среду Ресселя для накопления чистой культуры. Со среды Рапопорт культуру пересевают на среду Эндо и Ресселя.

В случае диффузного помутнения и изменения цвета среды Рапопорта (она приобретает красный цвет) за счет ферментации глюкозы с образованием кислоты делают предварительный вывод о наличии возбудителей брюшного тифа; при наличии, кроме этих признаков, газообразования в поплавке — возбудителей паратифов.

Постановка ориентировочной реакции агглютинации на стекле с материалом из отдельных колоний и смесью эшерихиозных сывороток, со смесью дизентерийных сывороток, со смесью сывороток против сальмонелл, содержащих антитела против наиболее распространенных сероваров — возбудителей кишечных инфекций. При положительном результате проводят реакцию агглютинации с моновалентными агглютинирующими сыворотками на стекле.

3 день. Проверка чистоты выделенной культуры. Учет изменения цвета среды Ресселя. Постановка с чистыми культурами реакции агглютинации на стекле с поливалентными сыворотками, затем с видовыми и типовыми сыворотками. Постановка развернутой реакции агглютинации. Пересев культур на среды для определения ферментативной активности (среды Гисса).

4 день. Учет результатов реакции агглютинации.

Учет роста на средах Гисса.

Окончательный ответ о виде и сероваре дают на основании результатов реакции агглютинации и «пестрого» ряда.

Возбудители эшерихиозов ферментируют глюкозу и лактозу с образованием кислоты и газа, выделяют сероводород.

Шигеллы ферментируют углеводы с образованием кислоты. Возбудители сальмонеллезов не ферментируют лактозу и сахарозу, расщепляют глюкозу, маннит и мальтозу с образованием кислоты и газа, не образуют индол и за небольшим исключением выделяют сероводород (табл. 27).

Дифференциально-диагностическая таблица кишечно-тифозной группы

Название бактерий	Углеводы					Ин-дол	Подвижность	Экзотоксин
	Лактоза	Глюкоза	Мальтоза	Маннит	Сахароза			
Кишечная палочка	кг	кг	кг	кг	кг или —	+	±	±
Паратифозная В-палочка	—	кг	кг	кг	—	—	+	—
Паратифозная А-палочка	—	кг	кг	кг	—	—	+	—
Брюшнотифозная палочка	—	к	к	к	—	—	+	—
Дизентерийная палочка Григорьева—Шига	—	к	—	—	—	—	—	+
Дизентерийная палочка Флекснера	—	к	к или —	к или —	к или —	±	—	—
Дизентерийная палочка Зонне	к (2–10 сут)	к	к или —	к	к	—	—	—

СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА

ЭШЕРИХИОЗЫ

С помощью реакции агглютинации на стекле при использовании набора ОК-диагностических сывороток (1:10) против патогенных сероваров кишечной палочки ориентировочно относят выделенную культуру к определенному серовару. Далее осуществляют развернутую реакцию агглютинации, с помощью которой выявляют О- и К-антигены бактерий. Диагностическую сыворотку разводят в рядах пробирок до титра, который указан на этикетке ампулы для О- и К-агглютининов. Для выявления К-антигенов в один ряд пробирок вносят смывтую со скошенного агара нагретую культуру, для выявления О-антигена используют кипяченую в течение 1–2 ч взвесь бактерий. Кипячение вызывает разрушение К-антигена, угнетающего О-антиген. Пробирки помещают на сутки в термостат при температуре 37 °С. Гомологичные сыворотке штаммы агглютинируются до титра или до половины титра.

ШИГЕЛЛЕЗЫ

Применяется реакция агглютинации с дизентерийными диагностикумами. На 5–8 день болезни используется РИГА с эритроцитарными диагностикумами Флекснера и Зонне, титр которых 1:160 и выше. РИГА проводят повторно с интервалом не менее 7 дней. Диагностическое значение имеет нарастание титра антител в 4 раза, которое выявляется с 10–12 дня болезни. Диагностическим титром при дизентерии, вызванной шигеллами Флекснера, считают разведение 1:200, а шигеллами Зонне — 1:100.

БРЮШНОЙ ТИФ И ПАРАТИФЫ

Широко применяется реакция агглютинации Видаля, основанная на обнаружении в сыворотке крови людей агглютининов, которые появляются в конце 1 — начале 2-й нед заболевания, и на изучении динамики нарастания и длительности сохранения антител. Сыворотку последовательно разводят в трех параллельных рядах пробирок от 1:100 до 1:1600 и вносят О-диагностикумы (обычные или эритроцитарные): в пробирки первого ряда — брюшнотифозный, второго — паратифозный А и третьего — паратифозный В. Применение О-диагностикумов позволяет выявить О-антитела, которые появляются в крови на 2-й нед заболевания и исчезают к его концу. Диагностический титр антител в реакции Видаля у неиммунизированных 1:200 и выше. Выявление Н-антител не представляет диагностической ценности, так как они обнаруживаются у больных в конце заболевания, а также у переболевших (анамнестическая реакция Видаля) и вакцинированных (прививочная реакция Видаля).

Более чувствительной и чаще дающей положительные результаты является РИГА с эритроцитарными монорецепторными диагностикумами О₉, О₁₂ и Vi. Антитела к О-антигенам выявляются, начиная со 2-й нед от начала болезни, а к Vi-антигенам — в более позднем периоде. Vi-антитела чаще обнаруживаются у бактерионосителей сальмонелл брюшного тифа.

САЛЬМОНЕЛЛЕЗЫ

Используется реакция агглютинации и РИГА, которые можно применять с первых дней заболевания с обязательным повторным исследованием через 7–10 дней для нарастания титра специфических антител. При проведении этих реакций применяются сальмонеллезные поливалентные и групповые (групп А, В, С, Д, Е) диагностикумы (корпускулярные или эритроцитарные). Диагностическое значение имеет повышение титра антител в 2–4 раза.

Наряду с бактериологическим и серологическим методами для диагностики брюшного тифа и дизентерии применяется *аллергологический метод*.

Для диагностики брюшного тифа применяется внутрикожная аллергическая проба с Vi-тифином брюшнотифозных бактерий, которая становится положительной в периоде выздоровления и может быть использована для ретроспективной диагностики.

Для диагностики шегеллезов применяется внутрикожная аллергическая проба с дизентерином Цуверкалова, которая имеет вспомогательное значение. Она становится положительной у больных дизентерией с 4 дня болезни и позже. Результат учитывают через 24 ч по размерам образовавшейся папулы. При наличии отека и гиперемии кожи диаметром 35 мм и более проба считается резко положительной, 20–34 мм — умеренно-положительной, при гиперемии без папулы размером 10–15 мм — сомнительной и гиперемии менее 10 мм — отрицательной.

Биологический метод

Применяется для диагностики сальмонеллезов. Сальмонеллы пищевых токсикоинфекций в отличие от сальмонелл паратифа В 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, у которых развивается септицемия, и они погибают через 1–2 сут. При вскрытии обнаруживают резко увеличенную селезенку, иногда и печень, а посев крови из сердца и материала из внутренних органов позволяет выделить культуры сальмонелл.

Ускоренные методы диагностики

Длительность классического бактериального исследования (4–5 дней) не всегда соответствует потребностям клиники и эпидемиологии. Особенно это относится к дизентерии с ее коротким и бурным течением.

Существуют два направления: 1) ускорение классического метода при помощи использования элективных или обогащенных питательных сред, сокращение интервалов между пересевами и т. д.; 2) применение методов, основанных на знаниях антигенной структуры грамотрицательных микробов, на обнаружении специфического антигена.

Для экспресс-диагностики дизентерии применяется люминесцентная микроскопия. Мазок из испражнений или колоний обрабатывают

специфической люминесцирующей сывороткой и микроскопируют в люминесцентном микроскопе.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ХОЛЕРЫ

Основным в лабораторной диагностике холеры является *бактериологический метод*.

1-й этап

Из патологического материала (испражнения, рвотные массы) готовят мазки, фиксируют спиртом или смесью Никифорова, окрашивают по Граму и микроскопируют. В дальнейшем при лабораторном подтверждении холеры хотя бы в одном случае мазки окрашивают только фуксином Пфейффера.

Вследствие большого полиморфизма наряду с типичными клетками в мазке можно обнаружить кокковидные, палочковидные и спиралевидные формы, что уменьшает ценность этого метода.

Из патологического материала готовят препарат «висячая капля» для обнаружения подвижного вибриона (фазово-контрастная микроскопия).

Обнаружение в мазках большого количества изогнутых грамтрицательных палочек и подвижных вибрионов в «висячей капле» дает возможность дать предварительный положительный ответ.

Одновременно с бактериоскопией исследуемый материал засевают на жидкие и плотные питательные среды. В качестве жидких сред обогащения рекомендуется 1 % щелочная пептонная вода, 1 % пептонная вода с теллуридом калия, жидкая среда Монсура и др. В качестве плотных питательных сред используют щелочной МПА и одну из селективных питательных сред: среду Аронсона, среду Монсура, TCBS и др. Посевы термостатируют при температуре 37 °С.

2-й этап

Через 5–6 ч из пленки или поверхности среды делают мазок, окрашивают по Граму, определяют подвижность в препарате «висячая капля». Проводят ориентировочную реакцию агглютинации на стекле с О-холерной сывороткой (0–1), разведенной 1:100, или реакцию иммобилизации холерного вибриона О-холерной сывороткой, результат которой учитывают при фазово-контрастной микроскопии. Ограничение подвижности вибрионов и образование агглютината наступает в течение 1–2 мин.

На основании полученных данных выдают второй предварительный результат, в котором отмечают подвижность вибриона и его отношение к агглютинирующей сыворотке.

Материал из пленки пересевают в чашки со щелочным агаром или селективной средой и одновременно делают пересев вторично на 1 % пептонную воду, изменения в которой изучают спустя 5–6 ч.

3-й этап

Через 10–15 ч после посева изучают рост на второй среде накопления (пептонной воде), характер колоний на чашках, из колоний готовят мазки, окрашивают, определяют подвижность. Проводят ориентировочную реакцию агглютинации на стекле с холерным вибрионом, выросшим на чашках с плотной средой, с О-холерной сывороткой, разведенной 1:100, и ориентировочную реакцию агглютинации с типовыми сыворотками Инаба и Огава в разведении 1:60 для определения серовара.

При положительной реакции и наличии характерных для холерного вибриона признаков выдают третий, предварительный, результат исследования.

Материал из колоний, давших положительную реакцию агглютинации, высевает на: полиуглеводную среду (содержит 2–3 % сахара), бульон, на лактозо-сахарозную среду Ресселя.

С молодой 3–4 ч бульонной культурой проводят развернутую реакцию агглютинации.

4-й этап

Через 12–14 ч учитывают развернутую реакцию агглютинации, изучают характер роста на среде Ресселя, идентифицируют выделенную чистую культуру по биохимической активности, гемолитическим свойствам, по чувствительности к антибиотику полимиксину, по чувствительности к бактериофагу С Мукерджи IV типа и бактериофагу Эль-тор. V. eltor гемолизует эритроциты, лизируется бактериофагом Эль-тор II, растет в присутствии полимиксина. V. cholerae не вызывает гемолиза эритроцитов, чувствителен к бактериофагу С Мукерджи IV типа, не растет в присутствии полимиксина.

Окончательное заключение о выделении и дифференцировании холерных вибрионов дают через 36–48 ч.

Серологический метод

Является вспомогательным, применяется для ретроспективной диагностики холеры, выявления вибриононосителей и оценки напряженности постинфекционного и поствакцинального иммунитета. Для этого ставят реакцию агглютинации или РПГА, а также определяют вибрионоцидные антитела в реакции лизиса *in vitro*. Положительный ответ дают при наличии агглютинирующих антител в титре 1:80–1:320, а вибрионоцидных 1:1000.

Ускоренные методы обнаружения холерных вибрионов

1. Иммунизация вибрионов холерными сыворотками и типовыми холерными фагами.

Капли испражнений или материала с поверхности пептонной воды обрабатывают холерной О-сывороткой, типовыми сыворотками Огава и Инаба или типовыми холерными фагами. Готовят из них препараты «раздавленная капля», которые исследуют в микроскопе, снабженном темнопольным или фазово-контрастным устройством. В положительном случае через 3–5 мин движение вибрионов прекращается.

2. Иммунофлуоресцентный метод.

Препараты из исследуемого материала обрабатывают флуоресцирующей противохолерной сывороткой и исследуют в люминесцентном микроскопе.

Положительным результатом считается обнаружение в препарате даже единичных вибрионов с ярким желто-зеленым свечением в виде блестящего ободка по периферии клетки.

Положительный результат можно получить через 1–2 ч после начала исследования при концентрации вибрионов не менее 10^6 клеток в 1 мл, поэтому рекомендуется предварительное подрашивание материала на питательных средах.

Препараты для диагностики кишечных инфекций

1. **Агглютинирующие ОВ-сыворотки** против энтеропатогенных сероваров *E. coli* (ОВ-коли-сыворотка О26; ОВ-коли-сыворотка О55 и т. д.). Получают гипериммунизацией кроликов взвесью бактерий соответствующей серологической группы *E. coli*. Применяют для постановки реакции агглютинации с целью определения серологической группы эшерихий.

2. **Сальмонеллезные групповые, адсорбированные О- и монорецепторные Н-агглютинирующие сыворотки** применяют для постановки реакции агглютинации для определения вида возбудителя при брюшном тифе и пищевых токсикоинфекциях.

3. **Брюшнотифозные О- и Н-диагностикумы** — взвеси брюшнотифозных бактерий, убитых нагреванием (О-диагностикумы) или обработкой формалином (Н-диагностикумы). Применяют для серологической диагностики брюшного тифа в реакции Видаля.

4. **Адсорбированные агглютинирующие сыворотки** для идентификации шигелл получают из крови кроликов, иммунизированных определенными видами шигелл. Применяют для серологической идентификации возбудителей дизентерии.

5. **Дизентерийный аллерген Disenterinum** является диагностическим препаратом, используемым для постановки кожных аллергических проб. Представляет собой белковые фракции, полученные из шигелл Флекснера и Зонне. Вводится внутрикожно.

6. **Наборы бактериофагов** для типирования энтеропатогенных эшерихий, шигелл, сальмонелл.

7. **Холерный фаг.** Типовые холерные фаги применяются для идентификации и типирования холерных вибрионов. Поливалентный холерный бактериофаг используется для лечебно-профилактических целей.

8. **Противохолерная агглютинирующая О-сыворотка,** сыворотки для определения сероваров Огава и Инаба. Получены из крови кроликов, иммунизированных холерными вибрионами. Применяют для серологической идентификации и определения сероваров холерных вибрионов в реакции агглютинации.

ТЕРАПИЯ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Лечение больных разными по этиологии кишечными инфекциями строится по общим принципам. Различия касаются главным образом этиотропных средств, которые используются с целью непосредственного воздействия на возбудителя. При всех микробных кишечных инфекциях используют этиотропные средства — химиопрепараты. Они необходимы почти каждому больному по двум причинам:

- 1) для более быстрого устранения патологического процесса у больного;
- 2) в интересах окружающих для более быстрой ликвидации источника инфекции.

При **эшерихиозах** более выраженное терапевтическое действие оказывают препараты неамицинового ряда: неомицин, канамицин, мономицин. Курс лечения 5–7 дней. При отсутствии эффекта может быть использован ампициллин. Больным со среднетяжелыми и тяжелыми формами, особенно с септическими явлениями, помимо указанных антибиотиков, назначают олететрин, олеандомицин, тетрациклин, левомицетин, в/м вводят гентамицина сульфат; используют нитрофурановые препараты: фуразолидон, фурадонин.

При **сальмонеллезах** наиболее эффективны левомицетин, затем ампициллин, полимиксины, гентамицин, невивграмон. Курс лечения 5–7 дней, однако при сальмонеллезах его часто бывает недостаточно; при отсутствии клинического улучшения, затягивающемся процессе необходимы повторные 2–3 курса со сменой антибиотика. При более

выраженных среднетяжелых и тяжелых формах необходима комбинация двух антибиотиков.

При лечении **брюшного тифа и паратифов** предпочтение отдается левомицетину, обладающему бактериостатическим и бактерицидным действием на возбудителей. Антибиотик назначается курсом до снижения температуры, а затем еще в течение 10 дней. Короткие неполноценные курсы лечения неэффективны и даже могут способствовать рецидивам. Применяется также ампициллин, рифампицин, фуразолидон.

При лечении дизентерии в легкой форме назначают сульфаниламидные препараты (норсульфазол, фталазол, сульгин, этазол и др.), при более тяжелых формах — в комбинации с антибиотиками. Курс 7–8 дней. При отсутствии эффекта сульфаниламиды заменяют антибиотиками. В настоящее время предпочтение отдают мономицину, ампициллину, к которым сохраняется чувствительность дизентерийных палочек. Препараты тетрациклинового ряда постепенно утрачивают свое значение в связи с частой устойчивостью к ним дизентерийных палочек.

Комплексное лечение кишечных инфекций, помимо этиотропной терапии, включает проведение патогенетической терапии, мероприятия которой направлены на восстановление водно-электролитного баланса и гемодинамики; по показаниям назначается иммуностимулирующая терапия.

Основой лечения **холеры** является патогенетическая регидратационная терапия, направленная на восстановление водно-солевых потерь. Этиотропное лечение антибиотиками имеет второстепенное значение. Антибиотики применяют только после окончания регидратации, уже в период коррекции продолжающихся потерь, т. е. через несколько часов от начала лечения. Лучшие результаты дает тетрациклин, можно применять левомицетин или фуразолидон.

ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ

1. **Коли-протейный бактериофаг жидкий** — *Bacteriophagum coli-proteicum* — фильтраты фаголизатов наиболее распространенных серологических групп энтеропатогенных кишечных бактерий и бактерий рода *Proteus*. Применяются для лечения и профилактики заболеваний, вызванных этими бактериями.

2. **Бактериофаг сальмонеллезный групп А, В, С, D, Е жидкий** — *Bacteriophagum Salmonella* — применяют для лечения больных сальмо-

неллезами, вызванными сальмонеллами соответствующих серологических групп, и с профилактической целью по эпидемическим показаниям.

3. Химическая сорбированная тифо-паратифозная вакцина — *Vaccinum typhoso-paratyphosochemicum adsorbium* — состоит из полных антигенов, извлеченных из возбудителей брюшного тифа, паратифов А и В, адсорбированных на геле гидроксида алюминия. Применяют для специфической профилактики брюшного тифа. Прививку производят однократно подкожно. Срок годности 1,5 года.

4. Брюшнотифозная спиртовая вакцина, обогащенная Vi-антигеном — *Vaccinum tiphosum spirituosum dotatum Vi-antigenum S. typhi*, — состоит из взвеси брюшнотифозных бактерий, обезвреженных этанолом, и дополнительно обогащенной Vi-антигеном, извлеченным из клеток *S. typhi* химическим методом.

5. Поливалентный сухой брюшнотифозный бактериофаг с кислотоустойчивым покрытием — *Bacteriophageum Salmonella typhi* — фильтрат фаголизата брюшнотифозных бактерий в сухой таблетированной форме. Применяют внутрь для специфической профилактики в очагах инфекции за 1,5–2 ч до еды. Срок годности 1 год.

6. Дизентерийная вакцина спиртовая сухая (для лечения дизентерии) — *Vaccinum dysentericum therapeuticum siccum* — содержит дизентерийные бактерии Флекснера и Зонне, инаktivированные этанолом и лиофильно высушенные. Применяют для лечения затяжных и хронических форм дизентерии.

7. Бактериофаг дизентерийный поливалентный сухой с кислотоустойчивым покрытием — *Bacteriophageum dysentericum* — содержит смесь фильтратов, полученных из фаголизатов дизентерийных бактерий, наполнитель и консервант. Применяют для профилактики и лечения дизентерии.

8. Колибактерин — *Colibacterinum* — лиофильно высушенный препарат антагонистического штамма кишечной палочки М-17. Применяют внутрь при различных кишечных заболеваниях, дизентерии и дисбактериозах у детей и взрослых.

9. Бифидумбактерин — *Bifidumbacterinum* — лиофильно-высушенная культура *Bifidobacterium bifidum*. Применяют при лечении дизентерии и хронических кишечных инфекций с невыясненной этиологией, дисбактериозов.

10. Лактобактерин — *Lactobacterinum* — высушенная взвесь живых антагонистически активных штаммов лактобактерий. Применяют при хронических формах кишечных инфекций и дисбактериозах.

11. **Бификол** — *Bificolum* — комплексный препарат, содержащий лиофильно высушенные живые штаммы *E. coli* и бифидобактерий, обладающих антагонистической активностью. Применяют внутрь при хронических и затяжных формах кишечных инфекций.

12. **Холерная вакцина** — *Vaccinum cholerae* — взвесь убитых холерных вибрионов. Применяют для активной иммунизации против холеры. Приготавливают из вибрионов Эль-Тор и классических холерных вибрионов сероваров Инаба и Огава.

13. **Холероген-анатоксин** — *Cholero-genum-anatoxini* — взвесь убитых холерных вибрионов, препарат очищен и лиофильно высушен. Применяют для специфической профилактики холеры.

ЗАДАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ЗАНЯТИЮ

1. Приготовьте из агаровой культуры кишечной палочки мазок на стекле, окрасьте по Граму. Изучите окрашенный мазок под микроскопом.

2. Изучите демонстрационные препараты брюшнотифозных, паратифозных бактерий, возбудителей пищевых токсикоинфекций, дизентерийных бактерий, холерного вибриона. Обратите внимание на общность морфологических признаков всех представителей семейства *Enterobacteriaceae*. Зарисуйте в альбом.

3. Ознакомьтесь с ростом кишечной палочки на дифференциально-диагностических средах (бромкрезоловая среда, среды Эндо, Левина, Плоскирева).

4. Изучая рост на средах Гисса, определите вид микроорганизмов, используя дифференциально-диагностическую таблицу кишечного-тифозной группы.

5. Поставьте реакцию агглютинации на стекле:

1) для этого приготовьте смесь агглютинирующих сывороток против энтеропатогенных кишечных палочек. В смесь введите 5 отдельных сывороток, каждую в разведении 1:10 в объеме 1 мл;

2) добавьте к 5 мл смеси сывороток 5 мл физиологического раствора;

3) предметное стекло поделите стеклографом пополам;

4) на одну половину нанесите каплю изотонического раствора хлорида натрия, а на другую — каплю смеси сывороток;

5) часть лактозоположительной колонии на среде Эндо снимите петлей и внесите в каждую каплю;

6) перемешайте петлей до получения равномерной взвеси круговыми движениями в каждой капле;

7) стекло можно слегка подогреть, высоко держа над пламенем горелки в течение 2–4 мин. Реакция протекает быстро. Наблюдайте за появлением зерен агглютината в каплях;

8) учет производите через 3–5 мин после появления зерен агглютината в капле с сывороткой.

Из каждой чашки исследуют не менее 10 колоний. Если ни одна из них не агглютинируется, дают ответ: «Энтеропатогенные кишечные палочки не обнаружены»;

9) если реакция агглютинации положительная, из оставшейся части колонии сделайте пересев на скошенный агар и короткий «пестрый» ряд (среды Гисса с лактозой и глюкозой).

6. Поставьте реакцию агглютинации Видаля (имитационная постановка) (табл. 28). Реакцию Видаля ставят в трех рядах пробирок по 7 пробирок в каждом ряду, из которых 5 опытных и 2 контрольные (контроль сыворотки и контроль диагностикума):

1) разлейте по 1 мл в каждую из 5 пробирок ряда изотонический раствор хлорида натрия;

2) внесите в первую пробирку ряда 1 мл сыворотки, разведенной 1:50. Затем сделайте серию разведений сыворотки путем последовательного переноса 1 мл из 1 пробирки во 2, из 2 в 3 и т. д. Из 5 пробирки 1 мл разведенной сыворотки удалить для сохранения одинакового объема;

3) в контрольную пробирку (контроль диагностикума) внесите 1 мл изотонического раствора хлорида натрия, а в контрольную пробирку (контроль сыворотки) внесите 1 мл сыворотки;

Таблица 28

Схема проведения реакции Видаля

Ингредиент	Номер пробирки					Контроль	
	1	2	3	4	5	сыворотки	диагностикума
Изотонический раствор натрия хлорида, мл	1	1	1	1	1	–	1
Сыворотка больного в разведении 1:50, мл	1	1	1	1	1	1	–
Диагностикум, капли	1	1	1	1	1	–	1
Полученное разведение сыворотки	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:50	

4) в каждую пробирку с разведениями сыворотки и в пробирку (контроль диагностикума) внесите по 1 капле соответствующего диагностикума;

5) пробирки встряхните и поместите в термостат на 2 ч при температуре 37 °С, а затем инкубацию продолжите при комнатной температуре до следующего дня.

Учет реакции агглютинации производите, оценивая последовательно каждую пробирку, начиная с контрольных, при осторожном встряхивании.

Интенсивность реакции агглютинации отмечают следующими знаками:

++++ — полная агглютинация: хлопья агглютината в абсолютно прозрачной жидкости;

+++ — неполная агглютинация: хлопья в слабоопалесцирующей жидкости;

++ — частичная агглютинация: хлопья различимы, жидкость очень мутная;

+ — слабая, сомнительная агглютинация: жидкость очень мутная, хлопья в ней плохо различимы;

— — отсутствие агглютинации: жидкость равномерно мутная.

Реакцию учитывают как положительную при наличии отчетливой агглютинации, выраженной не менее ++ в опытной пробирке, и отсутствии агглютинации в обеих контрольных пробирках. За титр сыворотки принимают последнее ее разведение, в котором интенсивность агглютинации оценивается не менее чем ++. Диагностический титр антител в реакции Видаля — 1:200.

7. Изучите коллекцию препаратов для диагностики, специфического лечения и профилактики кишечных инфекций.

Тема: ВОЗБУДИТЕЛИ КАМПИЛОБАКТЕРИОЗА

Цель: Уметь охарактеризовать основные свойства возбудителей, особенности эпидемиологии, патогенеза и клинического течения кампилобактериоза. Определить методы лабораторной диагностики; предложить меры профилактики и химиотерапии кампилобактериоза.

Возбудители кампилобактериоза — микроорганизмы рода *Campylobacter* из семейства *Spirillaceae* (*campylos* — изогнутый). Для человека в этиологии острых кишечных заболеваний (ОКЗ) среди кампилобактериозов ведущее место занимают *C. jejuni*, *C. coli*, *C. fetus*. Кампилобактеры представляют собой тонкие, изогнутые в форме запятой (вибриона) или S-образные палочки длиной 0,5–5,0 и толщиной 0,2–0,8 мкм; грамотрицательны, не имеют капсул, спор не образуют; моно- или амфитрихи. Морфологической особенностью является полиморфизм — могут образовывать овоидные и кокковидные формы, которые обнаруживаются в старых культурах.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Морфологические и культуральные особенности возбудителя кампилобактериоза.
2. Эпидемиология (источники, механизмы и факторы передачи инфекции).
3. Патогенез и клиника кампилобактериоза.
4. Особенности лабораторной диагностики.
5. Препараты для лечения и меры профилактики кампилобактериоза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дикий И.Л., Холуяк И.Ю., Шевелева Н.Е., Стегний М.Ю. Микробиология.— Х.: Прапор: Изд-во УкрФА. 1999.— С. 263–265.

МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Лабораторная диагностика включает бактериоскопический, бактериологический и серологический методы исследований.

Бактериоскопический метод. Метод дает достоверные результаты в том случае, если обсемененность исследуемого материала пропор-

циональна 10 колониесобразующим единицам (КОЕ) в 1 мл материала. При более низком уровне обсемененности результаты могут быть ложноотрицательными. Следует обратить внимание на сроки взятия материала от больного — не ранее чем за 1 ч до исследования.

Из исследуемого материала (фекалии) готовят мазок, фиксируют его на огне, после чего наносят 1 % водный раствор основного фуксина. Время экспозиции 10–20 сек. За это время успевают окраситься только кампилобактеры, остальная (сопутствующая) микрофлора остается неокрашенной. В фекалиях кампилобактеры представлены в виде нежных, грамотрицательных, спиралевидных бактерий, иногда имеют вид запятой или веретеновидную форму.

Ускоренный метод выявления кампилобактеров основан на фазово-контрастной микроскопии — исследуют суспензию фекалий в жидкой среде. Идентификацию проводят на основании характерных морфологических свойств и активной подвижности.

Бактериологический метод. Материалом для исследования, в зависимости от клинических проявлений болезни, могут быть фекалии, кровь, мокрота, гной, ткань абортированного плода, спинномозговая жидкость. Материалом для исследования из внешней среды являются подозрительные на зараженность кампилобактериозом пищевые продукты, вода, смывы из тушек птиц, объекты общественного питания и торговли. Забор материала следует производить в максимально ранние сроки, до начала антибиотикотерапии, далее в течение всего периода болезни по показаниям к бактериологическому исследованию (появление крови в фекалиях, усиление или рецидив диареи, начало реконвалесценции).

Кампилобактеры — микроаэрофилы и капнофилы, т. е. бактерии, требующие для культивирования пониженного количества кислорода (3–10 %) и повышенного углекислого газа (до 10 %). Материал засевают на одну из селективных питательных сред, основой которых является железо-эритритный агар с добавками веществ, повышающих аэротолерантность и снижающих окислительно-восстановительный потенциал. Используют плотные питательные среды с бриллиантовым зеленым, с тиогликолятом или жидкую — триптиказосоевый бульон с 5 % бараньей или лошадиной крови с антибиотиками.

Посевы выращивают при 37–42 °С в смеси 85 % азота, 10 % углекислого газа и 5 % кислорода. Можно использовать эксикатор, в который помещают зажженную свечу с целью снижения количества кислорода.

Независимо от методики посева, способа создания микроаэрофильных условий и температуры инкубации посевы выращивают в те-

чение 72 ч с ежедневным просмотром и последующим воссозданием микроаэрофильных условий.

На жидких питательных средах кампилобактер через 48–72 ч инкубации образует равномерное помутнение с выраженным осадком, на полужидких растет в виде дисков, расположенных на глубине 1–2 мм от поверхности питательной среды. На селективных плотных питательных средах обнаруживаются два типа колоний. Колонии первого типа негемолитические, сероватые, плоские, блестящие, прозрачные, влажные, как бы растекающиеся, похожие на капли водяных паров. Колонии второго типа также негемолитические, более плотные и оформленные, чем колонии первого типа, выпуклые.

Из подозрительных на кампилобактерии колоний готовят мазки, окрашивают по Граму. Обнаружение при микроскопировании мазков грамотрицательных изогнутых или спиралевидных палочек является основанием для посева на кровяной агар с антибиотиками с целью выделения чистой культуры.

Идентификация выделенных чистых культур

Родовая принадлежность выделенной чистой культуры кампилобактера определяется по результатам изучения морфологических свойств, на основании положительных результатов тестов на способность к продукции цитохромоксидазы и каталазы, температурного теста и теста на способность к росту на среде Ресселя (отрицательный результат). Видовая принадлежность — по результатам тестов на способность к быстрому гидролизу гиппурата натрия и резистентности к налidikсовой кислоте.

Тест на способность к продукции цитохромоксидазы

На колонии наносят 1–2 капли 1 % раствора тетраметилпарафенилендиамина. При положительной реакции спустя 5–10 сек культура приобретает пурпурную окраску.

Тест на способность к продукции каталазы

Готовят суспензию исследуемой суточной агаровой культуры в капле 3 % раствора перекиси водорода на предметном стекле. При положительной реакции через 3–5 сек отмечают интенсивное газообразование.

Тест на способность к росту на среде Ресселя

Делают посев уколом суточной агаровой культуры на среду Ресселя. Учет результатов производят спустя 24 ч инкубации при 37 °С в аэробных

условиях. Термофильным кампилобактерам не свойственна способность к росту на среде Ресселя в отличие от обладающих подвижностью и способностью к росту при 42 °С в микроаэрофильных условиях штаммов энтеробактерий.

Температурный тест

Бактериологической петлей делают посев суточной агаровой культуры в два столбика с мясо-пептонно-печеночным полужидким агаром. Один посев инкубируют в течение 48 ч в аэробных условиях при 25 °С, другой — при 37 °С. Термофильным кампилобактерам свойственен рост при 37 °С, но не при 25 °С.

Тест на способность к быстрому гидролизу гиппурата натрия

Суточную агаровую культуру исследуемого штамма суспендируют в 0,4 мл 1 % водного раствора гиппурата натрия до мутности, соответствующей 10 ЕД стандарта мутности. Постановку теста осуществляют в преципитирующих пробирках. После инкубации при температуре 37 °С в течение 2 ч в каждую пробирку по стенке под углом 45° добавляют 0,2 мл нингидрированного реактива (3,5 % раствор нингидрина в смеси ацетона и бутанола в соотношении 1:1). Пробирки помещают в термостат при 37 °С или на водяную баню на 10 мин, после чего учитывают результаты. При положительном результате отмечают темно-фиолетовое окрашивание суспензии исследуемой культуры. Способностью к быстрому гидролизу гиппурата натрия обладают штаммы *S. jejuni*.

Тест на резистентность к налидиксовой кислоте

Исследуемую суточную агаровую культуру засевают штрихом на поверхность железо-эритритного агара с налидиксовой кислотой (50 мг/л). Посевы инкубируют при 37 °С в течение 72 ч в микроаэрофильных условиях. Отсутствие роста в зоне инокуляции свидетельствует о чувствительности исследуемой культуры к налидиксовой кислоте, что свойственно культурам *S. jejuni* и *S. coli*, наличие роста — о ее резистентности.

Серологическое исследование

Серологический метод исследования играет важную роль при эпидемиологических исследованиях. Используют иммуноферментный анализ (ИФА), иммуноэлектрофорез, реакцию агглютинации (РА), непрямой геммагглютинации (РНГА), микроагглютинации, латекс-агглютинации, реакцию связывания комплемента (РСК).

ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

Наиболее эффективен эритромицин, действие которого можно повысить введением натрия гидрокарбоната. При его неэффективности назначают левомицетин, тетрациклин, гентамицин. Лечение антибиотиками проводят с обязательным учетом чувствительности выделенных штаммов.

Специфическая профилактика не разработана.

ЗАДАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ЗАНЯТИЮ

1. Приготовление мазков из чистой культуры кампилобактера, окраска фуксином и микроскопирование.
2. Изучение препаратов для лечения кампилобактериоза.

Тема: ВОЗБУДИТЕЛИ ЗООНОЗНЫХ ИНФЕКЦИЙ — ЧУМЫ, БРУЦЕЛЛЕЗА, ТУЛЯРЕМИИ, СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ

Цель: Уметь охарактеризовать основные свойства возбудителей, особенности патогенеза, клинического течения чумы, бруцеллеза, туляремии, сибирской язвы; определить методы лабораторной диагностики, знать препараты для лечения и профилактики этих заболеваний.

Возбудители зоонозных инфекций принадлежат к разным семействам и родам: возбудители чумы — *Yersinia pestis*, бруцеллеза — *Brucella abortus*, *Br. melitensis*, *Br. suis*, *Br. canis*; туляремии — *Francisella tularensis*, сибирской язвы — *Bacillus anthracis*. Они имеют ряд общих морфологических признаков. Представляют собой мелкие, овоидной формы грамотрицательные палочки, не образующие спор, склонны к полиморфизму. Исключение составляет возбудитель сибирской язвы, представляющий собой крупную, длиной 3–10 мкм грамположительную, споро- и капсулообразующую палочку.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Морфологические, тинкториальные и культуральные особенности возбудителей чумы, бруцеллеза, туляремии и сибирской язвы. Факторы вирулентности.
2. Эпидемиология и патогенез заболеваний.
3. Особенности лабораторной диагностики чумы, бруцеллеза, туляремии и сибирской язвы.
4. Препараты для лечения и специфической профилактики заболеваний.
5. Профилактические мероприятия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дикий И.Л., Холупняк И.Ю., Шевелева Н.Е., Стегний М.Ю. Микробиология.— Х.: Прапор: Изд-во УкрФА, 1999.— С. 247–262.
2. Елинов Н.П., Заикина Н.А., Соколова И.П. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии.— М.: Медицина, 1988.— С. 153–162.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЧУМЫ

Лабораторная диагностика чумы включает бактериоскопический, бактериологический, серологический, биологический методы исследований.

Бактериоскопический метод. Из исследуемого материала готовят мазки, фиксируют их в смеси Никифорова, окрашивают по Граму и параллельно метиленовым синим по Леффлеру. Предварительное заключение основывается на выявлении грамотрицательных, овоидной формы бактерий, окруженных капсулой, и их биполярном окрашивании (по Леффлеру).

При экспресс-диагностике мазки обрабатывают меченой люминесцентной сывороткой, содержащей видоспецифические противочумные антитела (прямая РИФ).

Бактериологический метод. Исследуемый материал вносят в МПБ (кровь больного в объеме 5–10 мл на 100 мл среды) и МПА (содержимое бубона, отделяемое язв, мокрота и др. материал). Для инактивации чумного фага на поверхность МПА наносят 0,1 мл антифаговой сыворотки; для подавления сопутствующей микрофлоры к 100 мл МПА добавляют 1 мл 2,5 % натрия сульфита и 1 мл насыщенного спиртового раствора генцианового фиолетового, разведенного 1:100 дистиллированной водой. Посевы культивируют при температуре 25–28 °С в течение 12 ч. При наличии в материале чумных бактерий на чашках с МПА вырастают колонии R-формы с компактным центром и ажурной периферией, напоминающей кружевной платочек. Рост на МПБ характеризуется образованием белой рыхлой пленки, от которой опускаются вниз нити в виде сталактитов.

Чистую культуру чумных бактерий идентифицируют по морфологическим, биохимическим, антигенным и фаголизабельным свойствам.

Возбудители чумы весьма активны в ферментативном отношении: расщепляют с образованием кислоты глюкозу, левулезу, галактозу, ксилозу, маннит, иногда арабинозу, некоторые штаммы ферментируют глицерин. Желатин не разжижают, не расщепляют адонит, не образуют индол, восстанавливают нитраты в нитриты.

Антигенные свойства возбудителя изучают путем постановки реакции агглютинации (РА) с диагностическими сыворотками против соматического и капсульного антигенов. Соматические дают групповую реакцию с возбудителем псевдотуберкулеза, капсульные отличаются высокой специфичностью. Используют РТПГА.

Для обнаружения антигенов бактерий чумы используют стандартную противочумную сыворотку, антитела которой нагружены на эритроциты.

Фагодиагностика. Испытания выделенной культуры на фаголизабельность проводят на МПА, для чего на чашки со средой засевают газоном исследуемую культуру и на поверхность наносят петлей или пастеровской пипеткой капли фага в соответствии с указанным на ампуле рабочим разведением. Посевы помещают в термостат на 18–20 ч, после чего учитывают литическое действие фага по появлению «стерильных» зон. Положительный результат свидетельствует о соответствии исследуемой культуры данному роду или виду. Испытания выделенной культуры на фаголизабельность в жидких средах осуществляют путем добавления в 3-часовую бульонную культуру чумного фага в количестве 1/10 от объема культуры. При этом испытывают различные разведения фага.

Чумной бактериофаг применяется не только для идентификации *Yersinia pestis*, а также с лечебной и профилактическими целями.

Серологическое исследование обычно проводят с целью ретроспективного установления диагноза. Для диагностики чумы проводят РНГА с эритроцитами, на которых адсорбирован капсульный антиген возбудителя чумы. Исследуют парные сыворотки, полученные в острой фазе болезни и при выздоровлении с интервалом 3–4 нед. Результат считается положительным при четырехкратном повышении титра антител.

Биологический метод. Морских свинок и мышей заражают накожно, подкожно или внутрибрюшинно в зависимости от исследуемого материала. При исследовании крови больного и выделенной чистой культуры их вводят внутрибрюшинно; мокроту и пунктат бубона — подкожно во внутреннюю поверхность бедра; при исследовании трупного материала вначале выбривают участок кожи, скарифицируют его, затем наносят 2–3 капли исследуемой жидкости, тщательно досуха втирая плоской частью скальпеля. На подопытных животных не должно быть эктопаразитов. При исследовании соблюдают меры предосторожности: морских свинок содержат в высоких стеклянных банках, завязанных двухслойной марлей, смоченной раствором лизола, мышей также помещают в банки, ставят в металлические сетки с железными крышками.

Диагноз подтверждают, отмечая гибель животных на 5–7 день. С целью сокращения срока исследований одно из зараженных животных забивают на 2–3 день, из крови и внутренних органов выделяют культуру, идентифицируя ее вышеописанными методами.

При вскрытии трупов отмечают множественные кровоизлияния на слизистых и серозных оболочках, воспаление лимфатических узлов, наличие некротических очагов в селезенке, печени, вязкого экссудата в брюшной полости. В мазках из экссудата и внутренних органах обнаруживают множество грамотрицательных, биполярно окрашенных бактерий, окруженных капсулой.

При исследовании грызунов соблюдают меры предосторожности: перед вскрытием их опускают на несколько минут в керосин, затем вскрывают, изучают патологоанатомические изменения, готовят мазки-отпечатки, осуществляют посевы с целью выделения чистой культуры.

Биопроба обязательна. При исследовании большого количества грызунов обычно используют морскую свинку, которой вводят взвесь из лимфоузлов, селезенки 15–20 трупов.

ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ ЧУМЫ

Препаратом выбора является стрептомицин, эффективны тетрациклин и хлорамфеникол. Патогенетическое лечение включает введение дезинтоксикационных жидкостей (гемодез, растворы глюкозы, физиологический раствор, препараты «Трисоль», «Квартасоль» и др.).

Для лечения тяжелых форм чумы используют противочумный иммуноглобулин и специфический фаг.

С целью профилактики используют сухую живую чумную вакцину EV, представляющую собой взвесь живых авирулентных чумных бактерий, высушенных в сахарозно-желатиновой среде. Применяют накожно и подкожно. Напряженность иммунитета от шести месяцев до года. Срок годности вакцины 1 год.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА БРУЦЕЛЛЕЗА

Лабораторная диагностика бруцеллеза включает бактериологический, серологический, биологический методы исследований и кожно-аллергическую пробу.

Бактериологический метод. Исследуемый материал (кровь, мочу, костный мозг, мокроту, желчь и др.) вносят на плотные питательные среды для выделения чистой культуры. Параллельно делают высеv на жидкие среды и в желточный мешок куриного эмбриона.

Бруцеллы максимально приспособлены к существованию в макроорганизме. поэтому вырастить их на питательных средах крайне сложно — растут медленно и требуют питательных сред сложного состава (с добавлением крови, сыворотки, гомогената печени и др.). Для выделения Br. abortus необходимо присутствие от 5 до 10 % CO₂.

Чаще всего выделяют гемокультуру (из крови), реже миелокультуру (из костного мозга) и уринокультуру (из мочи).

Для выделения гемокультуры 3–5 мл крови больного, взятой из локтевой вены, засевают в два флакона с 50–100 мл печеночного или асцитического бульона (для предупреждения свертывания крови необходимо добавить 0,2 % натрия цитрата). Один из них инкубируют в обычных аэробных условиях (для выделения *Bg. melitensis* или *Bg. suis*), другой — в присутствии 10 % CO_2 (для выделения *Bg. abortus*). В последнем случае для получения необходимой концентрации CO_2 посеvy помещают в герметично закрывающийся сосуд, в который из баллона через газометр поступает CO_2 . Можно использовать другой способ: горящую ватную пробку вводят глубоко в горлышко флакона, не касаясь питательной среды, флакон закрывают резиновой пробкой и заливают парафином.

Посевы выдерживают при 37 °С в течение 1 мес, через каждые 5 дней делая высев на скошенный печеночный агар.

На агаре бруцеллы образуют мелкие, бесцветные, гладкие колонии с перламутровым блеском, в бульоне — помутнение и небольшой слизистый осадок.

Дифференциацию бруцелл проводят по образованию сероводорода, чувствительности к действию анилиновых красителей. Наиболее интенсивно продуцирует H_2S бактерии *Bg. suis*, менее интенсивно — *Bg. abortus*; *Bg. melitensis* не продуцирует H_2S (или в незначительных количествах).

При добавлении в питательные среды анилиновых красителей — основного фуксина, метилвиолета, пиронина растут культуры *Bg. melitensis* и *Bg. abortus*, способные редуцировать эти красители, вследствие чего последние теряют антибактериальную активность. При добавлении в питательные среды только тионина растут культуры *Bg. suis* и *Bg. melitensis*.

Серологический метод включает постановку развернутой реакции агглютинации с сывороткой больного (реакцию Райта), ускоренную серодиагностику (реакция Хеддлсона), РСК, реакцию Кумбса, РПГА, реакцию иммунофлуоресценции.

Чаще всего используют реакцию Райта, положительные результаты которой отмечаются через 1–2 нед после начала заболевания и сохраняются у переболевших многие годы. Диагностический титр реакции 1:200.

Техника постановки реакции Райта типична для развернутой реакции агглютинации (реакция Видаля) за исключением того, что к изотоническому раствору натрия хлорида добавляют 0,5 % фенола. Пробир-

ки помещают в термостат на 18–20 ч, после чего оставляют на 2 ч при комнатной температуре.

Ускоренную серодиагностику (реакция Хеддлсона) ставят на стекле с неразведенной сывороткой больного и концентрированным антигеном-диагностиком, подкрашенным метиленовым синим. Чаще всего реакцию ставят в очагах бруцеллеза.

Для проведения реакции обезжиренное стекло делят восковым карандашом на 5 квадратов (табл. 29). В каждый квадрат вносят микропипеткой неразведенную испытуемую сыворотку в количестве 0,04–0,02 — 0,01–0,02 мл. В пятый квадрат сыворотку не вносят (контроль антигена). Затем добавляют диагностиком по 0,03 мл в каждый квадрат, за исключением 4 (контроль сыворотки). В 4 и 5 квадраты вносят по 0,03 мл изотонического раствора натрия хлорида. Капли смешивают стеклянной палочкой, начиная с минимальной дозы сыворотки. При положительной реакции в первые минуты появляются хлопья синего цвета (можно стекло осторожно подогреть над пламенем примерно до 37 °С в течение 2 мин). Наличие агглютинации на 4 плюса в первых 3 квадратах оценивают как резко положительную реакцию. При наличии агглютинации на два плюса в дозах сыворотки 0,02 и 0,01 мл отмечают положительную реакцию, в дозе 0,04 — слабо положительную. Отсутствие агглютинации во всех дозах оценивается как отрицательная реакция.

Таблица 29

Схема постановки реакции агглютинации Хеддлсона при бруцеллезе

	Квадраты				
	1	2	3	4	5
				контроль сыворотки	контроль антигена
Сыворотка	0,004	0,02	0,01	0,02	—
Диагностиком	0,03	0,03	0,03	—	0,03
Изотонический раствор натрия хлорида	—	—	—	0,03	0,03

Реакция Хеддлсона является ориентировочной, может давать ложноположительные результаты за счет наличия в сыворотке здоровых людей нормальных антител. Поэтому сыворотки, давшие положительный результат в этой реакции, в дальнейшем исследуют в развернутой реакции агглютинации (реакция Райта).

Ускоренную диагностику бруцеллеза можно проводить путем постановки реакции агглютинации с цельной сывороткой больного и антигена розбенгал. Антиген готовят из взвеси убитых нагреванием при температуре 85 °С в течение 1,5 ч бруцелл с использованием в качестве растворителя буферного раствора (рН 3,6–3,8) и добавлением красителя бенгальского розового. На стеклянную пластинку наносят 0,03 мл цельной сыворотки больного и такое же количество антигена розбенгал. Через 4 мин учитывают результат в виде появления крупно- или мелкозернистого агглютината.

Реакцию иммунофлуоресценции ставят при острой, подострой и хронической формах бруцеллеза.

Следует обратить внимание на различный состав сывороточных иммуноглобулинов в зависимости от фазы заболевания — в ранние сроки после заражения выделяются IgM, в более поздние — IgG (дифференцируют с помощью цистеиновых тестов).

В последние годы изучается ценность теста ELISA.

Биологическое исследование проводят в специальных лабораториях с использованием морских свинок и белых мышей. После заражения животных материалом от больного через 20–30 дней берут кровь, проводят реакцию агглютинации. Животных забивают, из внутренних органов, крови, лимфоузлов выделяют чистую культуру с использованием питательных сред и последующей идентификацией бруцелл, как описано выше (бактериологическое исследование).

Кожно-аллергическую пробу (реакцию Бюрне) ставят с 15–20 дня заболевания. На ладонную поверхность предплечья вводят внутрикожно 0,1 мл бруцеллина. Через 24 ч в случае положительной реакции отмечают гиперемию кожи и болезненную отечность. Реакция положительна не только у больных, но и у переболевших и вакцинированных лиц.

Для постановки кожно-аллергической пробы (реакция Бюрне) используют бруцеллин — Brucellinum, представляющий собой стерильный фильтрат убитых нагреванием культур трех видов бруцелл, выращенных в течение 3-х нед на жидкой питательной среде.

В последние годы диагностическая ценность этого метода ставится под сомнение.

ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ БРУЦЕЛЛЕЗА

Химиотерапия бруцеллеза затрудняется в связи с внутриклеточным расположением возбудителя. Назначается при особых формах бруцеллеза, нежелательна при хронической вследствие способности вводи-

мых препаратов повышать сенсibilизацию, и без того занимающую значительное место в патогенезе бруцеллеза.

Назначают антибиотики широкого спектра действия — тетрациклины, рифампицин, реже стрептомицин и левомицетин. В случае рецидива болезни назначают комбинированную антибиотикотерапию (стрептомицин с тетрациклином). Химиотерапию следует комбинировать с иммунотерапией (специфические иммуноглобулины). Иногда используют убитую вакцину.

Убитая лечебная вакцина — *Vaccinum brucellinum theurapeuticum* — представляет собой убитую нагреванием взвесь бруцелл. Вводится внутривенно, подкожно, внутримышечно. Срок годности 1,5 года.

С целью профилактики используют бруцеллезную живую (сухую) вакцину — *Vaccinum brucellinum vivum siccum*, представляющую собой взвесь живых лиофилизированных авирулентных возбудителей бруцеллеза.

Вакцинацию проводят подкожно, однократно, ревакцинацию — через 10–12 месяцев. Длительность иммунитета до 1 года.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ТУЛЯРЕМИИ

Особенностью лабораторной диагностики туляремии является невозможность выделения возбудителя в виде чистой культуры на питательных средах непосредственно от больного. Практическое значение имеют биологический, серологический методы и кожно-аллергическая проба. При массовых обследованиях проводят ускоренную диагностику путем постановки кровяно-капельной реакции.

Серологические реакции и кожно-аллергические пробы проводят в обычных микробиологических лабораториях, обнаружение и выделение возбудителей осуществляют в специальных лабораториях.

Биологический метод. Материалом от больных, характер которого зависит от клинической формы туляремии, — пунктатом лимфатических узлов, отделяемыми конъюнктивы, соскобом из язвы, налетом из зева, кровью и др. — заражают белых мышей или морских свинок. Материал вводят подкожно, накожно, внутривенно или перорально. Как правило, животные заболевают со смертельным исходом на 5–7 день даже при введении единичных бактерий. Если в указанные сроки животные не погибают, их забивают на 15–20 день и трупы вскрывают. Из селезенки и печени готовят мазки-отпечатки, а кровь, костный мозг, участки внутренних органов втирают в поверхность одной из специальных питательных сред — желочной, глюкозо-цистеинового агара с кровью, печеночной и др.

Возбудитель хорошо культивируется в желточном мешке 12-дневного куриного эмбриона.

На питательных средах туляремийные бактерии образуют S-формы колоний — мелкие, гладкие, беловатого цвета с голубоватым оттенком.

Идентификацию чистой культуры проводят по морфологическим, биохимическим, антигенным свойствам. Бактерии туляремии в отличие от бруцелл разлагают глюкозу, мальтозу и маннозу до кислоты. Антигенные свойства изучают при постановке реакции агглютинации со специфической агглютинирующей сывороткой. Бактерии туляремии содержат оболочечный антиген, с которым связаны их вирулентные и иммуногенные свойства, и соматический O-антиген. По антигенным свойствам туляремийные бактерии близки к бруцеллам.

Серологический метод включает реакцию агглютинации с туляремийным диагностикумом по типу реакции Видаля (развернутую) и кровяно-капельную (ускоренную) — на предметных стеклах.

Развернутую реакцию агглютинации ставят на 10–15 день от начала болезни.

У больного берут 2–3 мл крови из локтевой вены, получают сыворотку, которую последовательно разводят изотоническим раствором натрия хлорида, начиная с 1:50 и заканчивая 1:800 (табл. 30). В каждую пробирку вносят 0,1 мл туляремийного диагностикума (взвесь убитых формалином туляремийных бактерий). Реакцию сопровождают контролем антигена и сыворотки.

Таблица 30

Схема постановки реакции агглютинации при туляремии

Ингредиенты, мл	Пробирки					Контроль	
	1	2	3	4	5	анти- гена	сыво- ротки
Изотонический раствор натрия хлорида	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	—
Сыворотка больного 1:25	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Полученное разведение сыворотки	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	—	—
Диагностикум	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	—

Пробирки помещают в термостат на 2 ч, после чего определяют титр антител (предварительное заключение). Через 18–20 ч пребывания пробирок при комнатной температуре получают окончательный результат.

Диагностический титр антител при туляремии 1:100.

Для подтверждения диагноза исследуют парные сыворотки — второй раз сыворотку берут через 7–10 дней после первичного исследования. Диагностическое значение имеет 4-кратное и более нарастание титра антител.

Следует учитывать возможные ложноположительные реакции агглютинации в связи с тем, что они дают перекрестную агглютинацию с антителами к бруцеллам, протее и др. возбудителям.

Для ранней диагностики туляремии применяют более чувствительные РНГА и РСК.

При проведении РНГА, которая может быть положительной уже в конце первой недели заболевания, в качестве антигенов используют эритроцитарный диагностикум, который представляет собой взвесь бараньих эритроцитов, консервированных формалином и сенсibilизированных туляреминым антигеном. Диагностические титры гемагглютинации 1:1280–12 560.

Кровяно-капельная (ускоренная) реакция агглютинации. Каплю крови больного, взятую из пальца, наносят в виде толстой капли на обезжиренное предметное стекло, добавляют в нее каплю дистиллированной воды (для лизиса эритроцитов). Рядом с кровью наносят каплю туляреминого диагностикума. Обе капли тщательно перемешивают стеклянной палочкой. При наличии в крови агглютининов в диагностическом титре (1:100 и выше) в капле немедленно наступает агглютинация диагностикума; при титрах ниже диагностических агглютинация происходит через 2–3 мин.

Кожно-аллергическая проба. Весьма чувствительна, дает положительные результаты у больных, начиная с 3–5 дня болезни. Положительный результат могут давать вакцинированные и переболевшие туляремией лица в течение ряда лет.

При постановке пробы вводят тулярин — накожно или внутрикожно. При этом обязательно учитывают способ введения, так как концентрация аллергена для накожного и внутрикожного введения различна.

Результаты аллергопробы учитывают через 24–36–48 ч. Наличие выраженного инфильтрата и гиперемии диаметром 0,5 см оценивают как положительную реакцию. Для постановки кожно-аллергических реакций используют тулярин — *Tularinum ad usum intracutaneum et supra*

cutaneum. Препарат представляет собой взвесь убитых нагреванием туляреминых бактерий вакцинного штамма в изотоническом растворе натрия хлорида с добавлением 3 % глицерина.

В препарате для кожного введения содержится 10 млрд. клеток в 1 мл, для внутрикожного — 500 млн. в 1 мл. Срок годности препаратов соответственно 2 и 3 года.

ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ ТУЛЯРЕМИИ

Назначают стрептомицин (в течение 7–10 дней), гентамицин. Альтернативные химиопрепараты — ампициллин, эритромицин, канамицин, левомицетин, тетрациклин. Химиотерапию комбинируют с вакцинацией. Назначают биостимуляторы, симптоматическое лечение, в тяжелых случаях — дополнительно кортикостероидные гормоны.

С целью профилактики туляремии используют живую вакцину — *Vaccinum tularaemicum vivum siccum*, которая представляет собой лиофильно высушенную взвесь вакцинного штамма возбудителя туляремии. Вводят однократно кожно или внутрикожно. Срок годности вакцины 1 год. Длительность иммунитета 5 лет.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ

Лабораторная диагностика сибирской язвы включает бактериоскопический, бактериологический, биологический, серологический методы исследований и постановку кожно-аллергической пробы.

Бактериоскопический метод. Материал от больного и трупа окрашивают по Граму. Наличие в мазках крупных, грамположительных, образующих цепочки бацилл позволяет поставить предварительный диагноз сибирской язвы. Для выявления капсул используют окраску по методу Гинса (как правило, обнаруживаются в крови при септической форме заболевания).

Ускоренную диагностику сибирской язвы осуществляют с помощью люминесцентной микроскопии: мазки-отпечатки из органов обрабатывают специфической флуоресцирующей сывороткой, отмечают желтовато-зеленоватое свечение возбудителя.

Бактериологическое исследование проводят в специальных лабораториях. Патологический материал засевают на МПА, кровяной МПА и МПБ. Посевы инкубируют при 37 °С в течение 18–20 ч. На агаре вирулентные штаммы образуют R-формы колонии: крупные, шероховатые в виде «головы медузы» или «львиной гривы». В бульоне отмечается придонный рост, напоминающий комочек ваты, бульон остается прозрачным.

Для выделения чистой культуры типичные колонии пересевают на скошенный агар. Идентификацию выделенной культуры осуществляют, делая пересев на среды «пестрого» ряда, желатин, ставят реакцию со специфическим фагом. Сибиреязвенные бактерии обладают сахаролитическим действием, расщепляя глюкозу, мальтозу, декстрин, фруктозу с образованием кислоты без газа. Рост в столбике желатина напоминает опрокинутую вершиной вниз елочку, на агаре с кровью гемолиза не наблюдается.

Ставят тест на «жемчужное ожерелье» (с пенициллином). Добавление в чашки с МПА пенициллина (0,05–0,5 ЕД/мл) с последующим внесением бульонной культуры возбудителя и термостатированием в течение 3 ч позволяет обнаружить в мазках распад бактерий с образованием шаровидных форм, напоминающих жемчужное ожерелье.

Биологическое исследование. Исследуемый материал вводят подкожно белым мышам. Через 24–48 ч вскрывают трупы животных, отмечают наличие характерных для сибирской язвы патоморфологических изменений: отек в месте введения, потемневшую несвернувшуюся кровь, кровоизлияния в клетчатку, рыхлую селезенку и плотную красную печень. В мазках из внутренних органов и крови обнаруживают типичные сибиреязвенные бактерии, окруженные капсулой.

Серологический метод. Проводится в тех случаях, когда не удается обнаружить возбудителя в материале. Используют реакции латекс-агглютинации и пассивной агглютинации с протективным сибиреязвенным антигеном. Применяют ELISA — четырехкратное и более повышение титра антител в исследуемой сыворотке является положительным результатом.

Для обнаружения сибиреязвенного антигена в трупном материале, кожевенном и меховом сырье, изделиях из них широко используют реакцию термопреципитации по Асколи (рис. 27).

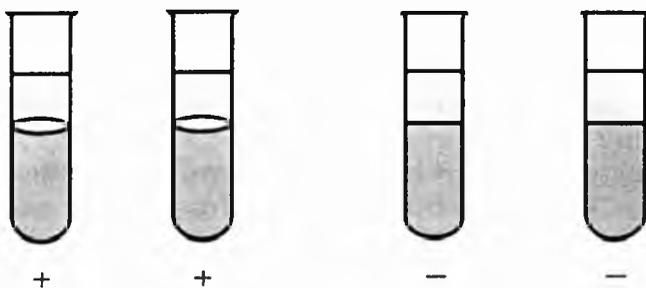


Рис. 27. Реакция термопреципитации по Асколи

Исследуемый материал (кусочки органов, шерсти, меха, кожи) измельчают, заливают 10–20-кратным объемом изотонического раствора натрия хлорида и кипятят в течение 10–15 мин, после чего фильтруют до полной прозрачности. Фильтрат используют в качестве антигена, осторожно насаивая его в количестве 0,2 мл на предварительно внесенную в узкую преципитирующую пробирку сибиреязвенную преципитирующую сыворотку (0,2 мл). Контрольный термоэкстракт готовят из того же материала, взятого от здорового животного. Положительная реакция сопровождается появлением преципитата в виде белого кольца в месте соприкосновения антигена и сыворотки в течение 1–5 мин. При появлении преципитата спустя 10 мин реакцию считают неспецифической.

Кожно-аллергическая проба ставится с антраксином, который вводится в объеме 0,1 мл внутривожно на внутреннюю поверхность предплечья. Результаты учитывают через 24 ч. При положительной реакции появляется гиперемия диаметром более 16 мм и инфильтрат.

Для постановки кожно-аллергической пробы применяют антраксин — *Anthraxinum*, который получают путем гидролиза сибиреязвенных бактерий.

ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ

Чаще назначают пенициллин (в течение 5–7 дней). При тяжелых формах комбинируют пенициллин с цепопином. Эффективны тетрациклины, хлорамфеникол, стрептомицин, эритромицин. Патогенетическая терапия направлена на снятие токсикоза, нормализацию гемодинамики, включает использование солевых растворов, кровезаменителей, плазмы.

Одновременно вводят специфический иммуноглобулин или сибиреязвенную сыворотку.

Противосибиреязвенный глобулин — *globulinum antianthraxicum* — глобулиновая фракция сыворотки иммунизированных лошадей. Применяют как для профилактики, так и для лечения сибирской язвы. Срок годности 2 года.

С целью профилактики используют сухую живую сибиреязвенную вакцину СТИ (санитарно-технический институт), представляющую собой спорую культуру бескапсульного варианта сибиреязвенных бактерий. Применяют накожно, однократно. Длительность иммунитета до 1 года. Срок годности вакцины 3 года.

ЗАДАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ЗАНЯТИЮ

1. Микроскопия готовых препаратов возбудителей зоонозных инфекций: *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, *Brucella melitensis*. Сделайте рисунки.

2. Приготовление мазка и окраска по Граму культуры *B. anthracoides* (морфологически идентична возбудителю сибирской язвы *B. anthracis*).

3. Постановка реакции Хеддлсона.

4. Постановка кровяно-капельной реакции на стекле для серодиагностики бруцеллеза.

5. Постановка реакции Асколи.

6. Изучение препаратов для диагностики, профилактики и лечения зоонозных инфекций.

7. Просмотр слайдов.

Тема: ПАТОГЕННЫЕ КЛОСТРИДИИ И НЕСПОРООБРАЗУЮЩИЕ АНАЭРОБНЫЕ БАКТЕРИИ

Цель: Уметь охарактеризовать группу патогенных клостридий, группу неспорообразующих анаэробных бактерий; определить методы лабораторной диагностики и предложить лекарственные препараты для специфической профилактики и лечения газовой анаэробной инфекции, столбняка, ботулизма, пищевой токсикоинфекции, вызванной *Cl. perfringens*.

Анаэробные грамположительные спорообразующие бациллы, относящиеся к роду *Clostridium*, вызывают такие заболевания, как столбняк, раневая анаэробная инфекция (газовая гангрена) и ботулизм. Все клостридии сходны между собой морфологически, обитают в кишечнике человека и животных, а также в почве как сапрофиты. Возбудители столбняка и газовой анаэробной инфекции вызывают патологический процесс при попадании в организм в виде спор через поврежденные кожные покровы, при травмах, ожогах. Они остаются в месте внедрения, прорастают в вегетативные формы, выделяя экзотоксин. Ботулизм относят к интоксикациям бактериальной природы, так как в организм вместе с пищей попадает сильнейший токсин, который образуется вегетативными клетками, прорастающими из спор в анаэробных условиях (в консервах, внутренних слоях колбасы, копченой рыбы и т. д.).

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Методы культивирования анаэробов.
2. Морфологические свойства возбудителей анаэробных инфекций.
3. Резистентность патогенных анаэробов во внешней среде.
4. Характеристика возбудителя столбняка и диагностика заболевания.
5. Морфологические и культуральные особенности возбудителей раневой анаэробной инфекции, диагностика заболевания.
6. Ботулизм как пищевая токсикоинфекция. Методы выявления возбудителя и обнаружения его токсина.

7. Анаэробные неспорообразующие бактерии, их характеристика.
8. Пищевая токсикоинфекция, вызываемая *Clostridium perfringens*, диагностика.
9. Препараты для специфической профилактики заболеваний, вызванных патогенными анаэробами.
10. Препараты для лечения анаэробных инфекций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дикий И.Л., Холуяк И.Ю., Шевелева И.Е., Стегний М.Ю. Микробиология.— Х.: Прапор: Изд-во УкрФА, 1999.— С. 286–297.
2. Елинов И.П., Заикина Н.А., Соколова И.П. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии.— М.: Медицина, 1988.— С. 162–169.

Столбняк. Возбудитель столбняка — *Clostridium tetani* (см. шв. вкл. XXXVI).

Материал для исследования: кусочки ткани вокруг предполагаемых входных ворот инфекции, гной, перевязочный материал, кетгут.

Микробиологическую диагностику проводят бактериологическим путем (выделение чистой культуры) и методом биологических проб.

Бактериологическое исследование. Материал засевают в среду Китта — Тарощи и инкубируют в анаэробных условиях при 37 °С в течение 3–4 сут; наблюдают придонный рост бактерий. Затем делают пересевы на сахарный кровяной агар в чашки Петри и в столбик сахарного питательного агара в пробирке. Посевы также инкубируют в анаэробных условиях.

На поверхности кровяного агара палочка столбняка образует нежные прозрачные колонии, окруженные малозаметной зоной гемолиза. Для получения чистой культуры подозрительные колонии пересевают в пробирки со средой Китта — Тарощи и сохраняют их под слоем вазелинового масла или в эксикаторе, заполненном смесью инертных газов.

Выделение чистой культуры Clostridium tetani по методу Файлда

Для этой цели 3–4-суточную культуру в среде накопления прогревают в течение 1,5 ч при температуре 60 °С, после чего сеют несколько капель в конденсационную воду свернутой сыворотки. Посев помещают в строго анаэробные условия. Через 1–2 сут появляется «ползучий» рост *Clostridium tetani*. Из верхней части посева петлей пересевают культуру снова в конденсационную воду свернутой сыворотки. Такие посевы повторяют до получения чистой культуры.

Биопроба — основной метод диагностики столбняка. Проводится для обнаружения столбнячного токсина в исследуемом материале. С этой целью материал растирают в стерильной ступке с песком, заливают

изотоническим раствором хлорида натрия для экстрагирования токсина и фильтруют через бумажный фильтр. Часть фильтрата смешивают с антитоксической сывороткой и внутримышечно вводят белым мышам (контрольная группа); подопытным животным вводят один фильтрат. Через 1–2 сут у мышей появляется ригидность мышц хвоста и задних конечностей. В результате резкого сокращения хвостовых мышц хвост поднимается в виде дуги. Затем подопытные животные погибают. Для определения токсигенности выделенной культуры белым мышам вводят надсадочную жидкость, полученную при центрифугировании этой культуры, выращенной на жидкой питательной среде.

Газовая анаэробная инфекция (газовая гангрена). Возбудителями газовой анаэробной инфекции являются *Clostridium perfringens*, *Cl. novyi*, *Cl. septicum*, *Cl. sordellii*, *Cl. histolyticum*. Чаще других возбудителем является *Clostridium perfringens*.

Материал для исследования: пораженные и некротизированные ткани, взятые на границе со здоровыми, экссудат, гной, отделяемое ран, кровь. От трупов берут отделяемое ран, кусочки селезенки и печени.

Бактериоскопическое исследование. Проводится путем микроскопии мазков, приготовленных из отечной жидкости или некротизированной ткани. Наличие в препаратах крупных грамположительных спорообразующих палочек, часть из которых (*Cl. perfringens*) образует капсулу, позволяет поставить предварительный анализ (см. цв. вкл. XXXVII).

Бактериологическое исследование. Исследуемый материал соответственно вносят в несколько пробирок со средой Китта — Тарощи, железосульфитным агаром (среда Вильсона — Блера) и молоком (среда Тукаева). Часть пробирок прогревают при 80 °С в течение 30 мин для уничтожения неспорообразующих бактерий. Посевы инкубируют в термостате при 37 °С. *Clostridium perfringens* растет в глубине среды. В молоке уже через 3–4 ч после посева образуется губкообразный сгусток, содержащий пузырьки газа и отделившуюся прозрачную жидкость. На следующие сутки на среде Китта — Тарощи отмечается помутнение и газообразование, а на ЖСА несколько позднее появляются черные колонии в глубине агарового столбика. Для получения культур других видов клостридий требуются более строгие анаэробные условия. Из всех посевов делают мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют. При положительном результате обнаруживают крупные грамположительные палочки *Cl. perfringens*. Для получения чистой культуры делают пересевы на сахарный кровяной агар в чашки Петри, которые инкубируют в строго анаэробных условиях при 37 °С в течение 3–4 сут. Выросшие колонии пересевают в пробирки со средой Китта — Тарощи. Идентификацию чистой культуры производят на основании признаков, перечисленных в табл. 31.

Дифференциальные признаки неспорообразующих и спорообразующих анаэробных бактерий

Признак	Репто- coccus	Репто- strepto- coccus	Vcillonella	Bactero- ides	Cl. perfringens	Cl. novyi	Cl. septicum	Cl. sordelli	Cl. histoly- ticum	Cl. tetani
Форма и расположение бактериальных клеток	Оди- ночные кокки	Цепоч- ки кок- ков	Короткие цепочки кокков	Мелкие палоч- ки	Крупные палочки	Круп- ные пал- очки	Тонкие палочки	Мел- кие пал- очки	Мел- кие пал- очки	Круп- ные пал- очки
Подвижность	—	—	—	±	—	+	+	+	+	+
Споры	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
Окраска по Граму	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+
Ферментация углеводов	с	+	—	+	+	с	+	с	—	—
Свертывание или пепто- низация молока	—	—	+	+	+	х	—	+	+	х
Образование H ₂ S	+	—	+	±	—	—	—	х	х	х
Образование индола	±	—	—	±	—	—	—	—	—	х
Разжижение желатина	—	—	—	±	+	+	+	+	+	+
Восстановление нитратов	+	—	+	±	х	х	х	х	—	—
Гемолиз эритроцитов	±	—	—	±	х	+	+	+	+	+
Образование токсина	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+

Условные обозначения: «+» — наличие признака; «—» — отсутствие признака; «х» — непостоянный признак; «±» — отсутствие признака у большинства штаммов; «±» — наличие признака у большинства штаммов; «с» — слабая ферментация.

Исследуют токсигенность выделенных бактерий методом люминесцентной микроскопии. Для этого колонию эмульгируют на предметном стекле в капле акридинового оранжевого, покрывают покровным стеклом и изучают в иммерсионной системе люминесцентного микроскопа. Наличие только зеленых палочек указывает на присутствие токсигенных особей.

Красные или зеленые с красными фрагментами палочки свидетельствуют о слабой токсигенности бактерий или ее отсутствии.

Для быстрого обнаружения токсина *Cl. perfringens* в раневом отделяемом определяют его лецитиназную активность (табл. 32).

Таблица 32

Определение лецитиназной активности токсина *Cl. perfringens*

Ингредиенты, мл	№ пробирки			
	1	2	3	4
Исследуемый материал	0,3	0,3	0,3	0,3
Лецитин	0,1	0,1	0,1	—
Раствор натрия хлорида	0,1	—	—	0,2
Сыворотка анти- <i>Cl. perfringens</i>	—	0,1	—	—
Сыворотка анти- <i>Cl. novyi</i>	—	—	0,1	—
Инкубация при 37 °С в течение 46–60 мин				
Учет результатов				

Положительная реакция на лецитиназу проявляется в виде помутнения жидкости в пробирке; при отрицательной реакции, характеризующейся нейтрализацией фермента соответствующей антисывороткой, жидкость остается прозрачной.

Биопроба. Для определения токсигенности исследуемую культуру, выращенную на среде Китта — Тароцци, центрифугируют и надосадочную жидкость вводят морской свинке, которая в положительном случае погибает.

Вследствие того, что токсины разных видов клостридий отличаются по своим антигенным свойствам, их серологическую идентификацию проводят в реакции нейтрализации на лабораторных животных. С этой целью смесь исследуемого токсина с антитоксической сывороткой (*Clostridium perfringens* или *Cl. novyi*) вводят подкожно морской свинке. В случае нейтрализации токсина сывороткой животное остается жи-

вым; при отрицательной реакции морская свинка погибает через 30 мин — 4 ч после инъекции.

ПИЩЕВАЯ ТОКСИКОИНФЕКЦИЯ, ВЫЗЫВАЕМАЯ CLOSTRIDIUM PERFRINGENS

Кроме анаэробной раневой инфекции, некоторые штаммы *Cl. perfringens* типов А, С, продуцирующие энтеротоксин, при попадании в организм *per os* могут вызывать интоксикацию, сопровождающуюся диареей. Энтеротоксин термолабилен и не разрушается пищеварительными ферментами.

Материал для исследования: рвотные массы, промывные воды желудка, кал, кровь, остатки пищи, от трупа — кровь, кусочки внутренних органов.

Лабораторная диагностика пищевых токсикоинфекций, вызванных *Cl. perfringens*, проводится так же, как и возбудителей анаэробной инфекции.

Бактериологическое исследование проводят с целью выделения и идентификации возбудителя, определения массивности обсеменения исследуемого материала этим микроорганизмом и типа выделяемого им токсина.

Первый день. Исследуемый материал десятикратно разводят пептонной водой до 10^{-10} и переносят по 1 мл из соответствующих разведений в расплавленную и охлажденную до 45 °С среду Вильсона — Блера. В ряде случаев засевают материал в кровяной или желточный агар, который разливают в чашки Петри. После застывания агара посев заливают 2 % МПА и инкубируют 6–8 ч в термостате при температуре 45–46 °С или 20 ч при температуре 37 °С.

Кроме того, гомогенаты исследуемых материалов сеют в жидкие питательные среды (Китта — Тарощи, китовопеченочно-дрожжевой гидролизат).

Посевы инкубируют при температуре 37 °С. Рост клостридий может наблюдаться через 6–8 ч. В этом случае дальнейшие исследования проводят в первый день.

Второй день. Подсчитывают колонии черного цвета в среде Вильсона — Блера. отбирают пробу, где сформировалось 1–30 колоний (20–100 на чашках) и пересчитывают на 1 мл (учитывая разведение и посевную дозу).

Для получения чистой культуры после микроскопии 3–5 колоний пересевают в среду Китта — Тарощи и 2–3 колонии — на лакмусовое молоко. Посевы выдерживают в термостате при температуре 37 °С в течение суток.

пересев на плотные питательные среды для получения отдельных колоний. Выделение чистой культуры представляет трудности, так как клостридии ботулизма часто находятся в ассоциациях с некоторыми аэробными бактериями. Иногда только многократные пересевы дают возможность получить чистую культуру. На сахарном кровяном агаре *Cl. 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 среды «пестрого» ряда. *Cl. botulinum* обладает протеолитическими свойствами: разжижает желатин, сыворотку, расщепляет яичный белок, кусочки мяса. Большинство штаммов сбраживает глюкозу, маннит, мальтозу и другие углеводы с образованием кислоты и газа. Антигенные свойства изучают с помощью реакции агглютинации с типовыми сыворотками.

Одновременно с изучением ферментативных свойств выявляют ботулинический токсин в фильтрате бульонной культуры и определяют его тип.

Метод определения ботулинического токсина при помощи фагоцитарного показателя. Ботулинический токсин угнетает фагоцитарную активность лейкоцитов, а специфические сыворотки, нейтрализуя токсин, устраняют это действие. Особенно целесообразно применение этого метода для выявления токсина в крови.

Ускоренный метод определения ботулинического токсина в питьевой воде. Метод основан на адсорбции токсина из воды тальком с последующим введением суспензии талька мышам.

ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ, ВЫЗВАННЫЕ НЕСПОРООБРАЗУЮЩИМИ АНАЭРОБНЫМИ БАКТЕРИЯМИ

Возбудителями разнообразных гнойно-воспалительных процессов довольно часто являются неспорообразующие анаэробные бактерии, принадлежащие к родам *Bacteroides*, *Veillonella*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*. Бактероиды — грамотрицательные бактерии, отличающиеся значительным полиморфизмом. Они могут иметь округлую, палочковидную формы и образовывать ветвящиеся нити. Они вызывают как моноинфекции, так и смешанные инфекции во всевозможных сочетаниях друг с другом и с аэробными бактериями — *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *E. coli*, кокками. Для микробиологической

диагностики этих заболеваний главным образом осуществляют бактериологическое исследование в строго анаэробных условиях, так как даже незначительное количество кислорода воздуха тормозит размножение бактерий, в результате чего они не растут на питательных средах.

Взятие материала (гноя, отделяемое раны, отечная жидкость) производят шприцем с хорошо притертым поршнем до полного его заполнения и вытеснения воздуха. Затем шприц надевают на иглу, вставленную через резиновую пробку в пробирку со смесью инертных газов ($N_2 + H_2$) и CO_2 , и вводят в нее исследуемый материал.

Бактериологическое исследование. Посевы производят в пробирку со средой Китта — Тароцци и в пробирку с полужидким тиогликолевым агаром: В его состав входят дрожжевой экстракт, триптон, цистеин, хлорид натрия, тиогликолевая кислота, метиленовый синий и 0,75 % агара. Посевы помещают в эксикатор или анаэроостат, который заполняют газовой смесью (с палладиевым катализатором) и инкубируют при 37 °С в течение 24—48 ч. После просмотра выросшей культуры делают мазки, окрашивают по методу Грама и микроскопируют. Бактериоскопия дает возможность установить однородность или неоднородность культуры, а по морфологии клеток и отношению к окраске по Граму ориентировочно отнести ее к определенному роду. Для получения чистой культуры делают пересевы на сахарный кровяной агар в чашки Петри, которые инкубируют в анаэробных условиях 3—4 сут до формирования изолированных колоний. После изучения колоний их пересевают на среду Китта — Тароцци. Идентификацию выделенной чистой культуры производят на основании присущих им дифференциальных признаков, которые определяют в тех же строго анаэробных условиях (табл. 31).

ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ

Столбнячный анатоксин, адсорбированный на гидроксиде алюминия — *Anatoxinum tetanicum purificatum aluminium hydroxydo adsorptum* — получают из фильтрата бульонной культуры *S. tetani*, обезвреженного по методу Рамона, очищенного, концентрированного и адсорбированного на гидроксиде алюминия. Применяют для профилактики столбняка, вводят подкожно, двукратно с интервалом 40—45 дней. Ревакцинацию проводят через 9—12 мес. Срок годности 3 года. Столбнячный анатоксин входит в состав ассоциированной коклюшно-дифтерийно-столбнячной вакцины (АКДС) и др. препаратов.

Противостолбнячную сыворотку (очищенную, концентрированную) — *Serum antitetanicum* — получают из крови лошадей, гиперимму-

пересев на плотные питательные среды для получения отдельных колоний. Выделение чистой культуры представляет трудности, так как клостридии ботулизма часто находятся в ассоциациях с некоторыми аэробными бактериями. Иногда только многократные пересевы дают возможность получить чистую культуру. На сахарном кровяном агаре *Cl. 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 среды «пестрого» ряда. *Cl. botulinum* обладает протеолитическими свойствами: разжижает желатин, сыворотку, расщепляет яичный белок, кусочки мяса. Большинство штаммов сбраживает глюкозу, маннит, мальтозу и другие углеводы с образованием кислоты и газа. Антигенные свойства изучают с помощью реакции агглютинации с типовыми сыворотками.

Одновременно с изучением ферментативных свойств выявляют ботулинический токсин в фильтрате бульонной культуры и определяют его тип.

Метод определения ботулинического токсина при помощи фагоцитарного показателя. Ботулинический токсин угнетает фагоцитарную активность лейкоцитов, а специфические сыворотки, нейтрализуя токсин, устраняют это действие. Особенно целесообразно применение этого метода для выявления токсина в крови.

Ускоренный метод определения ботулинического токсина в питьевой воде. Метод основан на адсорбции токсина из воды тальком с последующим введением суспензии талька мышам.

ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ, ВЫЗВАННЫЕ НЕСПОРООБРАЗУЮЩИМИ АНАЭРОБНЫМИ БАКТЕРИЯМИ

Возбудителями разнообразных гнойно-воспалительных процессов довольно часто являются неспорообразующие анаэробные бактерии, принадлежащие к родам *Bacteroides*, *Veillonella*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*. Бактероиды — грамотрицательные бактерии, отличающиеся значительным полиморфизмом. Они могут иметь округлую, палочковидную формы и образовывать ветвящиеся нити. Они вызывают как моноинфекции, так и смешанные инфекции во всевозможных сочетаниях друг с другом и с аэробными бактериями — *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *E. coli*, кокками. Для микробиологической

диагностики этих заболеваний главным образом осуществляют бактериологическое исследование в строго анаэробных условиях, так как даже незначительное количество кислорода воздуха тормозит размножение бактерий, в результате чего они не растут на питательных средах.

Взятие материала (гной, отделяемое раны, отечная жидкость) производят шприцем с хорошо притертым поршнем до полного его заполнения и вытеснения воздуха. Затем шприц надевают на иглу, вставленную через резиновую пробку в пробирку со смесью инертных газов ($N_2 + H_2$) и CO_2 , и вводят в нее исследуемый материал.

Бактериологическое исследование. Посевы производят в пробирку со средой Китта — Тароцци и в пробирку с полужидким тиогликолевым агаром. В его состав входят дрожжевой экстракт, триптон, цистеин, хлорид натрия, тиогликолевая кислота, метиленовый синий и 0,75 % агара. Посевы помещают в эксикатор или анаэроостат, который заполняют газовой смесью (с палладиевым катализатором) и инкубируют при 37 °С в течение 24—48 ч. После просмотра выросшей культуры делают мазки, окрашивают по методу Грама и микроскопируют. Бактериоскопия дает возможность установить однородность или неоднородность культуры, а по морфологии клеток и отношению к окраске по Граму ориентировочно отнести ее к определенному роду. Для получения чистой культуры делают пересевы на сахарный кровяной агар в чашки Петри, которые инкубируют в анаэробных условиях 3—4 сут до формирования изолированных колоний. После изучения колоний их пересевают на среду Китта — Тароцци. Идентификацию выделенной чистой культуры производят на основании присущих им дифференциальных признаков, которые определяют в тех же строго анаэробных условиях (табл. 31).

ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ

Столбнячный анатоксин, адсорбированный на гидроксиде алюминия — *Anatoxinum tetanicum purificatum aluminii hydroxydo adsorptum* — получают из фильтрата бульонной культуры *S. tetani*, обезвреженного по методу Рамона, очищенного, концентрированного и адсорбированного на гидроксиде алюминия. Применяют для профилактики столбняка, вводят подкожно, двукратно с интервалом 40—45 дней. Ревакцинацию проводят через 9—12 мес. Срок годности 3 года. Столбнячный анатоксин входит в состав ассоциированной коклюшно-дифтерийно-столбнячной вакцины (АКДС) и др. препаратов.

Противостолбнячную сыворотку (очищенную, концентрированную) — *Serum antitetanicum* — получают из крови лошадей, гиперимму-

низированных столбнячным анатоксином. Очищают и концентрируют методом «Диаферм-3». Для профилактики вводят подкожно или внутримышечно 30 000 МЕ, для лечения — 100 000–200 000 МЕ. Срок годности 2 года.

Иммуноглобулин человеческий противостолбнячный — *Immunglobulinum humanum antitetanicum* — получают из гамма-глобулиновой фракции сыворотки крови доноров, вакцинированных столбнячным анатоксином. Применяют для создания пассивного антитоксического иммунитета при травмах и для лечения. В 1 мл препарата содержится не менее 150 МЕ столбнячного антитоксина.

Антитоксические сыворотки противогангренозные (антиперфрингенс, антинови, антисептикум) — *Serum antigangrenosum purificatum concentratum antiperfringens typi A, antinovyi, antisepticum* — получают из сыворотки крови лошадей, иммунизированных соответствующими анатоксинами, очищают и концентрируют методом «Диаферм-3», выпускают в виде поливалентных препаратов (в комплекте). Применяют для лечения (создания пассивного антитоксического иммунитета) в дозе 150 000 МЕ (по 50 000 МЕ каждого вида), вводят внутривенно. Для профилактики вводят внутримышечно 30 000 МЕ. Срок годности 2 года.

Противоботулиническая сыворотка А, В, Е и F (очищенная, концентрированная) — *Serum antibotulinicum typorum A, B, E, F purificatum concentratum* — получают из крови лошадей, иммунизированных соответствующими сероварами ботулинических анатоксинов, очищают и концентрируют методом «Диаферм-3». Используют для профилактики при подозрении на ботулизм и лечения ботулизма, вводят внутримышечно и внутривенно. Срок годности 2 года. Моновалентные сыворотки можно использовать в диагностических целях для определения серовара токсина в исследуемом материале с помощью реакции нейтрализации на белых мышах.

Антибиотики — пенициллины: бензилпенициллина натриевая соль; тетрациклины: доксициклин, морфоциклин; цефалоспорины: цефокситин, моксалактам, цефметазол, цефалоридин, цефтриаксон; производные линкомицина: клиндамицин; ристомидин.

Производные хиноксалина: хиноксидин, диоксидин.

ЗАДАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ЗАНЯТИЮ

1. Изучить морфологию анаэробных клостридий. Просмотреть готовые, окрашенные по методу Грама мазки.

2. Изучить характер роста патогенных клостридий на средах для культивирования анаэробов (Китта — Тароцци, трубках Виньяля — Вейона).

3. Изучить демонстрацию проявлений столбняка у белой мыши.

4. Поставить биологическую пробу для обнаружения ботулинического токсина в пищевых продуктах.

5. Ознакомиться с морфологией анаэробных неспорообразующих бактерий родов *Bacteroides*, *Veillonella*, *Peptostreptococcus*, *Peptococcus* (просмотр готовых, окрашенных по Граму мазков).

6. Ознакомиться с препаратами для профилактики и лечения анаэробных инфекций.

Тема: ВОЗБУДИТЕЛИ ТУБЕРКУЛЕЗА

Цель: Определить основные этапы лабораторной диагностики туберкулеза, охарактеризовать биологическую активность возбудителя, особенности патогенеза туберкулеза, обосновать меры профилактики и лечения болезни.

Возбудитель туберкулеза относится к семейству *Mycobacterium*, порядку *Actinomycetales*. Патогенными для человека являются два вида — *M. tuberculosis* (человеческий вид) и *M. bovis* (бычий вид).

В патологии человека первое место занимает человеческий тип, вызывая 96–97 % случаев туберкулеза, 3–4 % приходится на бычий тип.

M. tuberculosis — тонкая палочка длиной около 2–4 мкм и толщиной 0,3–0,5 мкм. Обладает значительным полиморфизмом и при росте на питательных средах может давать более длинные формы — до 10 мкм. Спор не образует, подвижностью не обладает, капсулы не имеет.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Семейство, род и вид бактерий, вызывающих туберкулез.
2. Морфология и тинкториальные свойства микобактерий туберкулеза.
3. Химический состав микобактерий туберкулеза.
4. Культуральные и ферментативные свойства возбудителя. Антигенная структура.
5. Пути инфицирования туберкулезом.
6. Патогенез и клиника туберкулеза.
7. Лабораторная диагностика.
8. Лечение.
9. Специфическая профилактика. Вакцинация БЦЖ, туберкулиновая проба Манту.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дикий И.Л., Холуяк И.Ю., Шевелева Н.Е., Стегний М.Ю. Микробиология.— Х.: Прапор: Изд-во УкрФА, 1999.— С. 265–274.
2. Елинов Н.П., Заикина Н.А., Соколова И.П. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии.— М.: Медицина, 1988.— С. 171–172, 175–176.

МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Местом локализации туберкулезного процесса у человека могут быть любая ткань и орган: кишечник, почки, твердые мозговые оболочки, кожа, кости, но чаще всего — легкие.

Материалом для исследования в зависимости от локализации процесса служит мокрота, спинномозговая жидкость, промывные воды желудка и бронхов, которые собирают в стерильную посуду.

В лабораторной диагностике используют обычно бактериоскопический и бактериологический методы, иногда заражение животных, аллергические кожные пробы и серологические реакции.

Наиболее доступным методом является *бактериоскопический*. Для исследования у больных берут мокроту, плевральную жидкость или промывные воды бронхов. Материал, поступивший на исследование, помещают в чашки Петри и ставят на черную поверхность. Петлей или препаровальными иглами выбирают гнойный комочек, переносят его на предметное стекло и готовят два тонких мазка. Мазки окрашивают по методу Циля — Нильсена и микроскопируют, просматривая до 100 полей зрения (не менее 15 мин). При этом фон препарата, представленный клеточными элементами и слизистым веществом мокроты, имеет голубовато-синий цвет. Кислотоустойчивые микобактерии туберкулеза в мазке обнаруживают в виде тонких прямых или слегка изогнутых красных палочек, иногда расположенных под углом в виде римской цифры V (см. цв. вкл. XII).

Возбудители также могут располагаться кучками или небольшими скоплениями.

Микобактерии туберкулеза склонны к полиморфизму, который отчетливо проявляется под влиянием антибиотиков и химиотерапевтических препаратов. В связи с этим возбудитель в мазках может встречаться в виде длинных и тонких или толстых и грубых палочек с колбообразными расширениями на концах, похожих на кокки.

Единичные палочки в препарате можно обнаружить, если в 1 мл патологического материала их содержится не менее 100 000, поэтому применяют различные методы «обогащения» или накопления туберкулезных палочек.

Метод флотации предложен в 1931 г. Петенжером и основан на том, что прибавленный к мокроте бензол или ксилол разбивается при взбалтывании ее на мельчайшие капельки, которые, поднимаясь кверху, адсорбируют на своей поверхности микобактерии туберкулеза.

К 10–15 мл исследуемой мокроты прибавляют равное количество 0,5 % раствора едкого натра. Слянки плотно закрывают крышкой

и встряхивают в течение 10–25 мин в электровстряхивателе, затем приливают 2 мл ксилола (бензола или толуола) и 100 мл воды и снова встряхивают 10–20 мин, а затем отстаивают в течение часа при комнатной температуре.

При отстаивании на поверхности жидкости появляется флотационное кольцо, состоящее из всплывших капель ксилола с адсорбированными на их поверхности микобактериями туберкулеза. Это кольцо отсасывают пастеровской пипеткой с резиновым баллончиком и переносят на два предметных стекла. Мазки подсушивают, фиксируют и окрашивают по методу Циля — Нильсена.

Для ускоренной диагностики применяют люминесцентную микроскопию. Метод основан на способности липидов бактерий воспринимать люминесцентные красители и затем светиться при облучении их ультрафиолетовыми лучами. Исследуют мазок сухим объективом (объектив 40× при окуляре 10×), микобактерии туберкулеза светятся ярким золотисто-зеленым цветом на темном фоне.

Этот метод позволяет быстро просмотреть весь мазок и, следовательно, повышает количество находок микобактерий туберкулеза.

Однако бактериоскопическое исследование патологического материала не дает уверенности в постановке диагноза, так как не позволяет дифференцировать патогенные микробы от многочисленных представителей семейства *Mycobacteriaceae*, которые широко распространены в природе. В связи с этим основным методом является бактериологическое исследование патологического материала.

Бактериологическое исследование

Бактериологическое исследование является более эффективным, чем бактериоскопическое, и позволяет выявить в исследуемом материале 20–100 микобактерий, а также определить их устойчивость к лекарственным препаратам, вирулентность, видовую принадлежность.

Для получения чистой культуры микобактерий туберкулеза исследуемый материал (мокрота, промывные воды бронхов, плевральная жидкость) освобождают от сопутствующей микрофлоры, обрабатывая его кислотой или щелочью. При обработке серной кислотой к 15–20 г исследуемого материала добавляют 10 % серную кислоту, полученную взвесь центрифугируют 5 мин. Осадок засевают на пробирки со средой Ливенштейна — Йенсена.

Признаки роста микобактерий туберкулеза на плотной питательной среде появляются обычно на 3–4 нед. Отдельные штаммы растут 60 и даже 90 дней. Это заставляет выдерживать засеянные пробирки в термостате в течение 3-х мес. Для предотвращения высыхания среды поверх ватной пробки пробирки заливают расплавленным парафином.

Чистая культура возбудителя туберкулеза растет на питательной среде в виде сухого бугристого налета белого или желтоватого цвета, напоминающего цветную капусту.

При идентификации выделенной культуры микобактерий туберкулеза и дифференциации ее от потенциально-патогенных микобактерий учитывают морфологические и тинкториальные особенности, характер и скорость роста на питательных средах, биохимические свойства и вирулентность для лабораторных животных. Из биохимических свойств чаще всего определяют способность исследуемой культуры стимулировать никотиновую кислоту (ниациновая проба Конно). Это один из важных признаков, с помощью которого удастся отличить *Micobacterium tuberculosis*, хорошо синтезирующие никотиновую кислоту, от палочек *M. bovis*, образующих ее в минимальных количествах.

Для определения ниацина к культуре микобактерий в жидкой питательной среде добавляют 1 мл раствора KCN и 1 мл 5 % раствора хлорамина. При наличии ниацина через несколько минут появляется ярко-желтая окраска. Для нейтрализации KCN после учета результатов реакции в пробирке добавляют 3–5 мл 10 % раствора гидрокарбоната натрия.

В связи с широким применением химиотерапевтических препаратов для лечения больных туберкулезом, а также с тем, что лечение это проводится очень долго (иногда год и более), необходимым элементом бактериологического исследования при туберкулезе является определение лекарственной устойчивости выделенных культур.

Устойчивость микобактерий к противотуберкулезным препаратам определяют методом серийных разведений. Для этого различные химиотерапевтические препараты, используемые для лечения больных, в соответствующих концентрациях добавляют в среду Ливенштейна — Йенсена. Выделенную от больных чистую культуру микобактерий смешивают с физиологическим раствором, стандартизируют по оптическому стандарту (500 млн микробных тел в 1 мл) и засеивают в пробирки со средой. Учитывают результаты на 12–21 день инкубации.

Задержка роста микобактерий туберкулеза на среде с добавлением определенного химиопрепарата свидетельствует о чувствительности микобактерий к данному препарату.

Биологическое исследование

В настоящее время не находит широкого применения в лабораторной диагностике, так как экспериментальные животные (морские свинки) не чувствительны к штаммам микобактерий, обладающим

устойчивостью к тубазиду, фтивазиду, изониазиду и другим противотуберкулезным препаратам. Однако заражение животных и изучение морфологических реакций в их органах и тканях на выявление микобактерий туберкулеза является основным критерием вирулентности микобактерий.

Использование для постановки биологической пробы животных, зараженных туберкулезом, может послужить источником ошибочного диагноза. Поэтому морской свинке за 2 дня до постановки опыта проводят пробу Манту.

Для этого животным внутрикожно вводят 0,1 мл туберкулина, разведенного 1:10.

У здорового животного в месте введения туберкулина не отмечается каких-либо изменений. У животных, зараженных туберкулезом, на месте введения туберкулина через 24–48 ч появляется гиперемия и инфильтрат. Такие животные для опыта не пригодны.

Заражение морских свинок для постановки диагноза туберкулеза проводят следующим образом. Исследуемый материал обрабатывают серной кислотой для освобождения от посторонней микрофлоры и вводят подкожно после нейтрализации в объеме 1,0–1,5 мл морской свинке в область паха. При наличии в патологическом материале вирулентных бактерий туберкулеза в месте введения материала уже на 6–10 день появляется уплотнение. На поверхности его образуется незаживающая язва, из которой выделяется гной. Животных умерщвляют. Из гноя язвы и лимфатических узлов делают мазки, окрашивают их по Цилю — Нильсену. Под микроскопом в мазках обнаруживают в большом количестве микобактерии туберкулеза. Животных, у которых в месте введения патологического материала и в региональных лимфатических узлах изменений не обнаруживается, забивают через 6–8 нед после заражения. При вскрытии животных, заболевших туберкулезом, в лимфатических узлах брюшины и бронхов, в селезенке и почках отмечается большое количество хорошо заметных бугорков величиной с просыное зерно, некоторые из них некротизированы. Патоморфологическое обнаружение специфических изменений в органах дает основание для подтверждения вирулентности штамма.

Аллергическую кожную пробу (внутрикожную пробу Манту с туберкулином) применяют как диагностический метод для распознавания туберкулеза в детском возрасте, отбора контингента, подлежащего ревакцинации против туберкулеза, определения инфицированности населения туберкулезом как эпидемиологического показателя.

Положительная аллергическая реакция на введение туберкулина указывает на инфицированность организма микобактериями туберкулеза. Отрицательная реакция — об отсутствии иммунитета к туберкулезу.

Для этого используют:

1) *Альттуберкулин Коха* — очищенный сухой туберкулин представляет собой концентрированный фильтрат микобактерий туберкулеза человеческого и бычьего типов, в котором содержатся продукты жизнедеятельности и экстрактивные вещества указанных микроорганизмов. Туберкулин Коха стерилен, безвреден, не содержит микробных клеток и имеет цвет прозрачной сиропообразной жидкости коричневого цвета. Срок годности 5 лет.

Препарат применяют наочно (одну каплю на скарифицированный участок кожи) — реакция Пирке и внутрикожно (0,1 мл) — реакция Манту. Учитывают реакцию через 24–48 ч по образованию гиперемии и папулы не менее 5 мм.

2) *Туберкулин ППД (очищенный, сухой)* — более стабильный препарат, очищенный белок, приготовленный из фильтратов культур микобактерий человеческого и бычьего типов, выращенных на синтетической среде. Препарат представляет собой сухой порошок туберкулопротеина. Очищенный туберкулин в стандартном разведении содержит 0,1 мл 5 туберкулиновых единиц (ТЕ). В этом объеме ППД вводят для внутрикожной пробы. Положительная туберкулиновая проба указывает на аллергическое состояние, возникшее:

- а) после вакцинации БЦЖ;
- б) после контакта с больным туберкулезом;
- в) при наличии туберкулезного процесса в организме.

ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА

Современная фармакотерапия туберкулеза предусматривает комплексное использование специфических антибактериальных препаратов и лекарственных средств разных фармакологических групп.

Специфические препараты для лечения туберкулеза делят на две группы:

- а) препараты первого ряда (основные);
- б) препараты второго ряда (резервные).

К препаратам первого ряда, являющимся основными химиотерапевтическими средствами для лечения различных форм туберкулеза, относят:

1) гидразид изоникотиновой кислоты (изониазид) и его производные (фтивазид, салюзид, метаизид);

2) производные парааминосалициловой кислоты (ПАСК).

Препараты второго ряда (резервные) менее активны по действию на микобактерии туберкулеза, их основная особенность заключается в том, что они действуют на микобактерии, ставшие устойчивыми к препаратам первого ряда.

Противотуберкулезные препараты первого ряда высокоэффективны, однако при их применении довольно быстро развивается устойчивость микобактерий туберкулеза. При изолированном применении одного препарата устойчивые формы микобактерий могут появиться уже через 2–4 мес.

Развитие устойчивости наступает значительно медленнее при одновременном применении разных препаратов. Поэтому современная антибактериальная терапия туберкулеза является комбинированной. Больному одновременно назначают 3 или 2 препарата, причем комбинируются препараты первого и второго ряда.

Противотуберкулезные препараты распределяются также по степени их эффективности. Наиболее высокой бактериостатической эффективностью обладает изониазид, а затем рифампицин. Остальные препараты по степени активности распределяются следующим образом:

стрептомицин > канамицин > этионамид = протионамид > этамбутол > циклосерин > ПАСК.

Большинство противотуберкулезных препаратов действует на микобактерии туберкулеза бактериостатически, подавляя их размножение и уменьшая вирулентность. Изониазид и рифампицин в больших концентрациях действуют бактерицидно.

Для получения стойкого лечебного эффекта и предупреждения возможных рецидивов противотуберкулезные препараты должны применяться длительно.

ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА

Бактериальные препараты (вакцина БЦЖ) представляют собой живую лиофильно высушенную культуру авирулентного штамма микобактерий туберкулеза, полученную французскими учеными Кальметтом и Гереном. По внешнему виду это молочно-белая пористая масса, дающая при растворении в изотоническом растворе хлорида натрия гомогенную взвесь. Срок годности 1 год. Применяется для активной специфической профилактики туберкулеза. Препарат вводят строго внутривенно на предварительно обработанную наружную поверхность

левого плеча. Доза вакцин для детей и взрослых составляет 0,05 мг сухой вакцины. На месте введения препарата образуется папула диаметром 6–8 мм, исчезающая через 15–20 мин.

Вакцинируют всех детей на 3–5 день жизни внутривенно. Ревакцинацию проводят в 7, 12 и 17 лет.

ЗАДАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ЗАНЯТИЮ

1. Приготовление мазка из культуры БЦЖ. Окраска по Цилю — Нильсену. Микроскопия. Зарисовка в альбом.

2. Изучение под микроскопом готовых препаратов из мокроты больных туберкулезом. Микроскопия. Зарисовка в альбом.

3. Постановка кожных аллергических проб для диагностики туберкулеза (демонстрация).

4. Изучение профилактических, диагностических и лечебных препаратов.

Тема: ВОЗБУДИТЕЛЬ ДИФТЕРИИ

Цель: Охарактеризовать возбудителя дифтерии, знать методы лабораторной диагностики, профилактики и лечения заболевания.

Возбудитель дифтерии *Corynebacterium diphtheriae* относится к виду *Corynebacterium diphtheriae* рода *Corynebacterium*, семейству Actinomycetae.

Возбудитель дифтерии имеет вид тонких прямых или слегка изогнутых палочек.

Часто на концах наблюдаются утолщения в виде характерных булавовидных образований, откуда и произошло родовое название «коринебактерии» (от греч. *coryne* — булава).

Расположение отдельных палочек также имеет отличительную особенность: они лежат попарно, под прямым или острым углом, образуя латинские буквы V, L.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Морфологические, тинкториальные, культуральные свойства возбудителя дифтерии.
2. Факторы патогенности возбудителя дифтерии и его резистентность во внешней среде.
3. Источник, механизм и пути заражения дифтерией.
4. Основные клинические признаки дифтерии. Патогенез и иммунитет.
5. Лабораторная диагностика дифтерии.
6. Серо- и химиотерапия.
7. Профилактика дифтерии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дикий И.Л., Холупяк И.Ю., Шевелева Н.Е., Стегний М.Ю. Микробиология.— Х.: Прапор: Изд-во УкрФА, 1999.— С. 274–279.
2. Елинов Н.П., Заикина Н.А., Соколова И.П. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии.— М.: Медицина, 1988.— С. 172–176.

МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Бактериоскопический метод

Взятие материала для лабораторной диагностики определяется локализацией патологического процесса. Чаще всего дифтерия поражает слизистые оболочки верхних дыхательных путей. Поэтому для исследования берут материал, взятый при помощи стерильного ватного тампона из зева и носа.

Для скорейшего установления диагноза прибегают к ориентировочному микроскопическому исследованию патологического материала. Для этого делают с тампона два мазка на предметных стеклах, чтобы не загрязнить при этом тампон посторонней микрофлорой, стекла предварительно обжигают над пламенем спиртовки, а затем охлаждают. После фиксации над пламенем мазки окрашивают один по Граму, другой по Нейссеру (см. цв. вкл. XVIII).

При микроскопическом исследовании особое внимание следует обращать на характерное расположение дифтерийных палочек. Характерным признаком бактерий дифтерии являются включения зерен валютина, находящиеся на конце палочки. В мазках бактерии дифтерии располагаются обычно под углом друг к другу, напоминая римскую цифру V, в отличие от ложнодифтерийных бактерий, располагающихся параллельно друг другу в виде частокола.

При нахождении возбудителя дифтерии в мазках ориентировочный ответ дается в течение первых 2 ч по взятии материала. Он подкрепляет клинический диагноз врача и позволяет прибегнуть к немедленному введению антитоксической сыворотки.

Применение люминесцентной микроскопии позволяет повысить эффективность исследования. При этом дифтерийные палочки можно отличить от псевдодифтерийных по коричнево-красному свечению зерен волютина, которое они приобретают после окраски феноорохромом-корифосфином. Цитоплазма этих бактерий дает зеленое или желтое свечение. Однако возбудители дифтерии изменяют свою морфологию, в частности, при санации зева антибиотиками, поэтому для точной идентификации возбудителя проводят бактериологическое исследование.

Бактериологический метод

Патологический материал, поступивший для исследования на дифтерию, засевают на среды, избирательные для коринебактерий: свернутую сыворотку и теллуритовую среду Клауберга.

Через 24 ч с помощью лупы $\times 5$ просматривают микробный рост на поверхности засеянных питательных сред.

В пробирках на свернутой сыворотке колонии бактерий дифтерии имеют кремовый цвет, круглую, хорошо очерченную форму, ровный край.

На теллурит-кровяной среде Клауберга дифтерийные бактерии восстанавливают теллурит калия в металлический теллур, вследствие чего колонии имеют темно-серый или черный цвет. Интенсивность этой реакции неодинакова у различных штаммов: форма колоний также разная.

На основании этих признаков дифтерийные бактерии можно разделить на три типа:

1) тип *gravis*, серовато-черные колонии с радиальной исчерченностью и зубчатым краем, выделенный при тяжелых формах заболевания;

2) тип *mitis*, дающий блестящие черные колонии, выпуклые гладкие с абсолютно ровным краем, выделен при легких формах дифтерии;

3) тип *intermedius* — растет скудно, образует мелкие колонии черного цвета с прозрачной каймой по краю.

Способность бактерий дифтерии продуцировать токсин устанавливают в реакции преципитации в агаре (по Оухтерлони). Для этого в чашку Петри с питательным агаром, содержащим 15–20 % лошадиной сыворотки, 0,3 % мальтозы и 0,03 % цистина, кладут полоску фильтровальной бумаги (1,5×6 см), пропитанную антитоксической противодифтерийной сывороткой, содержащей 500 АЕ/мл. Перпендикулярно полоске штрихами подсевают исследуемые культуры. В качестве контроля используют культуру заведомо токсигенного штамма. Посевы инкубируют в термостате до следующего дня. При размножении токсигенной культуры в месте соединения токсина с антитоксической сывороткой в плотной питательной среде образуется преципитат в виде белых линий-усиков, свидетельствующий о встрече антигена (токсина) и антител (антитоксической сыворотки) (см. рис. 13).

Серологический метод

Серологические исследования в диагностике дифтерии являются вспомогательными.

С целью установления источника заболевания или для выявления эпидемической цепочки необходимо определить серологический тип возбудителя. В таких случаях с чистой культурой, выросшей на свернутой сыворотке, и типовыми адсорбированными агглютинирующими сыворотками ставят реакцию агглютинации на предметном стекле.

Для установления вида коринебактерий используют реакцию агглютинации. Агглютинирующая сыворотка против дифтерийной палочки не агглютинирует ни ложнодифтерийные палочки, ни дифтероиды, поэтому реакция агглютинации со смесью типовых сывороток может дать ответ о принадлежности культуры к коринебактериям дифтерии. Реакцию ставят в пробирках с разведениями сыворотки.

Для изучения состояния коллективного иммунитета против дифтерии применяют реакцию Шика.

При дифтерии весь процесс болезни в основном связан с действием в организме экзотоксина. Следовательно, состояние иммунитета к дифтерии обуславливается прежде всего наличием в крови антитоксина. Накопление антитоксина наблюдается обычно после перенесения заболевания в результате незаметной «бытовой» иммунизации организма или вакцинации в детском возрасте.

Для постановки реакции Шика дифтерийный токсин в дозе 1/40 DLM вводят в объеме 0,1 мл внутрикожно в область внутренней стороны предплечья. Реакция учитывается через 48 ч.

При наличии в организме антитоксина введенный токсин окажется нейтрализованным и никаких местных явлений не наступит — реакция будет отрицательной, что свидетельствует о невосприимчивости организма к дифтерии. Если же в месте введения токсина развивается воспаление — покраснение, болезненный инфильтрат, то это указывает на отсутствие антитоксина и на восприимчивость к заболеванию.

В последние годы в связи с высокой аллергизацией населения реакцию Шика применяют ограниченно, поэтому чаще используют РПГА, также отличающуюся высокой чувствительностью.

ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ

Противодифтерийная сыворотка (очищенная, концентрированная). Препарат готовят из сыворотки крови лошадей, гипериммунизированных дифтерийным анатоксином. Сыворотку очищают и концентрируют методом «Диаферм-3».

По внешнему виду сыворотка прозрачная или слегка опалесцирует. Применяют для лечения дифтерии, вводят внутримышечно или подкожно в количестве 5000–50 000 МЕ в зависимости от тяжести заболевания и возраста больных. Перед введением сыворотки для выявления повышенной чувствительности к лошадиному белку ее необходимо ввести внутрикожно, разведенную 1:100, в количестве 0,1 мл.

Для лечения носителей назначают антибиотики: тетрациклин, эритромицин.

Профилактика дифтерии заключается в ведении вакцины АКДС (см. стр. 336).

Взрослому населению, а также для вакцинации детей, переболевших коклюшем или привитых коклюшной вакциной, рекомендуется проводить однократные прививки адсорбированным дифтерийным анатоксином (АД-анатоксин).

Дифтерийно-столбнячный анатоксин представляет собой смесь дифтерийного и столбнячного анатоксинов, очищенных, концентрированных, адсорбированных гидроокисью алюминия. Препарат содержит в 1 мл 60 Lf дифтерийного анатоксина и 20 ЕС столбнячного анатоксина.

ЗАДАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ЗАНЯТИЮ

1. Микроскопия мазков, приготовленных из материала, взятого из зева лиц с подозрением на дифтерию. Зарисовать готовые препараты, окрашенные по Нейссеру.

2. Определение токсичности выделенных культур дифтерийных палочек методом преципитации в агаре (по Оухтерлони).

3. Изучение профилактических, диагностических и лечебных препаратов, применяемых для лечения, профилактики и диагностики дифтерии.

Тема: ВОЗБУДИТЕЛИ КОКЛЮША И ПАРАКОКЛЮША

Цель: Знать основные этапы лабораторной диагностики коклюша, охарактеризовать биологическую активность возбудителя, особенности патогенеза, обосновать меры профилактики и лечения болезни.

Возбудителем коклюша является *Bordetella pertussis*, относящаяся к роду *Bordetella* с неопределенным таксономическим положением.

Бактерии грамотрицательны, имеют вид палочек длиной до 2 мкм овоидной формы, неподвижны, не образуют спор, слабо окрашиваются анилиновыми красителями, при специальной окраске обнаруживается нежная капсула.

Бактерии коклюша вызывают острое заболевание верхних дыхательных путей с поражением интерстициальной ткани легких и локализацией в них возбудителя. Коклюш поражает детей дошкольного и младшего школьного возраста.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Морфология и биологические свойства возбудителей коклюша и паракоклюша.
2. Источник и механизм заражения.
3. Лабораторная диагностика коклюша.
4. Иммунопрофилактика и терапия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дикий И.Л., Холупняк И.Ю., Шевелева Н.Е., Степний М.Ю. Микробиология.— Х.: Прапор: Изд-во УкрФА, 1999.— С. 279–282.
2. Елинов Н.П., Заикина Н.А., Соколова И.П. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии.— М.: Медицина, 1988.— С. 169–170.

МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Сходную с коклюшем клиническую картину заболевания вызывает другой возбудитель — паракоклюшная палочка (*Bordetella parapertussis*). Коклюш и паракоклюш — два самостоятельных заболевания. Дети, переболевшие коклюшем, могут заразиться и заболеть паракоклюшем и наоборот. Лабораторная диагностика этих заболеваний

возможна только на основании бактериологического исследования, роль которого становится особенно необходимой в связи с частым появлением атипичных и стертых форм заболевания, обусловленных массовой профилактической иммунизацией детей против коклюша и широким применением антибиотиков для лечения этого заболевания.

Бактериоскопический метод

Для экстренной диагностики инфекции применяют реакцию иммунофлуоресценции (РИФ). Из взятого глоточным тампоном материала или колоний готовят два мазка и обрабатывают их флуоресцирующими иммуноглобулинами. Ответ получают через 2–6 ч.

Бактериологический метод

Целью исследования является выделение микробов рода *Bordetella* — *B. pertussis* и *B. parapertussis*.

Обследуются больные, кашляющие 5–7 дней и более. Материал забирают натошак, им может служить слизь с задней стенки глотки, взятая с помощью тампона или метода кашлевых пластинок. Материал засевают на казеиново-угольный агар (КУА). Для угнетения роста сопутствующей микрофлоры в питательную среду добавляют пенициллин.

Взятый материал круговыми движениями тампона засевают по краю чашки так, чтобы все стороны тампона коснулись поверхности среды. В центре чашки тампоном наносят штрихи, которые затем растирают шпателем для получения изолированных колоний. Чашки с посевами помещают в термостат вверх дном.

После 2–5-суточного инкубирования чашки с посевами вынимают и просматривают с лупой $\times 10$, выявляя колонии, характерные для коклюша и паракоклюша.

Рост *B. pertussis* на казеиново-угольном агаре появляется через 70–80 ч инкубации. Колонии возбудителя мелкие, влажные, блестящие, серые, напоминающие капли ртути. С поверхности питательной среды легко снимаются бактериологической петлей. Из колонии делают мазки и окрашивают их по Граму. Возбудитель коклюша имеет вид грамотрицательных, мелких овоидной формы палочек, которые располагаются поодиночке, парами, в редких случаях цепочками.

Колонии *B. parapertussis* по внешнему виду похожи на *B. pertussis*, но более крупные и появляются уже через 24 ч после инкубации в термостате.

Затем на предметном стекле ставят реакцию агглютинации выделенной микробной культуры с адсорбированной видоспецифической сывороткой, содержащей антитела к агглютинуину 1 (видоспецифиче-

ский для *B. pertussis*) и к агглютинуину 14 (видоспецифический для *B. paraptussis*).

Обязательна контрольная капля с физиологическим раствором. Положительная реакция наступает очень быстро — в течение 5 мин.

Однако даже при наличии типичных колоний, агглютинирующихся специфическими сыворотками, не всегда можно поставить дифференциальный диагноз между коклюшной и паракоклюшной палочками, так они обладают общими антигенами.

Для окончательной идентификации выделенного микроба ставят пробу на уреазу. В пробирку наливают 0,3 мл среды Закса, прибавляют 1–2 петли исследуемой культуры, затем пробирки встряхивают и помещают на 30 мин в термостат. Паракоклюшные бактерии, продуцирующие уреазу, расщепляют мочевины с образованием аммиака. Положительная реакция на уреазу появляется через 2 ч и характеризуется изменением цвета индикатора (фенолфталеина) в малиновый цвет.

Серологический метод

Методы серологического исследования применяются в поздние сроки заболевания. В связи с массовым проведением прививок, приводящих к выработке в крови здоровых людей специфических антител, необходимо использовать парные сыворотки. Нарастание титра антител в динамике заболевания подтверждает диагноз. Антигеном в серологических реакциях служит взвесь живых культур бордетелл или готовые диагностикумы.

Применяют реакцию агглютинации и реакцию связывания complemента.

Наиболее чувствительной и удобной для выявления коклюша является РПГА. Кровь для исследования берут из пальца с соблюдением обычных правил асептики, делают ряд разведений и добавляют диагностикум.

Результаты учитывают на следующий день. Диагностическое содержание антител 1:80–1:320.

ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ КОКЛЮША

Лечение коклюша сочетает этиотропную и патогенетическую терапию.

В качестве антимикробных средств для лечения коклюша и предупреждения осложнений оппортунистическими инфекциями применяют антибиотики широкого и направленного спектра действия, в том числе ампициллин.

Наиболее ответственная терапия у детей первого года жизни. В применении разнообразных методов лечения нуждаются больные тяжелым и осложненным коклюшем.

Назначается оксигенотерапия с помощью систематической подачи кислорода. В борьбе с гипоксией, имеющей большое значение в возникновении энцефальных расстройств, проводится оксигенация и очистка дыхательных путей от слизи и слюны.

Для лечения коклюша применяют иммуноглобулин нормальный человеческий.

Используются антигистаминные препараты (супрастин) с целью понижения астматического статуса бронхов. Для понижения давления в малом круге кровообращения рекомендуется эуфиллин.

При легких формах можно длительно пребывать на свежем воздухе, использовать аэрозоли из трав.

Профилактика коклюша заключается в проведении плановых прививок. Плановая вакцинация была введена в 1959 г. Для нее применяется вакцина АКДС — коклюшно-дифтерийно-столбнячная вакцина, адсорбированная гидроксидом алюминия. Данная вакцина представляет собой смесь очищенных концентрированных дифтерийного и столбнячного анатоксинов и клеток *B. pertussis*, убитых мертиололатом или формалином. По внешнему виду это мутная беловатая жидкость, при отстаивании которой образуется осадок, легко разбивающийся при встряхивании. Срок годности 1,5 года. Курс вакцинации включает 3 инъекции по 0,5 мл с интервалом в 30 дней. Сокращение интервалов не допускается.

Ревакцинацию АКДС-вакциной проводят однократно в дозе 0,5 мл через 1,5–2 года после законченной троекратной вакцинации.

Если вакцинация проведена в возрасте 2–3 лет, то ревакцинация не проводится.

Иногда на введение АКДС могут наблюдаться реакции: температура 39 °С, аллергическая сыпь, судороги, шок.

Во избежание осложнений прививки проводятся с учетом индивидуального развития ребенка.

ЗАДАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ЗАНЯТИЮ

1. Изучить морфологию *Bordetella pertussis*. Просмотреть и зарисовать готовые препараты из чистой культуры коклюшной палочки. Определить метод окраски.

2. Перечислить и описать диагностические, профилактические и лечебные препараты, применяемые при коклюше.

3. Оформить протокол занятия.

Тема: ПАТОГЕННЫЕ СПИРОХЕТЫ

Цель: Уметь охарактеризовать патогенные спирохеты и вызываемые ими заболевания, обосновать методы лабораторной диагностики, терапии и профилактики спирохетозов.

К патогенным спирохетам относятся: возбудитель сифилиса (*Treponema pallidum*), возбудители возвратного тифа — эпидемического (*Borrelia recurrentis*) и эндемического (*Borrelia caucasica*, *B. duttoni*), возбудитель лептоспироза (*Leptospira interrogans*) и др.

Treponema pallidum — тонкая спиралевидная клетка длиной 8–18 мкм, имеет 12–14 мелких равномерных завитков. Концы клетки заострены или закруглены. Трепонема обладает четырьмя видами движения. Плохо окрашивается анилиновыми красителями. По Романовскому — Гимза красится в бледно-розовый цвет.

Спирохеты рода *Borrelia* — крупные микроорганизмы длиной 20–40 мкм с 5–8 неодинаковыми завитками и заостренными концами. Подвижны. Хорошо окрашиваются анилиновыми красителями, грамотрицательны. При окраске по Романовскому — Гимза приобретают сине-фиолетовый цвет.

Leptospira interrogans — спиралевидная нить длиной 6–20 мкм. Имеет многочисленные тесно прилегающие друг к другу завитки. Концы клетки загнуты в виде крючков. Лептоспиры подвижны. По Романовскому — Гимза окрашиваются в бледно-розовый цвет.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Характеристика возбудителя сифилиса, возвратного тифа (эпидемического и эндемического), лептоспироза: таксономическое положение, морфологические, тинкториальные и культуральные свойства.
2. Источник инфекции и пути заражения при сифилисе, возвратном тифе, лептоспирозе.
3. Патогенез и клинические проявления вышеназванных инфекций.
4. Методы лабораторной диагностики.
5. Препараты для лечения и профилактики.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дикий И.Л., Холуяк Н.Ю., Шевелева Н.Е., Стегний М.Ю. Микробиология.— Х.: Прапор: Изд-во УкрФА, 1999.— С. 297–309.
2. Елинов Н.П., Заикина Н.А., Соколова И.П. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии.— М.: Медицина, 1988.— С. 177–179.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА СИФИЛИСА

Бактериоскопический метод

Материал для исследования: отделяемое твердого шанкра, пунктат регионарных лимфатических узлов (первичный период сифилиса), содержимое элементов сыпи (вторичный период).

Для получения отделяемого из твердого шанкра тщательно промывают язву или эрозию ваткой, смоченной изотоническим раствором хлорида натрия. Очищенную поверхность язвы осторожно раздражают стерильным шпателем или лопаточкой. Можно сжать края шанкра пальцами или пинцетом. Работа проводится в резиновых перчатках. Каплю отделяемого набирают в пастеровскую пипетку, наносят на предметное стекло, покрывают покровным стеклом и рассматривают под микроскопом в темном поле зрения. Трепонема имеют вид тонкой светлой подвижной спирали на темном фоне (см. цв. вкл. I).

При необходимости применяют окраску препарата по Романовскому — Гимза. Окрашивается трепонема в бледно-розовый цвет.

Используют также метод серебрения (по Левадिति). В препарате трепонема имеет вид черной спирали на светлом фоне.

Серологический метод при сифилисе является ведущим и позволяет ставить диагноз во все периоды заболевания.

Общепринятой и наиболее распространенной является реакция связывания комплемента (реакция Вассермана). Для ее проведения используют сыворотку крови больного или спинномозговую жидкость (при поздних формах сифилиса).

Особенность реакции Вассермана заключается в том, что при ее постановке используют три антигена:

- 1) специфический (антиген трепонемы);
- 2) неспецифический — кардиолипиновый (экстракт бычьего сердца с лецитином и холестерином);
- 3) неспецифический — спиртовой экстракт липоидов из мышцы сердца быка с холестерином.

Схема постановки реакции Вассермана представлена в табл. 33.

Наряду с реакцией связывания комплемента для диагностики сифилиса применяют реакцию преципитации, которая в этом случае называется осадочной. При добавлении липидного антигена к сыворотке

крови больного сифилисом выпадает хлопьевидный осадок, легко определяемый невооруженным глазом. Имеется много модификаций осадочных реакций. Более точными являются реакция Кана и цитохолевая реакция Закса — Витебского.

Таблица 33

Схема постановки реакции Вассермана

Ингредиенты, мл	№ пробирки			
	1	2	3	4 (контроль)
Инактивированная исследуемая сыворотка, разведенная 1:4	0,1	0,1	0,1	0,1
Изотонический раствор хлорида натрия	0,4	0,4	0,4	0,9
Антиген № 1, разведенный по титру	0,5	—	—	—
Антиген № 2, разведенный по титру	—	0,5	—	—
Антиген № 3, разведенный по титру	—	—	0,5	—
Комплемент (в рабочей дозе)	0,5	0,5	0,5	0,5
Термостат 45 мин				
Гемолитическая система (сенсibilизированная)	1,0	1,0	1,0	1,0
Термостат 40–60 мин в зависимости от наступления гемолиза в контроле				

В серодиагностике сифилиса используются также:

- ✓ Реакция иммунного прилипания (РИП). Основана на том, что патогенные тканевые трепонемы штамма Николс (полученные при заражении кролика) при смешивании с сывороткой больного в присутствии комплемента и эритроцитов человека прилипают к поверхности эритроцитов.
- ✓ «АНТИ-СИФ-С» для выявления суммарных антител к бледным трепонемам, с использованием конъюгатов на основе моноклональных антител к легким цепям иммуноглобулинов человека. Эффективна для диагностики сифилиса в инкубационном периоде, при клинических проявлениях и скрытых формах инфекции. Наибольшее применение находит при исследовании донорской крови.
- ✓ «АНТИ-СИФ-М» для выявления IgM — антител к бледным трепонемам (с использованием моноклонального конъюгата к тяжелым цепям IgM человека). Применяется для постановки диагноза сифилиса в инкубационном периоде (через 1–2 нед после инфицирования).

Наиболее специфической серологической реакцией в диагностике сифилиса считается реакция иммобилизации трепонем (РИТ). Она основана на потере подвижности бледной трепонемы при добавлении к ее культуре сыворотки крови больных сифилисом в присутствии комплемента. Антигеном в этой реакции служит взвесь живых трепонем, полученных из тестикулярной ткани кролика, зараженного экспериментальным сифилисом. Трепонемы сохраняют в специальной среде, не угнетающей их подвижность. В пробирку вносят взвесь тканевых трепонем, добавляют исследуемую сыворотку и свежий комплемент (сыворотка крови морской свинки). Параллельно ставят два контроля: с нормальной сывороткой (без антител) и с инактивированной сывороткой (без комплемента). Пробирки помещают в анаэробный стат и выдерживают при температуре 35 °С в течение 18 ч. Затем из содержимого пробирок делают препараты «раздавленная» капля, насчитывают 25 трепонем и определяют, сколько из них подвижных и утративших подвижность. Процент специфически иммобилизованных трепонем вычисляют по формуле:

$$\frac{(A-B) \cdot 100}{A}$$

где A — количество подвижных трепонем в контроле,

B — количество подвижных трепонем в опыте.

Результат реакции считают положительным, если процент иммобилизации выше 50, а отрицательным — ниже 20.

В серодиагностике сифилиса большая роль отводится непрямой реакции иммунофлуоресценции (РИФ), являющейся наряду с РИТ наиболее специфической.

ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СИФИЛИСА

Бензилпенициллин, бициллин, экстенциллин, ретарпен, тардоллин, препараты мышьяка, висмута, ртути.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВОЗВРАТНОГО ТИФА (ЭПИДЕМИЧЕСКОГО И ЭНДЕМИЧЕСКОГО)

Основной метод — *бактериоскопический*. Для исследования берут кровь больного (во время температурного приступа), делают мазки и толстую каплю. Боррелии хорошо окрашиваются всеми анилиновыми красителями. Обычно препарат красят разведенным фуксином. Толстую каплю по Романовскому — Гимза. Боррелии окрашиваются фуксином в розовый, а краской Гимзы — в фиолетово-розовый цвет (см. цв. вкл. XXI).

Нативные препараты изучают в темном поле зрения.

В период между приступами с помощью обычных методов боррелии обнаружить не удастся. В таких случаях целесообразно применять методы обогащения. 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 сливают жидкость, из осадка делают препарат и микроскопируют в темном поле зрения, а также готовят толстые мазки и окрашивают.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

С целью дифференциации возбудителей эпидемического (вшивого) и эндемического (клещевого) возвратного тифа 0,5–1,0 мл цитратной крови больного вводят подкожно морским свинкам. Через 5–6 дней в крови животных появляются боррелии. Морские свинки чувствительны к возбудителям клещевого возвратного тифа. Боррелии вшивого возвратного тифа не патогенны для животных.

ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВОЗВРАТНОГО ТИФА

Пенициллин, тетрациклин, препараты мышьяка (для лечения эпидемического возвратного тифа).

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЛЕПТОСПИРОЗА

С целью диагностики лептоспироза применяют микроскопический, бактериологический, серологический и биологический методы.

Микроскопический метод. Лептоспиры с трудом воспринимают окраску, поэтому изучают живых возбудителей в темном поле зрения. Кровь больного исследуют микроскопически в первые 5 дней болезни. В шприц набирают 2 мл 1,5 % раствора цитрата натрия и этим же шприцем из вены берут 1 мл крови больного. Смесь сливают в стерильную пробирку и отстаивают в течение часа. Из верхнего прозрачного слоя готовят «раздавленную» каплю и исследуют в темном поле с сухим объективом.

Мочу, спинномозговую жидкость больного центрифугируют и из осадка готовят препараты.

Бактериологический метод. Кровь, мочу, спинномозговую жидкость засевают в несколько пробирок с питательной средой или дистиллированной водой.

При размножении лептоспир видимых изменений в питательной среде не происходит, она остается прозрачной, поэтому контроль роста осуществляют при помощи микроскопии «раздавленной» капли в темном

поле зрения через каждые 5–6 дней. Идентификацию культуры проводят при помощи реакции агглютинации с типовыми агглютинирующими сыворотками. Всего выделяют 18 серогрупп лептоспир.

Серологический метод. В крови больных лептоспирозом обнаруживают агглютинины и лизины. Максимального уровня титр антител достигает на 14–17 день болезни. Постановка реакции агглютинации не отличается какими-либо особенностями за исключением способа учета результатов, который проводится под микроскопом в темном поле зрения. Антигеном является взвесь живых лептоспир. В результате реакции отмечают феномен лизиса и агглютинации. Реакция агглютинации лептоспир, не сопровождающаяся лизисом, не может считаться специфичной. Лизис наблюдают в первых разведениях сыворотки, а агглютинацию — в более отдаленных. Диагностическим титром считают 1:100 (для свежей крови).

Для серологической диагностики лептоспироза применяют также РСК. Комплементсвязывающие антитела появляются в крови на 5–6 день болезни. В качестве антигена используют готовые высушенные культуры. Методика выполнения реакции не отличается от общепринятой.

Биологический метод. С целью выявления лептоспир проводят заражение кроликов-сосунков или молодых морских свинок кровью или мочой больного. Заражение производят внутрибрюшинно или подкожно. Персонал, ухаживающий за экспериментальными животными, должен работать в резиновых перчатках. При наличии лептоспир в материале больного животные заболевают на 3–5 сутки, а затем погибают с явлениями желтухи и геморрагиями в органах и тканях.

ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ ЛЕПТОСПИРОЗА

Пенициллин, тетрациклин, лептоспирозный иммуноглобулин.

Убитая (гретая) лептоспирозная вакцина, содержащая основные серовары лептоспир.

ЗАДАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ЗАНЯТИЮ

1. Постановка реакции Вассермана (имитационная).
2. Изучение препаратов для лечения и профилактики сифилиса, возвратного тифа, лептоспироза.
3. Зарисовка возбудителей сифилиса, возвратного тифа, лептоспироза.

Тема: ПАТОГЕННЫЕ ПРОСТЕЙШИЕ

Цель: Изучить особенности морфологии, размножения простейших, основные свойства возбудителей; знать патогенез и клинику протозойных инфекций, основные методы лабораторной диагностики, изучить меры профилактики и лечения заболеваний, вызываемых патогенными простейшими.

Простейшие — это одноклеточные эукариотные организмы, более высоко организованные по сравнению с бактериями: имеют цитоплазму, дифференцированное ядро, оболочку и примитивные органоиды. Представители некоторых видов обладают двумя и более ядрами.

Простейшие (тип Protozoa) разделяются на четыре класса, различающихся по способу движения.

Класс 1 — Sarcodina (саркодовые или корненожки). Передвигаются, образуя псевдоподии. Патогенный вид — дизентерийная амеба.

Класс 2 — Flagellata или Mastigophora (жгутиковые). Передвигаются при помощи жгутов. Патогенные виды — трипаносомы, лейшмании, лямблии.

Класс 3 — Sporozoa (споровики). Не имеют постоянных органов движения; обладают половым и бесполом циклом развития. При половом цикле образуют цисты, ранее принимавшиеся за споры, откуда и название — споровики. Некоторые формы в определенных стадиях развития обладают жгутиками или амeboидным движением (например, молодой шизонт малярийного плазмодия амeboидно подвижен).

Класс 4 — Infusoria (инфузории) или Ciliata (реснитчатые). Передвигаются при помощи ресничек. Патогенный представитель — *Balantidium coli*.

У человека могут паразитировать свыше 50 видов простейших.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Систематика патогенных простейших.
2. Морфология и тинкториальные свойства дизентерийной амебы, токсоплазм, трихомонад, трипаносом, лейшманий, лямблий, балантидий, пневмоцист, криптоспоридий, кокцидий, саркоцист, возбудителей малярии.

3. Культуральные свойства простейших.
4. Резистентность патогенных простейших, эпидемиология.
5. Патогенез и клиника амебиаза, малярии, токсоплазмоза, трихомоноза, трипаносомоза, лейшманиоза, лямблиоза, балантидиоза, пневмоцистоза, криптоспоридиоза, кокцидиоза, саркоцистоза.
6. Иммуитет при заболеваниях, вызванных простейшими.
7. Принципы лабораторной диагностики.
8. Лечение и профилактика.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дикий И.Л., Холуяк И.Ю., Шевелева Н.Е., Стегний М.Ю. Микробиология.— Х.: Прапор: Изд-во УкрФА, 1999.— С. 309–329.
2. Елинов Н.П., Заикина Н.А., Соколова И.П. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии.— М.: Медицина, 1988.— С. 182–185.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ПРОТОЗОЙНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Основным методом лабораторной диагностики заболеваний, вызванных патогенными простейшими, является микроскопический метод.

Для диагностики некоторых инфекций используют культуральное исследование (амебиаз, трихомоноз, трипаносомоз, лейшманиоз), серологический, аллергический (кожный лейшманиоз, токсоплазмоз) и биологический (токсоплазмоз, трипаносомоз, лейшманиоз) методы.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА АМЕБИАЗА

Возбудитель — *Entamoeba histolytica*.

Материал для исследования: испражнения, содержимое абсцессов печени, легких и других органов, мокрота, биоптат кишечника, печени и др.

Микроскопический метод

Из исследуемого материала готовят нативные неокрашенные мазки и окрашенные раствором Люголя, железным гематоксилином по Хайденхайну (см. цв. вкл. XXV).

Приготовление нативного мазка фекалий

На предметные стекла, отступая от края на 1,5–2 см, пипеткой нанести по 1–2 капли изотонического раствора в двух местах с промежутком в 4 см. Кончиком деревянной палочки из пробы фекалий выбрать патологические примеси или небольшой кусок и перенести в каплю на предметное стекло, растереть до получения равномерной негустой эмульсии. Той же палочкой набрать вторую порцию фекалий из другого участка пробы и приготовить препарат из второй капли на предметном

стекле. Палочку оставить в банке с пробой фекалий. Пользоваться стеклянными палочками не рекомендуется, так как ими не удастся набрать слизистые комочки. Жидкие кровянисто-слизистые испражнения без видимой примеси фекальных масс могут быть исследованы без добавления изотонического раствора натрия хлорида.

Полученные препараты (нативные мазки), если они оказались сухими, разбавляют из пипетки одной каплей изотонического раствора, накрывают покровными стеклами.

В правильно приготовленном нативном мазке фекалий покровное стекло должно плотно прилегать к предметному с равномерным распределением жидкости между стеклами без ее выступания за пределы покровного стекла. Если после наложения покровного стекла капля эмульсии выступила из-под покровного стекла и попала на ее верхнюю сторону, то препарат бракуют и готовят новый.

Густой мазок малопрозрачен. Если же взять слишком мало фекалий, то мазок получается слишком разведенным и простейших в нем может просто не оказаться. Через правильно приготовленный мазок должен быть виден печатный текст.

Просматривают не менее 5–6 мазков. После ориентировочного просмотра под малым увеличением обязательно применяют среднее увеличение ($\times 10$, $\times 40$). Освещение не должно быть ярким, иначе можно пропустить прозрачные объекты. Передвигать препарат наиболее удобно препаратоводителем.

В нативном мазке наблюдают подвижные вегетативные формы. Отсутствие у живых неокрашенных дизентерийных амёб ядер позволяет отличить их от других видов амёб. Цисты отличаются постоянной формой и наличием оболочек. Строение цист видно плохо, ядра не просматриваются. Поэтому исследуют и мазок, окрашенный раствором Люголя.

Приготовление мазка, окрашенного раствором Люголя

На предметное стекло нанести по 1–2 капли раствора Люголя в двух местах. Следующие этапы аналогичны приготовлению нативного мазка.

По окончании работы предметные стекла с мазками поместить в посуду с дезинфицирующим раствором.

Состав раствора Люголя по унифицированной методике: йодид калия — 3 г; кристаллический йод — 1,5 г; вода дистиллированная — 100 мл. Вначале растворяют йодид калия, затем йод. Раствор стабилен в темной посуде с притертой пробкой при комнатной температуре не более месяца.

Цисты окрашиваются в золотисто-коричневый цвет. На фоне цитоплазмы заметны ядра, видны их строение и число. Хорошо виден гликоген, окрашивающийся в разные оттенки коричневого цвета. При окраске раствором Люголя вегетативные формы погибают и определяются с трудом.

Цисты дизентерийной амебы в препаратах, окрашенных железным гематоксилином, имеют те же размеры и общий вид, что и при обработке раствором Люголя. В препаратах, окрашенных гематоксилином, в просветной форме дизентерийной амебы зерна периферического хроматина нередко образуют серповидное скопление под ядерной оболочкой. Этот признак позволяет дифференцировать тканевую и просветную форму амёб в окрашенных препаратах.

Одним из основных условий при проведении лабораторной диагностики амёбиаза является исследование свежих испражнений, т. е. не позднее 15–20 мин после получения их от больного.

При температуре 20–40 °С амёбы активно подвижны. При движении 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 амёб уменьшается, они округляются и становятся неподвижными. Поэтому препарат необходимо уберечь от охлаждения. Для этого исследуемый материал помещают на подогретое предметное стекло или рассматривают его на специальном нагревательном столике микроскопа. Цисты амёб можно обнаружить и в оформленном кале даже при хранении его до исследования в течение нескольких часов.

При невозможности немедленного исследования испражнений допускается их консервация.

Консервация простейших

Необходимость в консервации простейших возникает при заборе материала у больных в сельской местности, на дому, при удаленности лаборатории от стационара или невозможности срочного исследования, направления материала на консультацию и т. д.

Консервант можно заранее разлить во флаконы и передать в лечебные учреждения для последующего сбора фекалий. К недостаткам относятся потеря подвижности и определенная деформация простейших, что заметно затрудняет диагностику. Поэтому сбор фекалий в консервант не может заменить исследование нативных препаратов.

Консерванты могут иметь различный состав.

Консервант Барроу (Burgows, 1967)

а) консервирующий раствор:

хлорид натрия	0,7 г
формалин концентрированный	5 мл
этанол 96 %	12,5 мл
фенол кристаллический	2 г
вода дистиллированная	до 100 мл

б) красящий раствор:

0,1 % раствор тионина или азура, при их отсутствии — метиленового синего.

Этим консервантом пользуются, когда исследование материала возможно в сроки не более 2 мес.

Консервант Сафаралиева (1963)

сульфат цинка	1,65 г
формалин концентрированный	10 мл
фенол кристаллический	2,5 г
уксусная кислота концентрированная	5 мл
метиленовый синий	0,2 г
вода дистиллированная	до 100 мл

Фенол предварительно растапливают на водяной бане. Этот консервант используют при исследовании материала в сроки более месяца. Простейшие окрашиваются в синий цвет.

Консервант Турдыева (1966)

водный раствор нитрита натрия (0,2 %)	80 мл
раствор Люголя	8 мл
формалин концентрированный	10 мл
глицерин	2 мл
уксусная кислота крепкая	5 капель

Раствор Люголя готовят, растворяя в 250 мл дистиллированной воды 10 г йодида калия и 5 г кристаллического йода.

Консервант отличается от предыдущих тем, что простейшие в нем не окрашиваются и не теряют блеска. Материал из консерванта Турдыева при необходимости можно обработать раствором Люголя по общепринятой методике. Простейшие сохраняются несколько месяцев.

Ход обнаружения простейших. Консервант разливают в пенициллиновые флаконы примерно до половины их объема. Исследуемый материал от каждого большого немедленно после взятия переносят во флакон в количестве, соответствующем примерно 1/3 взятого консерванта. При помощи палочки готовят эмульсию фекалий. Флакон закрывают резиновой пробкой, которую закрепляют липкой лентой.

На флаконе надписывают его порядковый номер, а все сведения о больном указывают в направлении, прилагаемом к флакону:

В лабораторию

НАПРАВЛЕНИЕ

(кал на простейшие, в консерванте)

1. Номер флакона
2. Дата и время сбора
3. Ф. И. О., возраст больного
4. Домашний адрес больного
5. Дата заболевания
6. Дата госпитализации
7. Предварительный диагноз
8. Характер испражнений: оформлен, полуоформлен, кашицеобразный, жидкий (*нужное подчеркнуть*)
9. Для анализа взято: прожилки крови, слизь, комочки гноя, кал (*нужное подчеркнуть*)
10. Медицинское учреждение
11. Подпись медработника

Перед исследованием консервированный материал не следует перемешивать. Каплю придонного осадка пипеткой переносят на предметное стекло и тщательно растирают стеклянной или деревянной палочкой до получения равномерной эмульсии. Если материал был собран в консервант Барроу, то добавляют каплю красящего вещества. После этого каплю накрывают покровным стеклом и просматривают под средним увеличением микроскопа. В отдельных случаях целесообразно использовать масляную иммерсию.

Оценка результатов. Просматривают 2–3 препарата, отмечая всех замеченных простейших. Дифференциальный диагноз проводят так же, как в мазке при окраске раствором Люголя. Однако в данном случае красители не окрашивают гликоген и, напротив, позволяют выявить хроматоидные тела. Структуры окрашиваются в синий цвет (за исключением консерванта Турдыева). Внутренняя структура балантидиев в консервирующем растворе становится неразличимой, поэтому их определяют по густому слою ресничек по периферии клеток.

При отрицательном результате исследования консервированного материала рекомендуют 1–1,5 мл его поместить в центрифужную пробирку, добавить 2/3 объема воды и 1/3 объема эфира и центрифугировать 3 мин при 1500 об/мин. Осадок микроскопируют.

Лаборант должен учитывать особенности изменения морфологии простейших в указанных консервантах в зависимости от сроков хранения материала.

При хранении материала в течение 1 сут вегетативные формы и цисты простейших сохраняются хорошо во всех консервантах.

При хранении до 10 сут вегетативные формы дизентерийной и кишечной амёб начинают изменяться, уменьшается их число с хорошо сохранившимся ядром, в цитоплазме появляется зернистость, но все же определение амёб вполне возможно. Наименее изменяются амёбы в консерванте Барроу. Цисты сохраняются достаточно хорошо во всех консервантах.

Амёбы карликовая и Гартмана, хиломастикс хорошо сохраняются в консервантах Турдыева и Барроу, но трудно различимы в консерванте Сафаралиева. Трихомонады хорошо сохраняются только в консерванте Турдыева.

При хранении материала от 10 дней до 1 года цисты простейших сохраняются во всех консервантах. Некоторая часть цист амёб приобретает грубую зернистость (в консерванте Сафаралиева — интенсивно перекрашиваются) и у них становятся неразличимыми ядра, но остальная часть цист сохраняет свою структуру и может быть определена. Цисты амёбы Гартмана, карликовой амёбы, хиломастикса хорошо сохраняются только в консерванте Турдыева.

Гораздо больше изменяются при длительном хранении вегетативные формы простейших. Вегетативные формы дизентерийной и кишечной амёб лучше сохраняются в консерванте Турдыева и Барроу, хотя ядра у части амёб становятся неразличимыми. В консерванте Сафаралиева цитоплазма амёб становится зернистой, перекрашивается, но ядра видны хорошо. Балантидии лучше сохраняются в консерванте Турдыева.

Таким образом, при кратковременном хранении материала пригодны все консерванты, но несколько предпочтительней консервант Барроу, особенно для сохранения вегетативной формы амёб. Для длительного хранения материала рекомендуются консерванты Сафаралиева и Турдыева.

При использовании консерванта Сафаралиева цитоплазма дизентерийной амёбы окрашивается в бледно-синий цвет, хроматин ядра — в интенсивно-синий, пищеварительные и гликогеновые вакуоли остаются бесцветными. Этот метод позволяет отличить дизентерийную амёбу от кишечной (*Entamoeba coli*), у которой кариосома расположена эксцентрично, а глыбки периферического хроматина неодинаковы по величине.

Подкрашивание мазка испражнений значительно облегчает дифференцировку цист и вегетативных форм амёбы от других простейших кишечника.

Просветные формы и цисты дизентерийной амебы выделяются в периоды ремиссии заболевания или здоровыми выделителями, т. е. они могут быть признаком только носительства. Поэтому при подозрении на возможность заболевания амебиазом проводят многократные исследования, назначают солевое слабительное, так как вегетативную тканевую форму можно обнаружить только в жидких и полужидких фекалиях.

При этом исследуют в первую очередь патологические примеси (комочки слизи).

Обнаружение в испражнениях эритрофагов (вегетативная тканевая форма) указывает на активность процесса или наличие распространенного поражения толстой кишки.

При исследовании содержимого абсцессов, полученного во время операции или пункции, амебы чаще обнаруживаются в материале, взятом на границе здоровой и пораженной тканей, на внутренней поверхности капсулы абсцесса, чем непосредственно в гное. Предшествовавшая антибиотико- или химиотерапия могут обусловить отрицательный результат такого исследования.

Культуральное исследование

Если обнаружить амебы в препаратах при микроскопии не удастся, делают посев кала или других материалов на среды Павловой, с печеночным экстрактом и др.

Серологический метод

Наиболее эффективно применение серологических реакций для диагностики внекишечных форм амебиаза. Наиболее чувствительной считается РНГА с антигеном из разрушенных ультразвуком *E. histolytica*. Применяются иммунофлуоресцентные методы, в том числе для выявления амеб в тканях. При абсцессах печени реакция иммунофлуоресценции (РИФ) в высоких титрах положительна практически у всех больных. Применяются также РСК, реакция агглютинации латекса (РАЛ), встречный иммуноэлектрофорез (как для обнаружения антител, так и для выявления специфического амебного антигена). Разработана и считается перспективной реакция энзимомеченных антител (РЭМА).

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА МАЛЯРИИ

Возбудители: *Plasmodium falciparum* (тропической малярии);
Plasmodium malariae (четырёхдневной малярии);
Plasmodium vivax (трехдневной малярии);
Plasmodium ovale (трехдневной овале-малярии).

Материал для исследования: кровь.

Микроскопический метод

Микроскопический диагноз малярии основывается на обнаружении в крови больного плазмодиев. Исследование крови на малярию производится как при высокой температуре у больного, так и в период апирекции; *P. falciparum* легче обнаружить в периферической крови во время приступа, так как дальнейшее развитие паразита происходит в капиллярах внутренних органов. При первых приступах малярии количество возбудителя в крови бывает невелико, что требует тщательного исследования препаратов крови и повторных ее заборов методом толстой капли для исследования на наличие паразитов. Исследования проводят в течение 2–3 сут каждые 6–8 ч. Рекомендуется делать серию толстых капель — приготовление 6–8 толстых капель на 3–4 стеклах. Микроскопируют мазок и толстую каплю.

По результатам микроскопии толстой капли ставят диагноз — малярия, а по микроскопии мазка определяют вид возбудителя.

Преимущество способа толстой капли заключается в том, что в поле зрения оказывается большое количество крови (в 40 раз больше чем в мазке) и, следовательно, увеличивается концентрация паразитов в поле зрения, что очень важно при незначительном содержании их в крови.

Взятие крови больного на малярию производят в любое время суток; взятие крови производят в резиновых перчатках, которые обрабатываются 70° этиловым спиртом. Кровь берут у взрослых из концевой фаланги 4-го пальца левой руки, у детей до 6 мес — из большого пальца ноги, до 1 года — из большого пальца руки.

Место прокола обрабатывается стерильным тампоном, смоченным 70° спиртом. После высыхания спирта производится прокол индивидуальным стерильным скарификатором. Первую каплю крови вытирают сухим стерильным тампоном.

Кровь набирают в стерильный индивидуальный капилляр Панченко.

Приготовление тонкого мазка (рис. 28)

На физически и химически чистое предметное стекло нанести каплю крови из капилляра Панченко, отступая от края на 1–1,5 см. Шлифованным стеклом, которое уже чем предметное стекло, прикоснуться к капле и под углом 30–35° провести вдоль стекла. Правильно сделанный мазок должен быть равномерным, умеренной толщины и заканчиваться «бахромой». Если при приготовлении мазка угол между стеклами будет больше 35°, то мазок будет толстым и коротким, если менее 30°, то тонким и длинным. Мазок высушивают при комнатной температуре, избегая попадания прямых солнечных лучей.

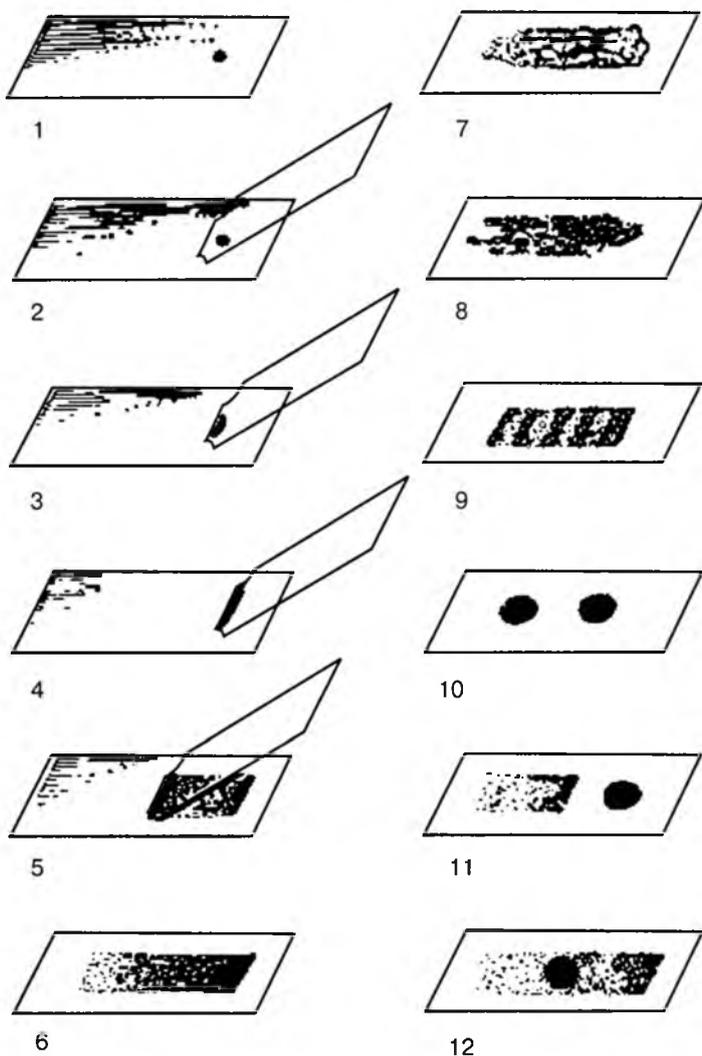


Рис. 28. Приготовление мазка и толстой капли крови:
 1–6 — приготовление тонкого мазка; 7–9 — неправильно приготовленные мазки; 10–12 — разные способы приготовления толстой капли

Простым карандашом по краю мазка указывается фамилия, имя, отчество больного, дата и время взятия крови. Не рекомендуется подписывать стеклографом.

Мазок необходимо зафиксировать в 96° (можно 70°) спирте или в фиксаторе Май-Грюнвальда в течение 3 мин. После фиксатора Май-Грюн-

вальда промыть водой и окрашивать по Романовскому — Гимза в течение 30–50 мин. В жаркое время года препарат окрашивается быстрее.

Приготовление толстой капли крови

Капилляром Панченко наносят на предметное стекло каплю крови диаметром 1 см в двух местах на расстоянии 1–1,5 см от узких краев стекла. Между каплями записывают фамилию, имя, отчество больного, дату и время взятия крови.

Подсушивают 5–10 мин. Толстую каплю в отличие от мазка крови не фиксируют. Окрашивают по Романовскому — Гимза. Под влиянием водного раствора краски нефиксированные эритроциты гемолизируются, препарат становится прозрачным. Если же толстая капля будет зафиксирована, то гемолиза эритроцитов не произойдет, они будут наслаиваться друг на друга и препарат окажется непригодным для микроскопии.

Слой крови в толстой капле не должен быть очень толстым, иначе после высушивания она трескается и может отпасть. Нормальной считается толстая капля, через которую после высушивания слабо просвечивается крупный печатный текст, а при микроскопии в одном поле зрения насчитывается в среднем 10–15 ядер лейкоцитов.

Окраска толстой капли крови

Чем выше температура в помещении, тем быстрее окрашивается препарат, и наоборот. В среднем толстая капля окрашивается за 15–30 мин.

Если толстые капли сохранялись более недели неокрашенными, что само по себе действует как слабая фиксация, особенно в условиях жаркого климата, то препараты после окраски могут получиться недостаточно прозрачными из-за неполного гемолиза эритроцитов. В таких случаях предварительно следует нанести на препарат несколько капель дистиллированной воды. Через 10–15 мин гемоглобин эритроцитов переходит в воду, придавая ей буроватый оттенок, а толстая капля становится белесоватой. Воду сливают, каплю осторожно прополаскивают дистиллированной водой и затем наливают рабочий раствор краски Романовского — Гимза так, чтобы она полностью покрыла препарат без образования пузырьков. Необходимо следить за тем, чтобы краска не стекала с препарата, добавляя ее при необходимости пипеткой. По окончании времени окрашивания стекло, не сливая с него краски, осторожно промыть слабой струей воды (сильная струя может смыть толстую каплю) до тех пор, пока промывная вода не станет бесцветной. Если сначала слить краску, а затем промыть, то образовавшаяся пленка краски может испортить препарат или послужить причиной диагностической ошибки.

Правильно окрашенная толстая капля имеет фиолетовый цвет, перекрашенная — темно-фиолетовый, недокрашенная — светло-голубой. Длительно хранившаяся при высокой температуре или зафиксированная толстая капля приобретает почти черный цвет.

Приготовление рабочего раствора краски Романовского

Краска Романовского (правильнее, по Романовскому — Гимза) состоит из двух красящих веществ — азура и эозина, разведенных метанолом или этанолом с добавлением глицерина. Заводская краска (азур — эозин по Романовскому) поступает в сухом или жидком виде.

Для разведения сухой краски рекомендуется 5 г ее тщательно растереть в фарфоровой ступке с постепенным добавлением 50 мл глицерина, а затем 450 мл 96 % этанола. По мере растирания смесь сливают в колбу, встряхивают не менее 10 мин, а при наличии аппарата для встряхивания или магнитной мешалки — в течение нескольких часов. Затем помещают в термостат при температуре 37 °С на 3–5 дней для созревания краски.

Встряхивание повторяют ежедневно. Готовый раствор краски фильтруют через бумажный фильтр.

Хранят краску в хорошо закупоренной темной бутылки отдельно от кислот и щелочей, в защищенном от света месте. Если при длительном хранении краски образуется осадок, то рекомендуется ее профильтровать.

Для приготовления рабочего раствора краску Романовского разводят дистиллированной водой, причем краску добавляют к воде, а не наоборот. При получении новой серии предварительно готовят несколько разведений жидкой краски — по 1, 2 и 3 капли на 1 мл дистиллированной воды и окрашивают несколько мазков крови. По наиболее хорошо окрашенному мазку определяют, какое количество капель жидкой краски следует брать и сколько времени необходимо красить. По стандартной методике рекомендуется брать 3 мл концентрированной краски на 100 мл раствора или 1–2 капли краски на 1 мл раствора. На качество окраски влияет реакция дистиллированной воды.

Наилучшие результаты получают при слегка щелочной реакции (рН 7,1–7,2).

При нормальной окраске получают мазки светло-сиреневого цвета, эритроциты розовые с легким фиолетовым оттенком. Цитоплазма эозинофилов нежно-голубого цвета, зернистость — ярко-розовая. Цитоплазма лимфоцитов голубая, ядра вишнево-красные. Цитоплазма нейтрофилов бледно-розовая с обильной мелкой фиолетовой зернистостью.

При кислой реакции воды (рН ниже 7,0) препарат долго не окрашивается, приобретает ярко-розовый цвет. Ядра паразитов и лейкоцитов окрашиваются слабо, зернистость пораженных эритроцитов не видна.

При сильнощелочной реакции воды (рН 7,3 и выше) мазок серовато-зеленого или голубого цвета, эритроциты, ядра и цитоплазма клеток окрашиваются в синий цвет. Обнаружить и определить плазмодии в таких препаратах очень трудно.

Для определения реакции 5 мл испытуемой воды наливают в пробирку и добавляют 2–3 капли 10 % спиртового раствора гематоксилина. Если вода приобретает слабо-фиолетовый цвет через 2 мин, то она пригодна для разведения краски. Если появится сразу красно-фиолетовый цвет, то вода имеет щелочную реакцию (выше рН 7,2). При кислой реакции вода цвет не изменяет или слегка желтеет.

С целью получения нужной реакции к щелочной воде добавляют по каплям 1 % раствор уксусной кислоты, а к кислой — 1 % раствор бикарбоната натрия. При этом следует каждый раз проверять рН воды с помощью прибора «рН-метр», индикаторной бумаги или раствора гематоксилина, чтобы не передозировать добавляемые растворы кислоты или бикарбоната.

Лучше всего краску разводить фосфатным буферным раствором с рН 7,0, приготовленным по рецепту:

Калия монофосфат безводный $\text{KН}_2\text{PО}_4$	— 1,5 г
Натрия дифосфат безводный Na_2HPO_4	— 3 г
или натрия фосфат кристаллический $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - 12 \text{H}_2\text{O}$	— 7,5 г
Вода	— 1 л

Если неизвестно, какая взята соль натрия фосфата — безводная или кристаллическая, то ее просушивают в термостате при температуре 37 °С 5 сут, а затем разводят из расчета 3,75 г на 1 л воды.

Фосфатный буферный раствор можно приготовить из фиксаналов, хранить в холодильнике (табл. 34).

Таблица 34

Приготовление фосфатных буферных растворов

Необходимое рН	Na_2HPO_4 , мл	$\text{KН}_2\text{PО}_4$, мл	Дистиллированная вода, мл
7,0	63	37	900
7,2	73	27	900

Готовят 10 % рабочий раствор краски Романовского. Чтобы подкрасить цвет краски Романовского, к 10 мл рабочего раствора добавляют 1–2 капли краски Менсона, приготовленной по рецепту:

Метиленовый синий	— 1,5 г
Бура	— 2,5 г
Дистиллированная вода	— до 100 мл

Краску Менсона оставляют на 12–14 дней при комнатной температуре в плотно закрытой емкости в темном месте для созревания или на 3 дня помещают в термостат при температуре 37 °С, если необходимо срочно использовать — ставят на водяную баню на 60 мин.

Краска Менсона может храниться длительно. Рабочий водный раствор краски можно хранить 2–3 ч.

Готовые окрашенные препараты исследуют под микроскопом с масляной иммерсией и окуляром $\times 7$.

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.

В экстренных случаях микроскопируют свежую неокрашенную кровь. В капле крови, заключенной между предметным и покровным стеклами, пораженные эритроциты имеют «просветление» за счет расположенных в них паразитов, которые производят амёбовидные движения. Препарат помещают на нагревательный столик.

При исследовании крови больного нужно учитывать последовательные стадии развития бесполой эритроцитарных паразитов (см. цв. вкл. XXXVIII), которые характеризуются следующими особенностями:

1. Мерозоит — форма круглая или овальная, около ядра расположен небольшой комочек цитоплазмы.
2. Кольцевидный трофозоит (кольцо) — узкий ободок цитоплазмы окружает небольшую вакуоль, имеется одно ядро.
3. Амёбовидный трофозоит — форма различна в зависимости от количества и величины псевдоподий, размеры по мере развития увеличиваются, имеется одно ядро.
4. Шизонт — содержит два ядра и более.
5. Морула — полное разделение ядра и цитоплазмы на мерозоиты.

Половые формы плазмодиев — гаметоциты (гамонты) не имеют вакуолей и псевдоподий, мужские (микрогаметоциты) и женские (макрогаметоциты) отличаются по величине и структуре ядра, интенсивности окраски цитоплазмы и размерам.

При микроскопии толстой капли оценивают степень паразитемии:
+ — 1–10 малярийных плазмодиев обнаруживаются в 100 полях зрения;
++ — 1–10 малярийных плазмодиев обнаруживаются в 10 полях зрения;
+++ — 1–10 малярийных плазмодиев обнаруживаются в 1 поле зрения;
++++ — более 10 малярийных плазмодиев обнаруживаются в 1 поле зрения;
+++++ — более 100 малярийных плазмодиев обнаруживаются в 1 поле зрения.

Серологический метод

В последнее время специфическое диагностическое значение приобрели серологические реакции, используемые для осуществления эпидемиологического надзора, для ретроспективного подтверждения перенесенной малярии, при обследовании доноров в эндемичных районах. Для этих целей используют: реакцию иммунофлуоресценции (РИФ), реакцию связывания комплемента (РСК), реакцию преципитации в геле (РП), реакцию непрямой гемагглютинации (РНГА), радиоиммунный метод (РИА), реакцию энзимомеченных антител (РЭМА).

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ТОКСОПЛАЗМОЗА

Возбудитель токсоплазмоза — *Toxoplasma gondii*.

Материал для исследования: кровь, спинномозговая жидкость, пунктат лимфатических узлов, гистологические срезы лимфатических узлов, миндалины, кусочки органов, взятые от трупа (мозг, печень, селезенка, легкие), в случаях патологической беременности — плацента и околоплодная жидкость.

Микроскопический метод

Из патологического материала готовят мазки, фиксируют метиловым спиртом в течение 3–5 мин, окрашивают по Романовскому — Гимза и микроскопируют. При окраске по Романовскому — Гимза цитоплазма токсоплазм приобретает голубой цвет, а ядро, расположенное в центре паразита и занимающее около 1/3–1/4 части его тела, рубиново-красный.

Этот метод применяется редко. Основными методами диагностики токсоплазмоза являются серологический и аллергический.

Серологический метод

В настоящее время широко используют серологическое исследование, включающее реакцию связывания комплемента (РСК), реакцию непрямой гемагглютинации (РНГА), реакцию иммунофлуоресценции (РИФ), реакцию с красителями по Себину — Фельдману (РСФ).

РСК становится положительной с третьей недели от начала заболевания. Повторные исследования позволяют проследить нарастание титра комплементсвязывающих антител.

РИФ проводят с 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-LgM (тест Гемингтона) позволяет выявить антитела класса LgM, свидетельствующие об остром процессе. Этот тест используется для подтверждения диагноза врожденного токсоплазмоза.

С помощью непрямой РИФ выявляют антитела к токсоплазмам уже в конце первой недели от начала болезни.

РСФ относится к антиген-нейтрализующим реакциям, которая становится положительной в конце первой недели болезни. Реакция специфична для токсоплазм, однако постановка ее сложна. Сушность РСФ состоит в том, что в присутствии антител сыворотки больного живые токсоплазмы теряют способность окрашиваться метиленовой синью. Реакция считается положительной, если не окрашено более 50 % токсоплазм, при этом учитываются только внеклеточно расположенные простейшие. Окрашенные токсоплазмы имеют округлую форму, неокрашенные — серповидную, цитоплазма их прозрачная (стекло-видная), окрашено только ядро. Диагностический титр РСФ — 1:64 и выше. Недостатком РСФ является то, что для ее постановки необходим свежий штамм токсоплазм.

Антитела в крови появляются на 2–3 нед болезни. При стихании процесса титр антител снижается, и через некоторое время они могут исчезать. Достоверный диагноз токсоплазмоза можно поставить только с учетом динамики, особенно при нарастании титров. Поэтому обязательным является как минимум двукратное исследование сывороток с промежутком 2–3 нед для контроля нарастания титра антител. Нарастание титра антител в 6–8 раз указывает на острый процесс.

Аллергический метод

Для диагностики используют внутрикожную аллергическую пробу с токсоплазмином, которая выявляет наличие токсоплазмозной ин-

фекции в организме, но не позволяет судить о давности и характере течения процесса. Обследуемому человеку вводят 0,1 мл токсоплазмы шприцем внутривожно на ладонной поверхности предплечья. У лиц, чувствительных к токсоплазме, на месте введения аллергена формируется гиперемия и папула. Положительную пробу рассматривают как показатель хорошей реактивности организма и достаточно выраженного иммунитета. Реакцию считают положительной, если диаметр гиперемии и папулы через 24 ч достигает не менее 10 мм и через 48 ч не уменьшается и не исчезает. Проба положительна с 4 нед болезни и может сохраняться в течение многих лет.

Аллерген для внутривожной пробы — токсоплазма — получают из перитонеального экссудата белых мышей, зараженных токсоплазмами.

Аллергическую пробу с токсоплазмой не делают детям до 2 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 токсоплазмой при отрицательных результатах серологических реакций указывает на давно перенесенную инвазию, а положительная РИФ в низких титрах в сочетании с отрицательной РСК свидетельствует о затихании процесса. Для свежей инфицированности характерно наличие антител в РИФ при отрицательных РСК и аллергической пробе.

Биологический метод

Применяют главным образом для научных целей, в частности, для изучения вирулентности различных штаммов токсоплазм и др.

Для биологического исследования используют белых мышей, которых внутривентрально (по 1,0 мл) заражают материалом от больного. 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.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ТРИХОМОНОЗА

Возбудитель кишечного трихомоноза — *Trichomonas hominis*, возбудитель мочеполового трихомоноза — *Trichomonas vaginalis*.

Материал для исследования: кишечная трихомонада может быть обнаружена лишь в жидких фекалиях; *T. vaginalis* можно обнаружить

в выделениях из влагалища, шейки матки, мочеиспускательного канала, секрете предстательной железы, моче. В случаях, когда у больных выделения из мочеиспускательного канала отсутствуют, в пробирку берут первую струю мочи, центрифугируют ее, извлекают осадок и наносят на предметное стекло.

Микроскопический метод

Исследуют нативные, или фиксированные и окрашенные препараты (см. цв. вкл. VII).

Для обнаружения мочеполовых трихомонад исследуют выделения мочеполовых путей. Забор материала проводит врач в процедурном кабинете.

1–2 капли выделений сразу же помещают в каплю изотонического раствора хлорида натрия на предметном стекле, накрывают покровным стеклом и исследуют при среднем увеличении микроскопа ($\times 40$, $\times 10$) с сухой системой.

Однако препарат на предметном стекле быстро подсыхает и подвижность трихомонад прекращается, что делает их определение, особенно при небольшом числе, невозможным. Эффективнее поэтому готовить препарат по типу «висячей капли». В получающейся при этом влажной камере благодаря вазелиновой прокладке создается герметичность и замедляется высыхание препарата, подвижность трихомонад может наблюдаться иногда в течение часа.

Трихомонады легко отличить от лейкоцитов и других клеток по характерному движению, наличию жгутиков и ундулирующей мембраны. Более четко они видны при использовании темнопольной или фазово-контрастной микроскопии.

Из исследуемого материала в процедурном кабинете готовят также и мазки, которые после подсушивания фиксируют метиловым спиртом или смесью Никифорова и красят по Романовскому.

Окраска по Романовскому дает лучшие результаты в модификации Н.А. Цагикян: фиксированный тонкий мазок красят 40 мин краской следующего состава: 100 мл воды дистиллированной; 5 капель 1 % раствора карбоната натрия; 4 мл краски Романовского. При этом более четко окрашиваются жгутики, трихомонады становятся хорошо различимы. Ядра приобретают фиолетово-рубиновый или фиолетовый цвет, цитоплазма — голубой, жгутики и некоторые другие структурные образования — розово-красный.

Трихомонады существуют только в вегетативной форме, цист не образуют.

Кишечные трихомонады в нативных мазках имеют веретенообразную форму с передним закругленным и задним заостренным концами тела. Размеры трихомонад: длина — 5–10, ширина — около 5 мкм. В окрашенных препаратах форма тела трихомонад такая же, как и в нативном мазке, а размер их несколько меньше — 7–8 мкм в длину.

Tr. vaginalis имеет грушевидную или веретенообразную форму, длина их от 10 до 30 мкм, в слабокислой среде (рН 5,5–5,8) они малые, а в щелочной — крупнее.

При окраске 1 % раствором метиленового синего трихомонады выглядят, как округлые клетки с вытянутыми или треугольными ядрами, размер которых в 2 раза больше размера лейкоцитов, присутствующих в мазке в большом количестве. Жгутики, аксостиль и ундулирующую мембрану при этой окраске обнаружить не удастся.

Культуральное исследование

Если при микроскопии препаратов трихомонады не обнаруживаются (при бессимптомном носительстве, после лечения), производят посев выделений. Применение метода культивирования трихомонад особенно показано при обследовании мужчин, а также для контроля эффективности проводимой терапии. В качестве питательной среды используют МПБ, содержащий 1 % раствор глюкозы и 5 % раствор инактивированной сыворотки крови человека или лошади. После посева в пробирки вносят 500–1000 ЕД пенициллина и стрептомицина на каждый 1 мл среды для подавления роста сопутствующей микрофлоры. Пробирки помещают в термостат на 24–48 ч, после чего проводят микроскопию.

Для культивирования *Tr. vaginalis* используют также питательные среды Павловой, Джонсона — Грассела и др.

Кишечные трихомонады можно выделить путем посева испражнений на среду Рейса.

Среды для культивирования трипаносом

Среда Павловой: натрия хлорид — 4,25 г, натрия фосфат — 0,3 г, калия гидрофосфат — 0,23 г растворяют в 500 мл дистиллированной воды, стерилизуют и разливают в пробирки по 9,5 мл. После охлаждения в каждую пробирку вносят по 0,5 мл лошадиной сыворотки.

Среда Джонсона — Грассела: пептона — 32 г, агара — 1,6 г, цистеина солянокислого — 2,4 г, мальтозы — 16 г, печеночного экстракта — 320 мл, раствора Рингера — 960 мл, 1 М NaOH — 13 мл. Смесь нагревают до расплавления агара, фильтруют, добавляют 0,7 мл 0,5 % раствора

метиленового синего и доводят рН 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 посторонней микрофлоры.

Среда Рейса: мясо-пептонный бульон (1 часть) смешивают с изотоническим раствором натрия хлорида (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.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ТРИПАНОСОМОЗОВ

Возбудители африканского трипаносомоза:

Trypanosome brucei gambiense — возбудитель гамбийского трипаносомоза;

Trypanosome brucei rhodesiense — возбудитель родезийского трипаносомоза;

возбудитель американского трипаносомоза — **Trypanosome cruzi**.

Морфологически все три вида трипаносом сходны между собой.

Материал для исследования: кровь, спинномозговая жидкость, пунктат лимфатических узлов, грудины, кусочки пораженных тканей, соскобы из первичного аффекта.

Микроскопический метод

При африканском трипаносомозе возбудителя можно обнаружить в начальном периоде заболевания на месте укуса зараженной мухой Цеце, а также в периферической крови (родезийский тип) или пунктате шейных лимфатических узлов (гамбийский тип). В период появления симптомов поражения центральной нервной системы паразиты в крови и лимфатических узлах отсутствуют. На этой стадии болезни трипаносом находят в спинномозговой жидкости.

Для обнаружения подвижных трипаносом каплю крови, смешанную с цитратом натрия, пунктат лимфатического узла или спинномозговой жидкости помещают на предметное стекло, накрывают покровным стеклом и микроскопируют. Исследуют под малым и большим увеличением. Более распространено исследование окрашенных по Романовскому мазков и толстых капель крови. Тело трипаносом окрашивается в голубоватый цвет, ядро и жгутики — в красный. На препарате можно видеть мембрану, соединяющую волнообразно извитой жгутик с краем тела (см. цв. вкл. XXIV).

При американском трипаносомозе возбудителя обнаруживают в острой стадии болезни в периферической крови в свежих или окра-

шенных по Романовскому препаратах. Но из-за небольшого количества трипаносом в крови рекомендуется просматривать большое число препаратов.

При отрицательном результате исследования применяют метод обогащения. Для этого в шприц с 1 мл 3,8 % раствора цитрата натрия набирают 9 мл крови из вены и смесь центрифугируют в течение 10 мин при 1000–1500 об/мин. Жидкость отсасывают, из верхнего слоя осадка готовят нативные или окрашенные препараты и исследуют. Мазки из осадка спинномозговой жидкости, пунктатов лимфатических узлов и грудины окрашивают также по Романовскому.

В хронических стадиях заболевания паразиты в крови встречаются очень редко, поэтому микроскопическое исследование малоэффективно. В этих случаях применяют ксенодиагностику — кормление на больных людях триатомовых клопов, в кишечнике которых происходит размножение трипаносом, выделяющихся с экскрементами клопов, где их и обнаруживают с 5 дня после кормления.

Культуральное исследование

Колонии трипаносом выращивают на кровяном агаре — среда NNN (по имени авторов — Novy, Neal, Nicolle), представляющая собой агар с дефибрированной кровью кролика.

Серологический метод

С целью серологической диагностики используют реакцию преципитации (РП), антигеном для которой служит экстракт из трипаносом; реакцию агглютинации (РА) с живыми трипаносомами, полученными из крови зараженных животных или из культур; реакцию связывания комплемента (РСК), при которой антигеном служит экстракт из сердечной мышцы инвазированных животных. Реакцию оценивают по нарастанию титра комплементсвязывающих антител.

РП и РА применяются в остром периоде болезни, а РСК — в хроническом.

Разработаны также модификации реакции иммунофлуоресценции (РИФ) и реакции энзимомеченных антител (РЭМА) для диагностики трипаносомозов. Антигеном для РЭМА служат лизаты трипаносом от зараженных животных или из культур.

Биологический метод

При безуспешном микроскопическом исследовании прибегают к биологической пробе, состоящей в заражении белых мышей или морских свинок исследуемым материалом подкожно или внутримышечно. Через 7 дней

в течение 1 мес исследуют их кровь и паренхиматозные органы на наличие трипаносом. При африканском трипаносомозе заражают белых мышей, хомяков, мартышек с последующей микроскопией через 3–4 дня.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЛЕЙШМАНИОЗА

Возбудители:

Leishmania tropica — возбудитель антропонозного (городского) кожного лейшманиоза;

Leishmania major — возбудитель зоонозного (пустынного) кожного лейшманиоза;

Leishmania braziliensis — возбудитель кожно-слизистого (американского) лейшманиоза;

Leishmania donovani — возбудитель висцерального лейшманиоза (индийский кала-азар);

Leishmania infantum — возбудитель висцерального (средиземноморского) лейшманиоза.

Материал для исследования: соскоб из бугорков, со дна язвы и краевого инфильтрата при кожной форме, пунктат костного мозга, печени, селезенки, лимфатических узлов, кровь при лейшманиозе внутренних органов.

Микроскопический метод

Наиболее информативным методом диагностики лейшманиоза является микроскопия мазков, приготовленных из исследуемого материала, фиксированных спиртом и окрашенных по Романовскому — Гимза (см. цв. вкл. XXIII).

Исследование мазка из кожного инфильтрата

Материал для исследования берут из бугорка (на ранней стадии развития процесса) или из краевого инфильтрата язвы (на более поздней стадии), несколько отступив от края язвы. После очищения ватой со спиртом бугорок или выбранный участок инфильтрата сдавливают двумя пальцами для обескровливания и, не ослабляя давления пальцев, концом острого скальпеля (лучше глазного) делают поверхностный надрез кожи. В случае появления крови ее следует удалять марлевым тампоном. Со дна и краев надреза делают этим же скальпелем соскоб пораженной ткани и быстро размазывают содержимое соскоба тонким слоем на предметном стекле. Готовят несколько таких мазков. Мазок высушивают на воздухе, фиксируют метанолом или смесью Никифорова и окрашивают по Романовскому.

В правильно приготовленном препарате должны быть хорошо различимы клетки инфильтрата — макрофаги, эндотелиальные, плазматические, лимфоидные клетки, фибробласты и небольшая примесь клеток периферической крови. Наличие в препарате эпителиальных клеток, а также бесструктурных глыбок, окрашивающихся в равномерно сиреневый цвет, означает, что соскоб был взят слишком поверхностно и должен быть повторен. В мазке не должно быть слишком много крови, а также гноя и бактерий.

Лейшмании обнаруживаются в макрофагах, а также вне клеток в виде округлых, овальных или удлинённых телец, размером 3—5 мкм. При окраске по Романовскому цитоплазма лейшманий приобретает светло-голубой или сиреневатый цвет, ядро — красно-фиолетовый. Хорошо виден более интенсивно окрашенный, чем ядро, кинетопласт. Наличие ядра и кинетопласта позволяет отличить лейшмании от других образований, встречающихся в препарате.

Лейшмании легко обнаруживаются в бугорках и краевом инфильтрате язвы на начальных стадиях изъязвления. В гнойном отделяемом язвы могут быть обнаружены лишь деформированные и разрушающиеся лейшмании, по которым трудно поставить диагноз. На стадии заживления в пораженных тканях лейшмании обнаруживаются редко.

При туберкулоидном лейшманиозе лейшмании в бугорках обнаруживаются с большим трудом. В этом случае для уточнения диагноза следует прибегать к культуральному исследованию или к кожной пробе.

Исследование мазка костного мозга

Материал, полученный при пункции костного мозга в любом количестве, немедленно после взятия переносят на предметное стекло и очень осторожно, чтобы не раздавить и не деформировать клетки, размывают при помощи шлифованного стекла тонким слоем. Если пунктат плотный, мазок можно делать по принципу отпечатков, держа комочек пунктата пинцетом или иглой или прикасаясь к нему другим предметным стеклом.

Приготовленный мазок высушивают на воздухе, затем фиксируют 30 мин в абсолютном этиловом спирте либо в смеси Никифорова или 5 мин — в метаноле и снова высушивают на воздухе. Фиксированные мазки могут храниться несколько дней.

Предметные стекла с мазками укладывают горизонтально мазками вверх. На всю поверхность мазка наливают разведенную в буфере краску Романовского (3—5 мл) как можно более толстым слоем и оставляют

на 30–50 мин. Продолжительность окраски зависит от температуры помещения — в теплом она меньше, в холодном — больше. После окраски препарат споласкивают дистиллированной или прокипяченной водой и высушивают.

Высушенный мазок просматривают под микроскопом с иммерсионной системой без покровного стекла.

В мазке из правильно взятого пунктата костного мозга не должно быть большой примеси крови. Пунктат обычно богат клеточными элементами, имеется эритробластическая реакция нормобластического типа. В разгар болезни лейшмании обычно содержатся в значительном количестве и обнаруживаются легко уже через несколько минут просмотра, однако в ранних стадиях болезни и во время проведения терапии для обнаружения возбудителя висцерального лейшманиоза требуется более длительный просмотр всего мазка (не менее 40 мин).

Лейшмании обнаруживаются в макрофагах или внеклеточно. Они имеют вид округлых, овальных или рисовидных телец диаметром 3–5 мкм. Цитоплазма окрашена в серовато-голубой цвет, ядро — в красно-фиолетовый. В цитоплазме имеется кинетопласт — округлое или палочковидное образование, окрашивающееся более интенсивно, чем ядро.

Отсутствие лейшманий в мазках костного мозга свидетельствует о неправильном изготовлении мазка и не дает основания отвергнуть диагноз висцерального лейшманиоза. Требуется повторная пункция. (Имеются указания, что в ряде случаев лейшмании обнаруживаются в мазках костного мозга лишь при 2–3 пункции.)

Неопытные лаборанты принимают за лейшмании кровяные пластинки или «осколки» клеток (комочки цитоплазмы, содержащие ядерное вещество), встречающиеся иногда в мазках костного мозга. В редких случаях источником ошибок могут служить посторонние микроорганизмы, попавшие в мазок во время окраски, например, дрожжевые грибы, а также некоторые одноклеточные водоросли, которые могут развиваться на стенках посуды при разведении красителя. В мазке они окрашиваются более интенсивно, чем лейшмании (темно-синего цвета цитоплазма и ярко-малинового — ядро; кинетопласт отсутствует).

Культуральное исследование

С целью получения культуры лейшманий производят посев на элективную питательную среду NNN. Посевы инкубируют при температуре 22 °С, обильный рост наблюдается на 8–10 день. Если в течение

40 дней возбудитель не обнаружен, результат посева считают отрицательным, но это еще не позволяет полностью исключить лейшманиоз.

Серологический метод

Серологическая диагностика (РИФ, РСК, РЭМА) широко используется в эндемичных по висцеральному лейшманиозу местностях. Наиболее чувствительной и специфичной является непрямая РИФ. Не уступает ей по чувствительности и специфичности иммунопероксидазная проба (ИПП), менее сложная технически. В качестве антигена используют 15- или 30-дневные культуры лептомонадной формы *L. donovani*. При ИПП меткой антисыворотки служит фермент пероксидаза, результаты реакции учитывают при микроскопии. Реакцию считают положительной, если тело лейшманий в мазке окрашивается тотально или по периферии в ярко-коричневый цвет.

Для диагностики висцерального лейшманиоза разработана тест-система на основе РЭМА, в которой в качестве антигена используют цельный экстракт из *L. donovani*. Указанная проба является более чувствительной, специфичной и экономичной, чем РИФ. Диагностический титр РЭМА — 1:400 и выше.

Для предварительной диагностики висцерального лейшманиоза применяется реакция Брамахахи: внутривенно берут 5 мл крови, центрифугируют. По стенке пробирки аккуратно добавляют несколько капель дистиллированной воды. При смешивании сыворотки крови больного с водой образуется молочно-белое помутнение. Применяются формоловая реакция, или проба Непира, и реакция Чопра (образование белого кольца в месте соприкосновения сыворотки крови больного с препаратами сурьмы).

Аллергический метод

Проводится внутрикожная проба со специфическим антигеном, которая считается положительной при образовании красной папулы через 24 ч и увеличении ее размеров к 48 ч.

Биологический метод

Белых мышей или хомяков заражают внутрисердечно, внутрибрюшинно, внутрипеченочно, внутривенно и определяют наличие возбудителя в костном мозге, лимфатических узлах, печени.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЛЯМБЛИОЗА

Возбудитель — *Lambliа intestinalis*.

Материал для исследования: свежий кал, дуоденальное содержимое.

Микроскопический метод

Материал для исследования центрифугируют, из осадка отбирают комочки слизи и микроскопируют их в нативном или окрашенном растворе Люголя препарате. В нативном мазке лямблии обладают плавной подвижностью, которая обеспечивается 4 парами жгутиков и происходит в одной плоскости. Движения поступательные и вращательные вокруг продольной оси.

Цисты лямблий, окрашенные раствором Люголя, имеют коричневый или желтый цвет, правильную овальную форму, тонкую, гладкую, двухконтурную оболочку, цитоплазма нередко отстает от нее. Этот признак отличает цисты *L. intestinalis* от других цист. В препарате, окрашенном раствором Люголя, могут быть цисты с голубым окрашиванием. Это указывает на нежизнеспособность цист.

Вегетативные формы обнаруживаются в дуоденальном содержимом или свежевыделенном жидком кале, цисты — только в оформленном кале.

Выделение цист может происходить нерегулярно, что требует многократных исследований.

Поиск паразитов в кале желательно проводить не менее трех раз с промежутком 1—3 дня.

Частота находок увеличивается при использовании методов формалин-эфирного обогащения, фазово-контрастной и люминесцентной микроскопии с помощью акридинового оранжевого.

Метод формалин-эфирного обогащения

При обработке фекалий по этому методу происходит отделение и концентрация цист простейших кишечника.

В пробирку налить 6 мл раствора формалина. Частицу фекалий размером с горошину внести в пробирку и тщательно размешать. В пробирку добавить 2 мл эфира, закрыть резиновой пробкой, энергично встряхивать в течение 1 мин, затем центрифугировать 3 мин при 1500 об/мин. Образовавшийся после центрифугирования между слоями формалина и эфира слой фекалий деревянной палочкой осторожно отделить от стенок пробирки и вылить все содержимое, оставив только придонный осадок. Наклонив пробирку отверстием книзу, быстро протереть ватным тампоном его внутренние стенки, чтобы удалить как можно больше жидкости. Перевернув пробирку отверстием вверх, пипеткой забрать оставшуюся жидкость (осадок) со дна пробирки и перенести на предметное стекло.

Добавить каплю раствора Люголя, накрыть покровным стеклом и исследовать под малым и средним увеличением.

Серологический метод

Предложена иммунологическая диагностика с использованием лямблиозного антигена в реакциях торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ), бластной трансформации лимфоцитов (РБТЛ), повреждения нейтрофилов (РПН) и др.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА БАЛАНТИДИАЗА

Возбудитель — *Balantidium coli*.

Материал для исследования: кал.

Микроскопический метод

Исследование кала проводят методом нативного мазка и мазка, окрашенного раствором Люголя.

Подвижность балантидий изучают под малым увеличением в нативных мазках в виде «раздавленной» или «висячей» капли.

В препаратах, окрашенных железным гематоксилином, балантидии благодаря большим размерам (40–150 мкм в длину и 20–50 мкм в ширину) выделяются на фоне эритроцитов, лейкоцитов.

Тело балантидия яйцевидной формы, передний конец слегка заостренный, задний — несколько закругленный. При микроскопии под большим увеличением обнаруживают крупное ядро бобовидной формы — макронуклеус, в переднем конце тела немного сбоку ротовую щель — цитостом, сократительную вакуоль в виде светлого неокрашенного пузырька, пищеварительные вакуоли, заполненные эритроцитами, лейкоцитами или бактериями на разных стадиях переваривания. По периферии тела видны реснички с прилипшими к ним пищевыми частицами.

Цисты *B. coli* размером 40–60 мкм имеют круглую форму, двухконтурную оболочку и бобовидное ядро. В препаратах, обработанных раствором Люголя, цисты коричнево-желтого цвета, при окраске гематоксилином в цистах виден макронуклеус, реже — микронуклеус. Цитоплазма цисты однородная.

Обнаружение балантидий в нативных мазках кала не представляет трудностей, но требует многократного исследования (5 и более раз), так как их выделение с фекалиями отличается периодичностью.

У носителей обнаруживают только единичные цисты.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ПНЕВМОЦИСТОЗА

Возбудитель — *Pneumocystis carinii*.

Материал для исследования: слизь из верхних дыхательных путей, мокрота и слизь из нижних отделов дыхательных путей; мазки-отпечатки легких (при летальном исходе).

Пневмоцистоз относится к оппортунистическим инвазиям.

Микроскопический метод

Для обнаружения пневмоцист микроскопируют окрашенные по Романовскому мазки слизи, полученной у детей методом прямой ларингоскопии, катетером — из трахеи или верхних дыхательных путей. Исследуют также окрашенные мазки мокроты или слизи из нижних отделов дыхательных путей, полученные при глубоком откашливании.

Пневмоцисты могут быть обнаружены не ранее 2 нед болезни. Прямое микроскопирование мазков не всегда дает положительный результат, так как типичные восьмиядерные цисты обнаруживаются сравнительно редко, а отдельные вегетативные особи не всегда могут быть различимы в препарате, где обычно наблюдается обилие различных клеток и их остатков.

При окраске по Романовскому пневмоцисты приобретают фиолетовый цвет, ядра — темно-синий.

Разработаны *серологические методы* диагностики. Диагноз подтверждается при нарастании титра антител. Недостатком метода является наличие большого количества ложноотрицательных реакций.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА КРИПТОСПОРИДИОЗА

Возбудитель — *Cryptosporidium spp.*

Материал для исследования — фекалии.

Криптоспоридиоз относится к СПИД-ассоциированным заболеваниям.

Микроскопический метод

Микроскопический метод занимает ведущее место в диагностике криптоспоридиоза.

В настоящее время наиболее информативным и наиболее эффективным способом является приготовление тонких мазков фекалий и окрашивание карбол-фуксином по Цилю — Нильсену.

Готовится мазок фекалий. На предметное стекло наносят небольшое количество фекалий и размазывают равномерно тонким слоем.

При необходимости к комочку фекалий добавляют 1–2 капли физиологического раствора или воды. Мазок высушивают на воздухе и фиксируют в смеси Никифорова (смесь равных частей эфира и 96° этилового спирта) в течение 10–15 мин, после чего опять высушивают на воздухе.

Фиксированный мазок быстро провести 3–5 раз над пламенем горелки. Окрашивать раствором карбол-фуксина 5–20 мин. Состав раствора: фуксин основной — 2 г, 96° этиловый спирт — 12 мл, фенол — 5 мл, дистиллированная вода — до 100 мл (фуксин растворить в спирте, фенол — в воде, затем слить вместе). Промыть мазок водопроводной водой, обесцветить 7 % (5–10 %) раствором серной кислоты (20–60 сек), промыть в воде и подкрасить 5 мин 5 % раствором малахитового зеленого в 10 % этиловом спирте или 0,2 % водным раствором метиленового синего. Промыть в воде, тщательно высушить на воздухе и исследовать под микроскопом (с иммерсией).

Ооцисты криптоспоридия окрашиваются в разные оттенки ярко-красного цвета и имеют вид округлых образований диаметром до 5 мкм. Стенка ооцист окрашивается неравномерно. Сопутствующая микрофлора окрашивается в зеленые тона.

В красный цвет могут также окрашиваться капли жироподобных веществ и гранулы детрита. Даже при случайном сходстве по размерам эти образования легко отличить от ооцист криптоспоридий по отсутствию у них отчетливой оболочки и какого-либо структурированного содержания внутри. В сомнительных случаях серийные мазки следует окрасить иным методом. При необходимости можно уменьшить концентрацию малахитового зеленого (подбирается опытным путем). Окрашивание по Цилю — Нильсену можно производить и без предварительной фиксации мазков.

Информативность метода окраски по Цилю — Нильсену возможно существенно повысить, интегрируя его в качестве референс-метода в системе консервант Турдыева (Сафаралиева) — формалин-эфирное осаждение — модифицированный метод Циля — Нильсена. Такое 3-этапное исследование, которое лежит в основе разработанного единого метода паразитологического обследования, может быть рекомендовано в качестве регламента лабораторной диагностики криптоспоридий.

Схематическое представление регламента лабораторной диагностики криптоспоридиоза

1. Фиксация в консерванте Турдыева. Готовят влажный мазок из консерванта (негативное окрашивание раствором Люголя).

2. Концентрация материала формалин-эфирным осаждением. Из осадка готовят влажный мазок с раствором Люголя.

3. Из осадка готовят мазки, фиксируют и окрашивают карболовым фуксином по Цилю — Нильсену.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА САРКОЦИСТОЗА

Возбудитель: *Sarcocystis hominis*; *Sarcocystis suihominis*.

Материал для исследования: свежевыделенные испражнения для диагностики кишечного саркоцистоза, биопсированные кусочки мышц для диагностики мышечного саркоцистоза.

Микроскопический метод

В свежевыделенных испражнениях обнаруживают одиночные или реже спаренные спороцисты овальной формы, размером 12–16×9–10 мкм, содержащие по 4 зрелых спорозонта. Спороцисты появляются в фекалиях с 9-го дня после заражения, максимальное их число наблюдается на 14–22 день, и могут обнаруживаться сравнительно недолго и в небольшом количестве.

Рекомендуется применять методы обнаружения с обогащением в 33 % растворе сульфата цинка.

Метод всплывания. При смешивании материала, содержащего цисты, с жидкостями, имеющими большую относительную плотность, чем цисты, последние всплывают и находятся в поверхностной пленке.

Предварительно цисты отмывают от фекалий. В противном случае в поверхностную пленку всплывут многочисленные частицы фекалий, что очень затруднит исследование. Для отмывания 1 г фекалий тщательно размешивают в 10 мл воды в центрифужной пробирке и центрифугируют 45 с — 1 мин при 2500 об/мин. Поверхностную жидкость сливают, а к осадку добавляют воду, и процедуру повторяют. Центрифугируют несколько раз, пока надосадочная жидкость не станет прозрачной. После этого к осадку добавляют 33 % раствор сульфата цинка. Тщательно перемешивают и центрифугируют 2 мин. Исследуют поверхностную пленку, которую снимают петлей.

Для диагностики мышечного саркоцистоза проводится биопсия и исследуются мазки и гистологические срезы очагов поражения. Применяют также методы переваривания мышц с трипсином или микроскопии мышц в компрессориуме с помощью трихинеллоскопа.

Для исследования берут мышцы пищевода, сердца, диафрагмы, где саркоцисты локализуются наиболее часто. Перед микроскопией рекомендуют на мышечные срезы нанести по 2–3 капли смеси из равных

частей 0,5 % водного раствора метиленового синего и ледяной уксусной кислоты. После 3–5-минутного окрашивания срезы обесцвечивают нанесением на них 2–3 капель 20–25 % раствора нашатырного спирта. На голубом фоне мышечной ткани саркоцисты имеют темно-синий цвет.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА КОКЦИДИОЗА

Возбудитель: *Isosporid belli*.

Материал для исследования: испражнения, дифференциальное содержимое.

Микроскопический метод

При микроскопии испражнений и иногда дуоденального содержимого больных обнаруживают ооцисты кокцидий (бесцветные прозрачные образования) длиной 20–30 мкм с двухконтурной оболочкой, овальной формы с одним зауженным концом. В свежевыделенных испражнениях ооцисты незрелые и содержат в центре шарообразную зародышевую массу.

Применяют *методы обогащения*.

Следует учитывать, что ооцисты в острой стадии болезни отсутствуют и появляются в фекалиях не ранее 10 дня болезни, уже на стадии выздоровления, когда клинические явления стихают. Кал к этому времени становится оформленным, и лабораторные исследования его в это время уже не назначаются.

Кроме того, ооцисты выделяются у реконвалесцентов от 1–2 нед до 1–2 мес, встречаются обычно в единичных экземплярах, в силу своей плавучести поднимаются к нижней поверхности покровного стекла и не попадают в зону резкости микроскопа.

Поэтому в практических условиях кокцидиоз диагностируется редко, хотя встречается он, по-видимому, повсеместно, особенно на юге. Описаны вспышки кокцидиоза в детских коллективах.

При обнаружении ооцист фекалии помещают на 2–3 дня в чашки Петри и заливают 2 % раствором дихромата натрия. Последующая микроскопия и выявление зрелых ооцист делает возможным видовой диагноз.

Препараты для специфической профилактики не разработаны.

Препараты для лечения протозойных инфекций

Название болезни	Химиопрепараты
1	2
Амебиаз	<p>1. Амебициды прямого действия, эффективные при локализации амеб в просвете кишечника:</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ производные хинолина (дийодгидроксихинолин, йодхлоргидроксихин, хлоргидроксихин, хиниофон (ятрен)); ✓ производные мышьяка (аминарсол, ацетарсол, карбазон, гликобиарсол, дифетарсон); ✓ другие лекарственные средства (диксоланид фуруат, хлорбетамид, клефамид, этофамид, хлорфенаксемид, глауколубин, дихлорацетилэтилбензил, паромомицин). <p>2. Амебициды непрямого действия, эффективные при локализации амеб в просвете и стенке кишечника: тетрациклин, окситетрациклин, хлортетрациклин.</p> <p>3. Тканевые амебициды, эффективные при локализации амеб в стенке кишечника и в печени: эметина гидрохлорид, дигидроэметин.</p> <p>4. Тканевые амебициды, эффективные при локализации амеб в печени: хлорохин (делагил).</p> <p>5. Амебициды универсального действия: ниродазол (амбилгар); метронидазол (флагил, клион, трихомицин, трихопол); фазижим (тинидазол).</p>
Малярия	<p>1. Гематошизотропные, действующие на эритроцитарные стадии паразита: хлорохин (делагил), амодиахин, плаквенил, бигумаль, фанзидар, хинин, акрихин, хлоридин, сульфаниламиды, сульфоны.</p> <p>2. Гистошизотропные, действующие на тканевые формы паразитов: производные 8-аминохинолинов — хиноцид и примахин.</p> <p>3. Гамонтотропные, действующие на половые формы: хиноцид и примахин, обладающие гаметоцидным эффектом, и хлоридин, бигумаль, оказывающие гамеостатический эффект.</p> <p>4. Комбинированные, применяющиеся при устойчивости возбудителя к другим противомалярийным препаратам: метакельфин, лариаи.</p>
Токсоплазмоз	Хлоридин (дараприм, пириметамин) в сочетании с сульфадимезином или бактримом; аминохинол, хингамин (делагил), метронидазол, антибиотики тетрациклинового ряда.
Трихомоноз	Трихопол, флагим. Антибиотики и сульфаниламиды неэффективны.
Африканский трипаносомоз	<p>1. Препараты, эффективные при нахождении возбудителя в периферической крови:</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ производные мочевины: антрипол, пентамидин; ✓ производные мышьяка: MEL W (растворимый в воде дериват арсобала). <p>2. Препараты, эффективные в стадии менингоэнцефалита: MEL W, трипарсамид.</p>

1	2
Американский трипаносомоз	Терапия разработана недостаточно и нуждается в дальнейшем изучении. Наиболее эффективными являются производные хинолина: примакхин; арсенобензолсульфатный препарат Байер 9736; нитрофурановые препараты: альтафур, нитрофуразон; пенициллин, стрептомицины, хлорамфеникол, ауреомицин, эритромицин.
Лейшманиоз	Препараты сурьмы (соллюсурьмин, неостибазон, глюкантим, пентостам); мономицин; пентамидин. Для лечения кожного лейшманиоза применяют антималярийные средства — хингамин; мстоциклина гидрохлорид (рондомицин); метронидазол (трихопол). При язвенных поражениях применяют мази «Оксикорт», «Локакортен» с неомицином или виоформом, 2 % белую ртутную или 5 % сульфаниламидную мазь, компрессы с 1–5 % раствором ихтиола, 0,5–1 % раствором нитрата серебра или 0.1 % раствором этакридина лактата.
Лямблиоз	Производные нитроимидазола: метронидазол, тикидазол (фазижим). Производные акридина: акрихин, аминоакрихин. Производные хинолина: аминохинол, хлорохина дифосфат, хингамин. Нитрофурановые препараты: фуросолидон.
Балантидиаз	Аминарсол, ятрен, эметина гидрохлорид, осарсол, гексилрезорцин, окситетрациклин.
Пнсмвоцистоз	Пентамидин, трихопол.

ЗАДАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ЗАНЯТИЮ

1. Просмотрите демонстрационные препараты основных представителей патогенных простейших. Зарисуйте в альбом.
2. Приготовьте мазок крови, окрасьте по Романовскому — Гимза.
3. Приготовьте препарат толстой капли крови и окрасьте по Романовскому — Гимза.
4. Просмотрите набор лекарственных препаратов и определите, для лечения каких протозойных инфекций они используются.

Тема: ПАТОГЕННЫЕ ГРИБЫ

Цель: Уметь дать характеристику патогенных грибов, их систематическое положение, охарактеризовать особенности строения, биологической активности, определить значение грибов в патологии человека; знать принципы лабораторной диагностики дерматомикозов, кандидозов и глубоких микозов, лечения и профилактики этих заболеваний.

Заболевания, вызываемые патогенными грибами, получили название микозов.

Возбудители микозов могут быть разделены на следующие группы:

1) дерматофиты: возбудители дерматомикозов (эпидермикозы) — заболеваний кожи и ее придатков (волосы, ногти). Они преимущественно относятся к родам *Epidermophyton*, *Trichophyton*, *Microsporum* и др.:

2) дрожжеподобные грибы рода *Candida*: возбудители кандидозов — заболеваний кожи и слизистых оболочек, а также внутренних органов. Кроме *Candida albicans*, заболевания могут вызвать и другие виды грибов рода *Candida*: *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. krusei*;

3) криптококки, гистоплазмы, бластомицеты, кокцидиоиды, споротрихи, а также плесневые грибы (аспергиллы, пенициллы, мукооровые грибы), цефалоспории, кладоспории: возбудители глубоких микозов, поражающие различные органы и ткани.

Клинические проявления микозов весьма разнообразны. В зависимости от клинических проявлений болезни материалом для исследования служат: пораженные волосы, чешуйки кожи и соскобы с ногтей, скарификаты кожи, отделяемое пораженных участков слизистых оболочек, гной, мокрота, спинномозговая жидкость, кровь, пунктаты лимфатических узлов, костного мозга, внутренних органов, желудочный сок, желчь, испражнения, биопсированные и аутопсированные кусочки тканей и др.

Материал берут с соблюдением стерильности эпиляционным пинцетом, скальпелем, препаровальной иглой, лезвием бритвы, ножницами, пастеровской пипеткой и др.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Таксономическое положение патогенных грибов.
2. Морфология и тинкториальные свойства.
3. Культуральные свойства грибов.
4. Факторы патогенности у грибов рода *Candida*.
5. Кандидоносительство.
6. Патогенез и клиника кандидомикозов, трихомикозов, глубоких системных микозов.
7. Принципы лабораторной диагностики микозов.
8. Лечение и профилактика заболеваний, вызванных патогенными грибами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дикий И.Л., Холуяк И.Ю., Шевелева Н.Е., Стегний М.Ю. Микробиология.— Х.: Прапор: Изд-во УкрФА, 1999.— С. 329–343.
2. Елинов Н.П., Заикина Н.А., Соколова И.П. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии.— М.: Медицина, 1988.— С. 185–189.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

В диагностике микозов выделяют два основных метода: микроскопический и микологический. Применяются также серологический, алергический и биологический методы.

Микроскопический метод

При микроскопическом исследовании изучают неокрашенный (нативный) и окрашенный материал.

Нативные препараты готовят из пораженных волос, соскобов с ногтей, чешуек кожи. Для микроскопирования необходима полная прозрачность препарата. Поэтому материал, взятый для исследования, помещают на предметном стекле в 2–3 капли 10–20 % раствора едкой щелочи (NaOH или КОН), осторожно подогревают на пламени, не доводя до кипения, в течение 1 мин или оставляют на 15–20 мин или 1–2 ч (в зависимости от характера материала) до полного просветления. Перед микроскопированием, слегка надавливая на покровное стекло, делают препарат более тонким, а излишек щелочи снимают фильтровальной бумагой.

Грубые чешуйки кожи, соскобы с ногтей или кусочки ногтя можно помещать в центрифужную пробирку и заливать едкой щелочью в количестве, необходимом для покрытия этого материала (не более). Через сутки растворившиеся в щелочи роговые массы в количестве 1–2 капель наносят пастеровской пипеткой на предметное стекло и покрывают покровным стеклом.

Все жидкие прозрачные экскреты (мочу, желудочный и дуоденальный сок, спинномозговую жидкость и др.) предварительно центрифугируют, сливают надосадочную жидкость, а 2–3 капли осадка помещают на предметное стекло и покрывают покровным.

Готовые прозрачные препараты микроскопируют при сухих системах микроскопа, яркость освещения несколько снижают, опуская конденсор.

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 (см. табл. 36).

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: метиленовым синим, по Граму, Цилю — Нильсену, Романовскому — Гимза, Райту, гематоксилин-эозином.

Candida по Граму окрашиваются в темно-фиолетовый цвет, иногда с розовой центральной частью клетки, по Цилю — Нильсену — в синий с розовато-желтоватыми включениями липидов, по Романовскому — Гимза — в розовато-желтый цвет с темно-фиолетовыми включениями волютина и красным хроматиновым веществом.

Когда микроскопия не дает ясного результата, используют *микологический метод*.

Микологическое исследование направлено на выделение чистой культуры гриба и ее идентификацию. Посевы производят на плотные и жидкие питательные среды: Сабуро, кукурузный, рисовый, картофельный агар и др.

Для выделения культур возбудителей глубоких микозов исследуемый материал сеют на среду Сабуро, сывороточный или кровяной агар, а также заражают куриные эмбрионы.

Для подавления роста сопутствующей бактериальной флоры к питательным средам добавляют антибиотики, красители, дезинфицирующие средства.

Культивирование грибов осуществляют, как правило, в термостате при температуре 22–28 °С в течение 2–4 нед, некоторые возбудители глубоких микозов выращивают при температуре 37 °С. Выделенные культуры гриба идентифицируют по внешнему виду и форме колоний, их консистенции, цвету, микроскопическому строению — характеру мицелия, расположению конидиеносцев, спор и др. признакам (см. табл. 36).

Патогенные грибы — возбудители микозов

Род	Вид	Название болезни и локализация патологического процесса	Тканевая форма	Культуральная форма	Сфера паразитирования и географическое распространение
1	2	3	4	5	6
Дерматофиты					
Epidermophyton	E. floccosum	Эпидермофития, кожа	Септированный мицелий в чешуйках кожи	Колонии складчатобугристые, кожистые, слегка мучнистые, зеленовато-желтоватого цвета, серые. Мицелий септированный с интеркалярными хламидоспорами, макроконидии — дубинкообразные веретена, пучками — «гроздь бананов»	Человек, антропофил, на всех континентах
Microsporum	M. canis	Микроспория, кожа и волосы	Септированный мицелий в чешуйках, споры, покрывающие сплошным слоем волос. Волосы люминесцируют в ближних ультрафиолетовых лучах	Колонии пушистые, стелющиеся, в проходящем свете желтоватые с перламутровым оттенком, лучистые. Мицелий ровный, бамбуковидный, обилие макроконидий — остроконечных, крупных многокамерных (6–12) веретен с двухконтурной, нередко — зубчатой оболочкой	Кошка, собака (редко другие животные). Зоофил. На всех континентах
Microsporum	M. audouinii	Микроспория, кожа и волосы	Споры, покрывающие волос. Волосы люминесцируют. Мицелий септированный в чешуйках	Колонии белые, бархатистые, радиально исчерченные. Мицелий септированный, иногда ракетковидный, макроконидии — веретена многокамерные (2–10)	Человек, антропофил. В странах Западной Европы, Северной Америки, реже на других континентах. В СНГ не встречается

1	2	3	4	5	6
Microsporum	<i>M. ferrugineum</i>	Микроспория, кожа и волосы	Споры, покрывающие волос. Волосы люминесцируют. Септированный мицелий в коже	Колонии плотные, бугристые, желтовато-коричневого цвета, иногда с белесоватым налетом. Мицелий широкий, неровный, встречаются хламидоспоры интеркалярные и концевые	Человек. Антропофил. В странах Азии, реже на других континентах. В СНГ — в республиках Средней Азии
Microsporum	<i>M. gypsum</i>	Микроспория, кожа	Септированный мицелий в чешуйках	Колонии с гипсовидной поверхностью, желтоватые. Мицелий с боковыми алейриями, обилие 3–6-камерных широких тупоконечных веретен	Животные, человек, почва. Постоянный резервуар — почва. Геофил. На всех континентах
Trichophyton	<i>Tr. mentagrophytes</i> (s. <i>Tr. gypsum</i>)	Трихофития, волосы, кожа	Мелкие споры, покрывающие волос в виде цепочек. Септированный мицелий в чешуйках	Колонии белые, иногда кремовые, с гипсовидной поверхностью. Обратная сторона культуры коричневая или кремоватая. Мицелий тонкий, редко ветвящийся, с обилием круглых спор, местами в виде грозди, спирали, завитка, редко многокамерные, тупоконечные веретена	Животные, человек. Зоофил. На всех континентах
Trichophyton	<i>Tr. verrucosum</i>	Трихофития, волосы, кожа	Крупные споры на волосе в виде цепей. Мицелий в чешуйках	Растет медленно. Колонии кожистые, бугристые, восковидные, гладкие, без воздушного мицелия, периферия плоская, узкая. Мицелий редко септированный, широкий, с интеркалярными и концевыми хламидоспорами. Цепочки из круглых клеток	Коровы, телята, лошади, ослы, верблюды. Человек. Зоофил. На всех континентах

1	2	3	4	5	6
Trichophyton	Tr. Schonleinii (s. Achorion schonleinii)	Фавус, волосы, кожа, ногти	В волосе неравномерно септированный мицелий, крупные споры. Волосы люминесцируют, на коже головы и туловища скутулы — скопления спор и мицелия. В чешуйках — мицелий	Колонии морщинистые, восковидные, желтовато-коричневые. Мицелий широкий неровный со вздутиями, с характерными ветвлениями в виде канделябров и оленьих рогов, артроспорный мицелий, хламидоспоры, гребешковые органы	Человек. Антропофил. Преимущественно в странах Азии и Африки
Trichophyton	Tr. violaceum	Трихофития, волосы, кожа, ногти	Волос заполнен круглыми, крупными спорами. В чешуйках и ногтях мицелий и споры	Колония выпуклая, бугристая, складчатая, плотная, кожистая, фиолетовая. Сплетения тонкого, частосептированного с боковыми ветвлениями и спорами мицелия. Много хламидоспор	Человек. Антропофил. Преимущественно в странах Азии и Африки
Trichophyton	Tr. interdigitale	Микоз стоп, кожа и ногти стоп	Септированный мицелий в чешуйках и ногтях	Колония белоснежная, куполообразная, пушистая. Мицелий тонкий, с обилием округлых мелких спор, ветвистый	Человек. Антропофил. На всех континентах
Trichophyton	Tr. rubrum	Рубромикоз, кожа, ногти кистей и стоп	Септированный мицелий в чешуйках и ногтях	Колония куполообразная, пушистая с характерной вишнево-красной окраской основания и среды. Мицелий тонкий (2–3 мкм в диаметре) септированный, с обилием удлиненных микроконидий, редко макроконидии, веретена тупокопечные 5–6-камерные.	Человек. Антропофил. На всех континентах
Pityrosporum	P. orbiculare	Отрубевидный лишай, кожа	Широкий, короткий, слегка изогнутый мицелий и споры (2–8 мкм) группами	Растет под маслом, колонии серовато-желтые. Почкующиеся клетки	Человек. Антропофил. На всех континентах

1	2	3	4	5	6
Возбудители системных микозов					
Candida	Наиболее частый <i>C. albicans</i>	Кандидоз. Кожа, слизистые оболочки, органы дыхания, мочеполовые и другие органы и системы	Псевдомицелий, округлые и удлинённые почкующиеся клетки	Колонии круглые, сметанообразные. Беловатые, выпуклые, блестящие, гладкие. Псевдомицелий, хламидоспоры 10–20 мкм, двухконтурные, псевдоконидии	Человек, животные, фрукты, овощи. Повсеместно
Cryptococcus	<i>C. neoformans</i>	Криптококкоз. Легкие, ЦНС, реже кожа, слизистые, внутренние органы	Круглые или овальные клетки от 2–5 до 10–20 мкм в диаметре, иногда с одной почкой, окружены слизистой капсулой, толщина которой больше диаметра клетки. Микроскопируют в капле туши	Колонии круглые, гладкие, блестящие, слизистые, желтоватые. Клетки округлые с почкой, окружены капсулой	Человек, рогатый скот, лошади, кошки, птицы. Повсеместно
Blastomyces	<i>B. dermatitidis</i>	Северо-американский бластомикоз. Кожа, легкие, печень, селезенка, почки и другие органы	Крупные, 8–25 мкм в диаметре, почкующиеся клетки с двухконтурной оболочкой	Дрожжевая форма (37°), колонии сметанообразные, клетки почкующиеся. Мицелиальная форма (30°), колонии бархатисто-пушистые, белые. Мицелий септированный, конидии, хламидоспоры	Человек, почва. Северная Америка
Blastomyces	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Южно-американский бластомикоз. Кожа, слизистые, внутренние органы	Крупные (10–30 мкм в диаметре), с двойными контурами клетки, множественное почкование	1. Дрожжевая форма (37°). Колонии сметанообразные, состоят из овальных почкующихся клеток. 2. Колонии желтоватые, пушистые, с ветвящимся мицелием и конидиями (30°)	Человек, растения. Страны Южной Америки, единичные случаи в Азии, Австралии, Европе

1	2	3	4	5	6
Histoplasma	<i>H. capsulatum</i> <i>H. duboisii</i>	Гистоплазмоз, поражение внутренних органов, ЦНС	Мелкие (2–4 мкм в диаметре) клетки круглой или овальной формы, расположены в макрофагах, гигантских клетках, в клетках селезенки, печени, лимфатических узлов, лейкоцитах	1. Дрожжевая форма (37°). Колонии блестящие, сметанообразные. Почкующиеся клетки. Часто цепочками. 2. Мицелиальная форма (30°). Колонии бархатистые, серовато-коричневые, врастающие в среду, мицелий тонкий, ветвистый, септированный, хламидоспоры	Человек, животные, почва, особенно загрязненная, птицы и летучие мыши. США и др. страны Америки и Африки. От 45° к северу до 30° к югу от экватора. В СНГ не встречается
Phlathora	<i>Ph. pedrosoi</i> и др.	Хромомикоз. Кожа	Округлые, желтовато-коричневые делящиеся клетки диаметром 8–15 мкм	Колонии пушистые с черным основанием, сероватые или темно-зеленые, иногда кожистые. Мицелий септированный, ветвистый, широкий (2,5–5,2 мкм), споры крупные, делящиеся	Человек, почва, растения. Повсеместно, чаще в тропических зонах
Cephalosporium	<i>C. acrenomyium corda</i>	Цефалоспориоз. Кожа	Тонкий мицелий	Колонии выпуклые, пушистые, светло-сиреневого цвета. Мицелий септированный, тонкий, обилие удлиненных конидий	Человек, почва, растения. Повсеместно
Aspergillus	<i>A. fumigatus</i> <i>A. flavus</i> <i>A. niger</i> и др.	Аспергиллез. Легкие и другие внутренние органы. Кожа	Широкий, септированный, ветвящийся мицелий, иногда конидиеносцы, стеригмы, конидии	Колонии быстро растущие, пушистые, различного цвета. Мицелий широкий с характерными конидиеносцами, стеригмами, конидиями	Человек, животные, почва, растения. Повсеместно. Возможны профессиональные болезни

Серологический метод

Серодиагностика разработана не для всех микозов. Серологические реакции имеют большое значение для диагностики кандидозов, особенно при висцеральных формах кандидоза. Серологическое исследование включает в себя реакцию агглютинации, реакцию преципитации, реакцию связывания комплемента. Результаты исследования считают положительными при нарастании титра антител в динамике заболевания. Антигены для этих реакций готовят из культур *Candida*, предпочтительно из аутоштамма. Для РСК берут 2–3 разных антигена (вакцину, полисахаридную фракцию культуры гриба, антигены типа лизатов). При проведении РА лучше использовать взвесь живой культуры гриба в концентрации 2 млрд. клеток в 1 мл. Однако эти реакции не всегда информативны. Высокой чувствительностью обладают реакция непрямой гемагглютинации, реакция иммуноэлектрофореза, реакция иммунодиффузии, реакция агглютинации латекса.

Для более точной постановки диагноза используют 2–3 реакции.

Перечисленные серологические реакции с использованием специфических антигенов применяются в качестве вспомогательных методов для диагностики висцеральных (генерализованных) форм дерматомикозов и глубоких (висцеральных) микозов.

Аллергический метод

Метод самостоятельного значения не имеет, так как аллергены, полученные из грибов, недостаточно специфичны.

Аллергические пробы проводятся путем внутрикожного введения соответствующих аллергенов (взвеси из убитых грибов, фильтратов культур, полисахаридных и белковых фракций из клеток или клеточных оболочек возбудителей).

Результаты проб учитывают по пятибалльной системе через 20 мин (немедленные) и через 24–48 ч (замедленные).

При кандидозах в качестве аллергена используют поливалентную вакцину, содержащую 200 мл клеток грибов в 1 мл и прогретую при температуре 80 °С в течение 2 ч. Вакцину в объеме 0,1 мл вводят внутрикожно, для ослабленных детей ее разводят в 10 раз. Результаты реакции (гиперемия, папула) учитывают через 24–48 ч.

При дерматомикозах аллергические пробы производят путем внутрикожного введения 0,1 мл трихофитина, микроспорина или флавина. Положительная реакция характеризуется появлением красноты и инфильтрата. Результат учитывают через 24–48 ч.

Для диагностики глубоких микозов используют аллергические пробы с кокцидиоидином, гистоплазмином, бластомицином.

Кроме того, для выявления алергизации организма широко применяют иммунологические тесты *in vitro*: дегрануляцию тканевых и сывороточных базофилов при гиперчувствительности немедленного типа, а при гиперчувствительности замедленного типа — реакцию торможения миграции фагоцитов, бластной трансформации лимфоцитов и др.

Биологический метод

Биологические исследования проводят на экспериментальных животных (мыши, крысы, хомяки, кролики, морские свинки, собаки, кошки) для выяснения патогенности возбудителя, выделения чистой культуры гриба. Материал вводят животным различными методами: подкожно, внутривенно, наочно, внутримышечно, в коготь и т. д. Результаты учитывают по характеру выделенной культуры, данным вскрытия, гистологического исследования на наличие гриба и реакции организма.

Для определения патогенности *Candida* белым мышам и кроликам внутривенно вводят выделенную культуру. Патогенными считаются культуры, которые в дозе 1 млн. клеток вызывают гибель белых мышей в течение пяти суток, а кроликов весом 2 кг — девяти суток.

ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МИКОЗОВ

Для лечения микозов используют противогрибковые антибиотики: нистатин, леворин, натриевые соли леворина и нистатина, трихомицин, амфотерицин В, клотримазол, миконазол, эконазол, изоканазол, кетоканазол, гризеофульвин, 5-фтороцитозин.

Специфическая профилактика не разработана.

ЗАДАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ЗАНЯТИЮ

1. Изучите морфологию дерматофитов. Просмотрите и зарисуйте демонстрации.
2. Изучите характер роста дрожжеподобных грибов рода *Candida* на агаре Сабуро. Опишите колонии.
3. Приготовьте мазок из культуры *Candida*, окрасьте метиленовым синим. Зарисуйте в альбом морфологию гриба.
4. Изготовьте препарат из волоса. Микроскопируйте сухой системой $\times 8, \times 20$. Здоровый волос имеет четкие границы, неповрежденную кутикулу. При поражении грибами на его поверхности видны споры, а внутри — мицелий.
5. Ознакомьтесь с набором лекарственных препаратов, используемых для лечения микозов.

Тема: ВОЗБУДИТЕЛИ МИКОПЛАЗМОЗА

Цель: Уметь охарактеризовать основные свойства возбудителей микоплазмоза, их морфологические особенности, роль в инфекционной патологии человека; знать методы лабораторной диагностики и препараты для лечения данной инфекции.

В настоящее время известно около 40 видов микоплазм, выделенных из различных источников — мелкого и крупного рогатого скота, свиней, птиц, а также человека.

Возбудители микоплазмоза относятся к семейству *Mycoplasmataceae*, роду *Mycoplasma*. В инфекционной патологии человека наибольшее значение имеют виды: *M. pneumoniae* (возбудитель острых респираторных заболеваний и первичной атипичной пневмонии); *M. hominis* — 1-го и 2-го типов (возбудители воспалительных процессов верхних дыхательных путей, фарингитов, ангин, шейной аденопатии, урогенитальных уретритов и других заболеваний мочеполовой системы).

Микоплазмы представляют собой мелкие (125–300 нм), полиморфные микроорганизмы. Спор и капсул не образуют, неподвижны. У некоторых (*M. pneumoniae*) обнаружены структуры, выполняющие функцию движения. Для окраски микоплазм используют метод Романовского — Гимза. Морфологической особенностью микоплазм является отсутствие клеточной стенки, что обуславливает выраженный полиморфизм — встречаются шаровидные, нитевидные, ветвящиеся формы и др. С отсутствием клеточной стенки связана избирательная чувствительность к антимикробным препаратам. Микоплазмы не чувствительны к препаратам (группа пенициллинов и др.), мишенью действия которых на микроорганизмы является клеточная стенка. Их отличает способность размножаться на бесклеточной питательной среде (в отличие от вирусов) и неспособность к реверсии, сопровождаемой восстановлением клеточной стенки (в отличие от L-форм бактерий).

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Место микоплазм в современной классификации живых организмов.

2. Морфологические особенности микоплазм. Избирательная чувствительность к химиопрепаратам.
3. Виды микоплазм, имеющих значение в инфекционной патологии человека.
4. Эпидемиология (источники и механизмы передачи инфекции).
5. Патогенез и клиника микоплазмоза.
6. Особенности лабораторной диагностики.
7. Препараты для лечения и профилактики.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дикий И.Л., Холупняк И.Ю., Шевелева Н.Е., Стегний М.Ю. Микробиология.— Х.: Прапор: Изд-во УкрФА, 1999.— С. 29–31.
2. Елинов Н.П., Заикина Н.А., Соколова И.П. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии.— М.: Медицина, 1988.— С. 181.

МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Лабораторная диагностика включает бактериологический и серологический методы. Для ранней диагностики заболевания используют метод иммунофлуоресценции мазков-отпечатков из носоглотки и бронхиальных смывов.

Бактериологический метод

Материалом для исследований могут быть, в зависимости от клинических проявлений болезни, мокрота, отделяемое слизистых оболочек верхних дыхательных путей, мочеполовых органов.

Культивирование микоплазм технически довольно сложно, так как они растут только на сложных, многокомпонентных питательных средах с добавлением белков, стеролов и фосфолипидов, что связано с особенностями химического состава — значительным количеством холестерина в мембране клеток. Выделить их в чистой культуре удастся не всегда и не ранее чем через месяц после посева материала от больного (*M. pneumoniae*).

На плотных питательных средах микоплазмы растут в виде уплотненных, растущих в среду центром колоний с нежным краем, по форме напоминающих яичницу-глазунью. Диаметр колоний варьирует от 10 до 500 мкм. На жидкой питательной среде рост микоплазм наблюдается в виде легкой опалесценции, слабого осадка и нежной поверхностной пленки.

В зависимости от характера используемых питательных сред отличают следующие морфологические особенности микоплазм,

определяемые при микроскопировании культур: при культивировании на плотных средах они представлены пластическими сгустками протоплазмы неопределенной формы, на жидких — нитями, кольцами, гранулами, палочковидными и спиралевидными образованиями.

Используют также метод культивирования в культуре тканей.

В настоящее время хорошо отработана методика культивирования Т-микоплазм. Особенностью этого вида микоплазм является их абсолютная потребность в мочевины. Только они вырабатывают ферменты, расщепляющие мочевины. При использовании элективной уреазной питательной среды уже через 24–28 ч по изменению ее цвета с желтого на красный можно судить о наличии Т-микоплазм в исследуемом материале.

Серологический метод

Имеет преимущественное значение в диагностике микоплазмоза. С сыворотками больных ставят реакцию связывания комплемента (РСК), реакцию непрямой гемагглютинации (РНГА). Последняя является более чувствительной. Исследуют парные сыворотки: первую берут до 6 дня болезни, вторую на 10–14 день. Диагностическое значение имеет нарастание титра не менее чем в 4 раза.

Используют также реакцию выявления холодовых агглютининов в сыворотке больных, однако она имеет меньшее диагностическое значение в сравнении с РСК и РНГА. Холодовые агглютинины выявляются лишь у половины больных микоплазмозом.

ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ

Применяют антибиотики тетрациклинового ряда. Лечение проводится также стрептомицином, левомицитином, эритромицином.

С целью специфической профилактики микоплазмоза разрабатываются живые и убитые противомикоплазменные вакцины.

ЗАДАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ЗАНЯТИЮ

1. Постановка реакции непрямой гемагглютинации.
2. Изучение препаратов для лечения микоплазмоза.

Тема: ПАТОГЕННЫЕ ХЛАМИДИИ

Цель: Изучить методы микроскопического исследования патогенных хламидий, методы их культивирования и серологической диагностики хламидиозов; ознакомиться с препаратами для лечения хламидийных инфекций.

Патогенные хламидии относятся к классу Rickettsiae, порядку Chlamydiales, семейству Chlamydiaceae, роду Chlamydia. Различают 4 вида хламидий, играющих роль в инфекционной патологии человека. Инфекции, вызываемые хламидиями, носят общее название — хламидиозы.

C. trachomatis поражает слизистые оболочки глаза и мочеполовой системы, вызывая трахому, паратрахому и конъюнктивит с включениями (серовары А, В, Ва, С); уретриты, цервициты, сальпингиты, эпидидимиты, конъюнктивиты (серовары D, F, G, H, I, J, K), венерический лимфогранулематоз (серовары $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$). *C. psittaci* — возбудитель пситтакоза (орнитоза), вызывающий у человека пневмонии, полиартриты, энтериты, энцефалиты.

C. pneumoniae является возбудителем острых респираторных заболеваний, пневмонии, атеросклероза, саркоидоза, бронхиальной астмы. Роль *C. psittaci* в патологии человека уточняется.

Особенностью патогенных хламидий является облигатный внутриклеточный паразитизм в сочетании с основными признаками прокариотических микроорганизмов. Для выявления хламидий в мазках используют окраску по методу Романовского — Гимза и темнопольную микроскопию.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Хламидии: таксономическое положение, классификация, морфологические и биологические особенности.
2. Эпидемиология, патогенез и клинические проявления хламидиозов.
3. Методы лабораторной диагностики хламидиозов.
4. Лечение и профилактика хламидиозов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дикий И.Л., Холуяк И.Ю., Шевелева Н.Е., Стегний М.Ю. Микробиология.— Х.: Прапор: Изд-во УкрФА, 1999. — С. 32–33.
2. Елинов Н.П., Заикина Н.А., Соколова И.П. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии.— М.: Медицина, 1988. — С. 24–25, 181.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ХЛАМИДИОЗОВ

Используют: микроскопический, серологический методы исследований, метод гибридизации ДНК и полимеразную цепную реакцию (ПЦР).

В связи с облигатным паразитизмом хламидии не растут на искусственных питательных средах, поэтому для выделения их чистых культур используют куриные эмбрионы, культуры клеток, лабораторных животных.

Существуют особенности проведения лабораторной диагностики хламидиозов, обусловленных разными видами хламидий.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ *S. TRACHOMATIS*

Используют микроскопический, культивационный, серологический методы, полимеразную цветную реакцию и метод гибридизации ДНК.

Микроскопический метод применяют редко в связи с субъективностью его результатов и низкой чувствительностью для постановки предварительного диагноза. Материалом для исследования служат: соскобы эпителия слизистой уретры, цервикального канала, конъюнктивы век, пунктаты лимфатических узлов.

Мазки из исследуемого материала фиксируют в ацетоне в течение 10–15 мин и окрашивают по методу Романовского — Гимза (см. цв. вкл. XIX). В препарате *S. trachomatis* располагаются вне- и внутриклеточно в виде округлых образований фиолетового цвета диаметром 0,2–0,4 мкм (элементарные тельца) и 0,8–1,5 мкм (ретикулярные тельца).

Выделение чистой культуры. Культивирование хламидий является трудоемким и дорогостоящим процессом, требующим условий специализированной лаборатории в связи с высокой заразностью возбудителя. Чистую культуру *S. trachomatis* получают путем заражения желточного мешка 7-дневного куриного эмбриона. Зараженные куриные эмбрионы погибают на 5–8 сут после заражения, из желточных мешков готовят мазки-отпечатки, окрашивают по методу Романовского — Гимза или люминесцирующим хламидийным иммуноглобулином.

Для культивирования хламидий также используют перевиваемые культуры клеток Мак-Коя (McCoу), L-929, L-199, Нер-2. Через 48–72 ч после заражения *S. trachomatis* выявляют микроскопически в зараженной культуре клеток с использованием окраски по методу Романовского — Гимза или прямым иммунофлуоресцентным методом.

Серологический метод. Экспресс-диагностика для обнаружения возбудителя в патологическом материале проводится с помощью метода люминесцентной микроскопии, основанного на специфическом взаимодействии моноклональных антител, меченных флуоресцеином, с поверхностными антигенами хламидий в мазках. Для выявления хламидий в соскобах также используется высокочувствительный метод иммуноферментного анализа (ИФА). Недостатком этих методов являются положительные результаты через 1,5–2 мес после излечения, что связано с длительным присутствием (до полной смены эпителия) на эпителиальных клетках поверхностных полисахаридных антигенов хламидий.

Специфические антитела в сыворотке крови больных к *S. trachomatis* выявляют с использованием РНГА, РСК и ИФА.

РНГА является высокочувствительным методом, но эритроцитарный диагностикум дает положительную перекрестную реакцию с антигенами риккетсий Провачека.

РСК может давать ложноположительные результаты.

ИФА является высокоспецифичным методом для выявления в сыворотке крови больных иммуноглобулинов классов М и G.

Полимеразная цветная реакция (ПЦР). Эта реакция высокочувствительна и позволяет выявить наличие возбудителя по одной молекуле ДНК. В основе метода лежит многократное образование копий консервативных (постоянных) участков ДНК возбудителя под действием фермента ДНК-полимеразы. После накопления копий ДНК их идентифицируют методами электрофореза, гибридизации ДНК.

Метод гибридизации ДНК. Позволяет идентифицировать геном *S. trachomatis* после его гибридизации (соединения) с комплементарными фрагментами искусственно созданной ДНК, меченой изотопами или ферментами (пероксидазой, щелочной фосфатазой). Полученные образцы исследуют методом ИФА.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ОРНИТОЗА, ВЫЗЫВАЕМОГО *S. PSITTACI*

Лабораторные исследования проводят только в специально оборудованных лабораториях в связи с высокой контагиозностью возбудителя.

Используют: микроскопический (см. цв. вкл. ХХ), серологический, биологический и аллергический методы.

Серологический метод. Является основным методом диагностики. С целью обнаружения специфических сывороточных антител к возбудителю используют РСК (титры 1:32 и выше), РТГА, ИФА.

Выделение чистой культуры. В обычной практике культуру возбудителя не выделяют. При необходимости для его культивирования можно использовать культуры клеток, куриные эмбрионы и белых мышей. Материалом для исследования могут быть: кровь, мокрота, биопсированные органы. Сроки инкубирования возбудителя в зараженных биологических объектах — 7–10 дней. В монослое культуры клеток обнаруживаются цитолитические бляшки (зоны гибели клеток). Их выявляют методом люминесцентной микроскопии после фиксации клеток метанолом и окраски родоспецифической флуоресцирующей антисывороткой.

Аллергический метод. С целью аллергодиагностики проводят внутрикожную аллергическую пробу с помощью специфического и контрольного орнитозного диагностикума. Внутрикожная проба дает положительный ответ, начиная с 2–3 дня заболевания, и сохраняется длительное время после перенесения заболевания. Метод может быть использован для ранней и ретроспективной диагностики инфекции.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЗАБОЛЕВАНИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ *S. PNEUMONIAE*

Используют микроскопический и серологический методы.

Микроскопический метод. Из материала для исследования: мокроты, носоглоточных смывов, мазков из носоглотки и зева — готовят мазки, фиксируют ацетоном и окрашивают по методу Романовского — Гимза.

Серологический метод. Для обнаружения возбудителя в мазках используют прямой метод РИФ. Для выявления специфических антител в сыворотке крови используют метод твердофазного ИФА.

ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ХЛАМИДИОЗОВ

При этиотропном лечении препаратом выбора является доксициклин, при его непереносимости — антибиотики из группы макролидов (эритромицин, азитромицин, кларитромицин), фторхинолоны (офлоксацин, ципрофлоксацин), хлорамфеникол. Для лечения трахомы используют также сульфаниламиды. При смешанной хламидийно-гонококковой инфекции проводят комбинированную антибиотикотерапию с цефалоспоридами 2-го и 3-го поколения.

При хронических хламидиозах наряду с этиотропной терапией рекомендуют применение иммуномодуляторов: Т-активина, интерферона.

Для восстановления нормобиоценозов слизистых оболочек назначают эубиотики (лактобактерин и др.).

Препараты для специфической профилактики хламидиозов не разработаны.

ЗАДАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ЗАНЯТИЮ

1. Промикроскопировать демонстрационные мазки, приготовленные из патологического материала и окрашенные по методу Романовского — Гимза. Найти в них «тельца включений», зарисовать.

2. Промикроскопировать демонстрационные мазки хламидий, обработанные иммунофлуоресцентными сыворотками, в люминесцентном микроскопе.

3. Поставить реакцию связывания комплемента, используемую для серодиагностики хламидиозов.

Тема: ПАТОГЕННЫЕ РИККЕТСИИ

Цель: Изучить методы микробиологической диагностики риккетсиозов, лабораторной дифференциации эпидемического, эндемического сыпного тифа и Q-лихорадки; ознакомиться с препаратами для лечения и специфической профилактики сыпного тифа и Q-лихорадки.

Риккетсии относятся к классу Rickettsia, порядку Rickettsiales, семейству Rickettsiaceae, родам Rickettsia и Coxiella. Инфекционные заболевания, обусловленные ими, называются риккетсиозами. Патогенными для человека видами являются: возбудители эпидемического и эндемического сыпного тифа — *R. prowazekii* и *R. museri burneti*; возбудитель Q-лихорадки — *C. burneti*, возбудители клещевых пятнистых лихорадок — *R. sibirica*, *R. rickettsi* и др.

Патогенные риккетсии, относясь по ультраструктуре к прокариотам, являются облигатными внутриклеточными паразитами. Для выявления их в мазках используют окраску по методам Романовского — Гимза и Здродовского.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Возбудители эпидемического и эндемического сыпного тифа: таксономическое положение, классификация, морфологические и биологические особенности.

2. Эпидемиология, патогенез и клинические проявления эпидемического и эндемического сыпного тифа.

3. Методы лабораторной диагностики эпидемического и эндемического сыпного тифа.

4. Лечение и профилактика эпидемического и эндемического сыпного тифа.

5. Возбудитель Q-лихорадки: таксономическое положение, классификация, морфологические и биологические особенности.

6. Эпидемиология, патогенез и клинические проявления Q-лихорадки.

7. Методы лабораторной диагностики, лечение и профилактика Q-лихорадки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дикий И.Л., Холуляк И.Ю., Шевелева Н.Е., Стегний М.Ю. Микробиология.— Х.: Прапор: Изд-во УкрФА, 1999.— С. 32, 343–348.
2. Елинов Н.П., Заикина Н.А., Соколова И.П. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии.— М.: Медицина, 1988.— С. 23–24, 180–182.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА РИККЕТСИОЗОВ

Лабораторная диагностика эпидемического и эндемического сыпного тифа

Используют: микроскопический, серологический, биологический и аллергический методы.

В качестве патологического материала для выявления возбудителя используют кровь больного человека. Инфекции высокозаразны и требуют соблюдения правил предосторожности при работе с возбудителями.

Микроскопический метод. Является одним из основных методов. Риккетсии обнаруживаются внутриклеточно в виде палочковидных, нитевидных и кокковидных форм в мазках из крови, окрашенных по методам Романовского — Гимза и Здродовского.

Биологический метод. Для выделения первичных культур сыпнотифозных риккетсий проводят заражение платяных вшей методом эпидермомембран (метод Пшеничнова), а затем инфекцию воспроизводят на лабораторных животных. Для внутрибрюшинного заражения используют морских свинок.

Для дифференциальной диагностики эндемического и эпидемического сыпного тифа заражают самцов морских свинок. При заражении *R. musegi burneti* у самцов развивается специфический периорхит с накоплением риккетсий в мезотелии влагалишных оболочек яичка. При заражении самцов морских свинок возбудителем эпидемического сыпного тифа *R. prowazekii* наблюдается лихорадка без признаков периорхита.

Серологический метод. Для ранней экспресс-диагностики используют непрямой метод РИФ, с помощью которого выявляют сывороточные IgM и IgG. Начиная с первой недели и на второй неделе заболевания, сывороточные антитела выявляют с помощью РА, РСК, РПГА.

В РА используют специфический риккетсиозный антиген ОХ₁₉ (реакция Вейля — Феликса). Для дифференциации сыпного тифа от болезни Брилла ставят параллельно РА с антигенами из *R. prowazekii* и протейным антигеном ОХ₁₉. Реакция со специфическим антигеном высокочувствительна и дает положительный ответ с 6–7 дня заболевания при титре 1:80–1:100. Реакция Вейля — Феликса обладает низкой специфичностью. При болезни Брилла

реакция Вейля — Феликса с протейным антигеном отрицательна. Для ускоренной диагностики применяют реакцию Нобля (капельную агглютинацию на стекле).

РСК со специфическим антигеном используется для ретроспективного анализа и диагностики острой формы инфекции. Исследуют парные сыворотки. Диагностический титр составляет 1:100 и выше. Для дифференциации эпидемического и эндемического сыпного тифа проводят исследования с двумя параллельными специфическими антигенами: из *R. prowazekii* и *R. museri burneti*.

РНГА используется для диагностики свежих форм инфекционной болезни и становится положительной на 7—8 день заболевания при титре 1:100 и его нарастании при повторных анализах.

Решающая роль в дифференциации эндемического и эпидемического сыпного тифа принадлежит РА и РСК со специфическими антигенами их возбудителей. При эндемическом сыпном тифе диагностический титр с *R. museri burneti* в 3—4 раза выше титра с *R. prowazekii*. При эндемическом сыпном тифе реакция Вейля—Феликса тоже положительна, но в более поздние сроки и в более низких титрах, чем при эпидемическом сыпном тифе.

Лабораторная диагностика Q-лихорадки

Используют серологический, биологический и аллергический методы.

Серологический метод. Для выявления специфических антител в сыворотке крови на второй неделе заболевания применяют РА и РСК с исследованием парных сывороток. В РА диагностические титры антител — 1:8—1:16; в РСК — 1:32—1:64 при нарастании титра при повторных анализах.

Биологический метод. В проблемных диагностических случаях рекомендуется выделение риккетсий путем заражения лабораторных животных. Проводят заражение кровью больного в тестикулы самцов морских свинок. После гибели животного экстрактом его селезенки заражают куриные эмбрионы и на 8—13 день выделяют чистую культуру *S. burneti*.

Аллергический метод. Для ретроспективной диагностики используется внутрикожная аллергическая проба со специфическим аллергеном.

ПРЕПАРАТЫ

ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ РИККЕТСИОЗОВ

Препаратами выбора при этиотропной терапии являются антибиотики группы тетрациклина, в первую очередь, доксициклин. Реже

в связи с высокой токсичностью применяют хлорамфеникол; при непереносимости — эритромицин, миноциклин.

Иммунизация риккетсиозными вакцинами проводится по эпидемиологическим показаниям. Специфическую профилактику эпидемического сыпного тифа проводят с помощью живой вакцины, вводимой подкожно. Сухая живая комбинированная сыпнотифозная вакцина Е (ЖКСВ-Е) приготовлена из вакцинного штамма Е (Мадрид), выращенного на развивающемся курином эмбрионе и высушенного вместе с растворимым антигеном вирулентного штамма возбудителя.

Для специфической профилактики Q-лихорадки используется живая вакцина. Сухую живую вакцину готовят из лиофильно высушенного вакцинного штамма риккетсий Бернета М-44. Она вводится подкожно и обеспечивает иммунитет в течение 2 лет.

Разработана вакцина из риккетсий Музера для профилактики эндемического сыпного тифа.

ЗАДАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ЗАНЯТИЮ

1. Промикроскопировать демонстрационные мазки, приготовленные из патологического материала и окрашенные по Романовскому — Гимза и Здродовскому. Найти в них риккетсии Провацка, зарисовать.
2. Поставить реакцию агглютинации Вейля — Феликса с протейным антигеном.
3. Изучить препараты для специфической профилактики и этиотропного лечения сыпного тифа и Q-лихорадки.

Тема: ВОЗБУДИТЕЛЬ ГРИППА

Цель: Уметь охарактеризовать вирус — возбудитель гриппа, методы его индикации и идентификации, обосновать основные направления лечения и профилактики гриппа.

Возбудитель гриппа — РНК-содержащий вирус из семейства Orthomyxoviridae, вызывающий острое инфекционное заболевание, проявляющееся общей интоксикацией и катаральными явлениями.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Характеристика возбудителя гриппа: структура и химический состав вириона, антигенные свойства, методы культивирования.
2. Источник инфекции и пути заражения гриппом.
3. Патогенез и клинические симптомы гриппа.
4. Лабораторная диагностика.
5. Препараты для лечения и профилактики.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дикий И.Л., Холупяк И.Ю., Шевелева Н.Е., Стегний М.Ю. Микробиология.— Х.: Прапор: Изд-во УкрФА, 1999.— С. 348–352.
2. Елинов Н.П., Заикина Н.А, Соколова И.П. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии.— М.: Медицина, 1988.— С. 192–194, 203–204.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Вирусологический метод

Заключается в выделении вируса из материала больного, его индикации и идентификации.

Материал для исследования: носоглоточное отделяемое (в первые три дня болезни). Его можно взять у больного двумя методами: 1) дают 2–3 раза прополоскать горло 10–15 мл изотонического раствора натрия хлорида. Смыв из зева собирают в широкогорлую банку. Затем стерильными кусочками ваты протирают заднюю стенку глотки и носовые ходы и ватные тампоны опускают в банку со смывом; 2) ватным тампоном, слегка смоченным изотоническим раствором натрия хлорида, протирают заднюю стенку глотки, другим тампоном протирают

носковые ходы и оба тампона помещают в пробирку с 5 мл изотонического раствора натрия хлорида.

В лаборатории полученный от больного материал подвергают обработке: тампоны прополаскивают в жидкости, в которой они находились, отжимают о стенки сосуда и удаляют. Смыв отстаивают в холодильнике и для исследования используют среднюю часть отстоя. Его обрабатывают антибиотиками (по 500 ЕД пенициллина и стрептомицина на 1 мл) для подавления бактериальной микрофлоры, проверяют на стерильность. После такой обработки исследуемый материал вводят в амниотическую полость 10–11-дневных куриных эмбрионов и инкубируют 3 дня при 35 °С. После вскрытия эмбрионов проводят индикацию вируса, т. е. определяют его наличие в аллантоисной и амниотической жидкостях в реакции гемагглютинации.

Реакцию гемагглютинации можно ставить двумя методами: 1) капельным на стекле; 2) в развернутом ряду в пробирках или в лунках пластин из плексигласа.

Первый метод является ориентировочным и применяется для индикации вирусов, обладающих гемагглютинирующей активностью, второй — используется для типирования этих вирусов.

Для постановки реакции капельным методом на чистое обезжиренное предметное стекло наносят каплю 5 % взвеси эритроцитов, чувствительных к исследуемому вирусу, и каплю исследуемого материала (аллантоисную и амниотическую жидкости), тщательно смешивают пастеровской пипеткой. При положительном результате через 1–2 мин макроскопически наблюдают появление хлопьевидной агглютинации эритроцитов.

Для постановки *реакции гемагглютинации в развернутом ряду* готовят двукратно возрастающие разведения исследуемого материала на изотоническом растворе натрия хлорида в объеме 0,5 мл. Во все пробирки или лунки вносят по 0,5 мл 1 % взвеси эритроцитов кур (для вируса гриппа типа А и В можно использовать эритроциты морских свинок и 0 группы крови человека), трижды отмытых изотоническим раствором натрия хлорида. Для контроля на спонтанную агглютинацию прибавляют 0,5 мл изотонического раствора натрия хлорида, не содержащего вирус. Пробирки или пластины с лунками встряхивают и выдерживают при 37 °С или 4 °С (для вируса гриппа типа С).

Результаты реакции учитывают после полного оседания эритроцитов в контроле по характеру осадка эритроцитов. В положительных случаях степень агглютинации отмечают плюсами: 4 плюса — реакция, имеющая вид тонкой пленки из склеившихся эритроцитов, покрывающей

дно лунки («зонтик»); 3 плюса — реакция с просветами в пленке; 2 плюса — наличие пленки с фестончатыми, кружевными краями из склеившихся эритроцитов; 1 плюс — хлопьевидный осадок агглютированных эритроцитов. Минус — резко очерченный осадок эритроцитов, не отличимый от контроля (отсутствие) агглютинации. За титр принимают предельное разведение исследуемого материала, вызвавшее агглютинацию эритроцитов на 2 плюса. Это разведение считается содержащим одну гемагглютинирующую единицу вируса гриппа.

Идентификацию выделенного вируса гриппа проводят в реакции связывания комплемента (РСК), реакции торможения гемагглютинации (РТГА) и реакции нейтрализации (РН).

Реакцию связывания комплемента ставят с иммунными сыворотками морских свинок к вирусам гриппа типа А, В, С. В качестве антигена используют аллантоисную жидкость зараженного куриного эмбриона в разведении, содержащем не менее 16–20 гемагглютинирующих единиц выделенного вируса. Реакцию ставят на холоду по обычной методике. Тип выделенного вируса определяют по сыворотке, давшей с ним задержку гемолиза.

Реакция торможения гемагглютинации. При постановке развернутой РТГА пользуются пробирками или пластинами из органического стекла с лунками.

В качестве антигена используют аллантоисную и амниотическую жидкости. Перед постановкой реакции антиген титруют и используют рабочее разведение антигена, содержащее в 0,25 мл 4 МЕ. Далее готовят двукратные разведения моноспецифических, типоспецифических иммунных сывороток в изотоническом растворе натрия хлорида и разливают по 0,25 мл. К разведениям сыворотки добавляют по 0,25 мл рабочего разведения антигена. Пробирки или пластины встряхивают и оставляют при комнатной температуре от 30 мин до 2 ч для контакта смесей (антигена и антител), после чего в каждую пробирку или лунку вносят по 0,5 мл 1 % взвеси эритроцитов, встряхивают и оставляют до оседания эритроцитов в контрольной пробирке или лунке. В РТГА ставят три контроля: 1) контроль эритроцитов; 2) контроль используемой сыворотки на способность агглютинировать эритроциты; 3) контроль специфичности антигена.

Результаты РТГА учитывают по характеру осадка эритроцитов. В разведениях сыворотки, содержащих высокую концентрацию специфических антител, гемагглютинирующая активность вируса полностью подавляется, и эритроциты оседают на дно пробирки точно так же, как в контроле. Видовую или штаммовую принадлежность выделенного ви-

руса устанавливают по иммунной сыворотке, показавшей наивысший титр антител к этому вирусу.

Реакция нейтрализации в куриных эмбрионах. Из материала, содержащего вирус гриппа, готовят серийные разведения и добавляют к ним специфическую сыворотку в соответствии с титром, указанным на этикетке ампулы. Смесь инкубируют 30–60 мин при температуре 37 °С, после чего заражают ею куриные эмбрионы. Контролем служат куриные эмбрионы, зараженные вирусом, обработанным нормальной сывороткой.

Положительной считают РН при отсутствии изменений в куриных эмбрионах.

Наряду с вирусологическим методом с целью ранней ориентировочной диагностики гриппа применяют риноцитоскопические исследования и реакцию иммунофлуоресценции. Материалом служат препараты-отпечатки слизистой оболочки носовой полости больных и носоглоточное отделяемое. Для получения препаратов-отпечатков в носовой ход вводят узкую с отшлифованными краями стеклянную или плексигласовую пластинку, ее слегка прижимают к поверхности нижней носовой раковины, а затем отодвигают пластинку к носовой перегородке и выводят наружу.

Для **риноцитоскопического изучения** полученные на стекле отпечатки окрашивают различными методами, но чаще по Романовскому, Пигаревскому или Павловскому. При гриппе в препаратах-отпечатках обнаруживают группы клеток и пласты измененного цилиндрического эпителия. Клетки эпителия увеличенные, округлые, лишены ресничек, ядро и вакуоли пикнотические или лизированные. Обнаруживаются внутриклеточные включения, расположенные в цитоплазме вблизи ядра. По Романовскому включения красятся в фиолетовый цвет, по Пигаревскому и Павловскому — в ярко-красный. Наибольшее количество включений и клеток измененного цилиндрического эпителия наблюдается в 1–2-й день болезни.

Для постановки **реакции иммунофлуоресценции** препараты-отпечатки слизистой оболочки носовой полости перепечатаывают на предметное стекло, прикладывая пластинки к предметным стеклам, и обрабатывают флуоресцирующими иммуноглобулинами к вирусу гриппа (прямой метод). Изучение препарата проводят с помощью люминесцентного микроскопа. Специфический антиген обнаруживается в виде ярко светящихся конгломератов в ядре и цитоплазме зараженных вирусом гриппа клеток.

Серологический метод применяется с целью ретроспективной диагностики. Она основана на выявлении прироста титра антител в крови

больного в период реконвалесценции по сравнению с началом заболевания. Первую сыворотку берут у больного до 3–5 дня болезни, вторую — после 10 дня («парные» сыворотки). Для одновременного изучения сывороток первую из них хранят при температуре -20°C . С полученными сыворотками ставят РСК и РТГА. Антигеном служат стандартные диагностические гриппозные антигены. Положительным считается результат при четырехкратном и более увеличении титра антител во второй порции сыворотки.

ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ

С лечебной и профилактической целью применяются противогриппозный донорский иммуноглобулин, лейкоцитарный интерферон, ремантадин, лечебно-профилактическая поливалентная гриппозная сыворотка, живая и убитая вакцины.

Тема: ВОЗБУДИТЕЛЬ КОРИ

Цель: Уметь охарактеризовать вирус кори и вызываемое им заболевание, лабораторную диагностику и специфическую профилактику кори.

Возбудитель кори — РНК-содержащий вирус, относящийся к семейству *Paramyxoviridae* и вызывающий острое инфекционное заболевание (преимущественно у детей) с характерной сыпью.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Характеристика вируса кори.
2. Эпидемиология кори: источник, пути заражения.
3. Патогенез и клиника заболевания.
4. Методы лабораторной диагностики.
5. Лечение, специфическая профилактика кори.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дикий И.Л., Холупяк И.Ю., Шевелева Н.Е., Стегний М.Ю. Микробиология.— Х.: Прапор: Изд-во УкрФА, 1999.— С. 352–354.
2. Елинов Н.П., Заикина Н.А., Соколова И.П. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии.— М.: Медицина, 1988.— С. 195–196, 204.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Вирусологический метод

Заражение материалом больного культуры клеток с целью выделения вируса, его индикация и идентификация.

Материал для исследования: кровь и носоглоточный смыв больного.

Для выделения вируса используют культуры трипсинизированных почечных клеток эмбриона человека, взрослых обезьян и перевиваемые культуры клеток амниона человека. Инфицированные культуры выращивают при 37 °С. Вирус кори вызывает в культурах клеток развитие многоядерных гигантских клеток с наличием цитоплазматических, а позднее и внутриядерных включений.

Для индикации вызванных вирусом кори цитоплазматических изменений применяют **реакцию гемадсорбции**, которая заключается в следующем: из 1–2 пробирок с зараженными и незараженными культурами

клеток удаляют питательную среду и вносят по 0,2 мл 0,4 % взвеси эритроцитов обезьян. Пробирки оставляют в наклонном положении на 30 мин при 37 °С. Затем пробирки осторожно встряхивают и просматривают под малым увеличением микроскопа. На клетках, зараженных вирусом, адсорбируются эритроциты.

Для идентификации выделенного вируса можно использовать: метод иммуофлуоресценции, реакцию задержки гемадсорбции и реакцию нейтрализации в культурах клеток.

Серологический метод

С «парными» сыворотками больного ставят реакцию связывания комплемента, реакцию торможения гемагглютинации, реакцию нейтрализации в культурах клеток Нер-1, Нер-2, КВ с целью ретроспективной диагностики.

В РСК и РТГА в качестве антигена применяют экстракт культур клеток, зараженных вирусом кори и подвергнутых после развития специфической дегенерации троекратному замораживанию и оттаиванию.

ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ

В начальной стадии заболевания для лечения применяют противокоревой иммуноглобулин.

Профилактика осуществляется с помощью живой аттенуированной вакцины, противокоревого иммуноглобулина.

Тема: ВОЗБУДИТЕЛЬ КРАСНУХИ

Цель: Уметь охарактеризовать вирус краснухи и заболевание, вызываемое им, методы диагностики и профилактики.

Вирус краснухи относится к семейству *Togaviridae*, содержит РНК, вызывает заболевание, сопровождающееся мелкопятнистой сыпью и умеренной интоксикацией.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Характеристика вируса краснухи: форма, структура, методы культивирования.
2. Источники заражения, механизмы и пути передачи инфекции.
3. Патогенез и клиническая картина краснухи.
4. Методы лабораторной диагностики.
5. Лечение и профилактика краснухи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дикий И.Л., Холупяк И.Ю., Шевелева Н.Е., Стегний М.Ю. Микробиология.— Х.: Прапор: Изд-во УкрФА, 1999.— С. 354–356.
2. Елинов Н.Н., Заикина Н.А., Соколова И.П. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии.— М.: Медицина, 1988.— С. 196.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Вирусологический метод

Материалом больного (кровь, носоглоточный смыв в остром периоде заболевания) заражают культуры перевиваемых клеток ВЧ-21 или РК, в которых вирус вызывает развитие цитопатического эффекта: очаги круглоклеточной дегенерации, образование многоядерных гигантских клеток с цитоплазматическими включениями, полная деструкция клеточного пласта.

Серологический метод (ретроспективная диагностика)

Серодиагностику проводят с помощью реакции торможения геммагглютинации или реакции нейтрализации в культурах клеток.

Антиген для РТГА и РН получают из культуры клеток, зараженных вирусом краснухи и подвергшихся полной дегенерации. Их трехкратно замораживают и оттаивают, затем центрифугируют и надосадочную жидкость используют в качестве антигена.

РТГА ставят при комнатной температуре с 0,25 % взвесью эритроцитов голубей и 1–3-дневных цыплят.

В РН используют культуры клеток ВРК-21 и РК, вирус краснухи и «парные» сыворотки, полученные от больного. Результат РН учитывают через 7–10 дней после заражения культур клеток.

В РТГА и РН диагностическое значение имеет 4-кратное увеличение титра антител во второй сыворотке.

ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ

Специфическая терапия не разработана.

Профилактика:

Живая аттенуированная вакцина.

ЗАДАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ЗАНЯТИЮ

1. Заражение куриного эмбриона (в хорионаллантоисную полость) вирусом, содержащим материал.
2. Постановка реакции гемагглютинации (имитационная).
3. Просмотр и зарисовка препаратов культур тканей.
4. Ознакомление с лечебно-профилактическими препаратами, применяемыми при гриппе, кори, краснухе.

Тема: ВИРУСЫ ГЕПАТИТА А, ГЕПАТИТОВ НИ А НИ В

Цель: Уметь охарактеризовать вирусы гепатита А, гепатитов ни А ни В и инфекции, вызываемые ими; знать методы выявления вирусов гепатита А, гепатитов ни А ни В, методы серодиагностики; освоить виды лечебных и профилактических мероприятий.

Возбудитель гепатита А (HAV) относится к семейству Picornaviridae, роду энтеровирусов (тип 72). HAV — икосаэдрический РНК-содержащий вирус размером 27–32 нм, не содержит липидов и углеводов. В отличие от других энтеровирусов репликация HAV в кишечнике окончательно не доказана.

Возбудитель гепатита Е изучен недостаточно. Предполагают, что организация генома вируса позволяет отнести его к новому классу РНК-содержащих вирусов или к отдельному роду в семействе Caliciviridae.

Возбудитель гепатита С (HCV) относится к семейству Flaviviridae. HCV — РНК-содержащий вирус размером 80 нм в диаметре, имеет липидную оболочку.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Положение вируса гепатита А в классификации: группа по типу нуклеиновой кислоты, семейство, род.
2. Морфология и биологические свойства вируса гепатита А.
3. Эпидемиология гепатита А (источник заражения, механизм и пути передачи инфекции).
4. Патогенез и клиника гепатита А.
5. Лабораторная диагностика гепатита А: используемый клинический материал; методы культивирования и выявления возбудителя; серодиагностика. Биохимические исследования.
6. Лечение и профилактика гепатита А.
7. Вирус гепатита Е. Эпидемиология, клиника и принципы лабораторной диагностики вирусного гепатита Е.
8. Вирус гепатита С. Эпидемиология, клиника и принципы лабораторной диагностики вирусного гепатита С.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дикий И.Л., Холуяк И.Ю., Шевелева Н.Е., Стегний М.Ю. Микробиология.— Х.: Прапор: Изд-во УкрФА. 1999.— С. 356–361.

Гепатит А (HAV, hepatitis A virus) (син.: *болезнь Боткина, инфекционный или эпидемический гепатит*) — острая инфекционная болезнь, которая вызывается вирусом гепатита А, преимущественно с фекально-оральным механизмом заражения; характеризуется наличием начального периода с повышением температуры тела, диспептичными, гриппоподобными признаками, поражением печени, симптомами гепатита, нарушением обмена веществ, нередко желтухой.

Клиническая диагностика. Опорными симптомами клинической диагностики гепатита А при всех вариантах преджелтушного периода являются боль или ощущение тяжести в правом подреберье, иногда зуд кожных покровов, увеличение печени, потемнение мочи. Эти признаки свидетельствуют о поражении печени. В связи с этим для ранней лабораторной диагностики вирусного гепатита широко используются биохимические показатели сыворотки крови больных, отражающие функциональное состояние печени. Важным является повышение активности таких сывороточных ферментов, как аланин-аминотрансферазы (АлАТ) и фруктозо-монофосфатальдозазы. Вспомогательное значение, особенно при дифференциации обтурационной желтухи с вирусным гепатитом, имеет коэффициент соотношения трансаминаз — аспартат-аминотрансферазы (АсАТ)/АлАТ. У больных вирусным гепатитом преимущественно повышается активность АлАТ, поэтому этот коэффициент меньше единицы, при механической желтухе — больше единицы. В желтушном периоде к перечисленным симптомам присоединяются желтуха, ахолия (белый кал), в сыворотке крови увеличивается содержание билирубина с преобладанием связанной (прямой) фракции, значительно повышается активность АлАТ. Среди лабораторных показателей, оценивающих белково-синтетическую функцию печени, следует отметить повышение показателя тимоловой пробы, увеличение удельного веса гамма-глобулинов в сыворотке крови. Помимо биохимических тестов, учитываются эпидемиологические данные, контактирование с больными и определенная длительность инкубационного периода. Принимается во внимание, что вирусным гепатитом А болеют чаще дети.

Лабораторная диагностика. Материалом для исследования служат фекалии больных. Для выделения вируса готовят 10–40 % фекальный экстракт, гомогенизированный в фосфатном буфере (рН 7,4). Крупные частицы отбрасывают центрифугированием с небольшой скоростью. Вирус концентрируют, комбинируя дифференциальное центрифугирование с экстракцией органическими растворителями (хлороформом), фильтрацией через агарозу (сефарозу CL-2В) и плотностным центрифугированием в хлориде цезия. Наиболее интенсивное выделе-

ние вируса с фекалиями больных происходит в конце инкубационного периода, в стадии продромы и начале желтухи.

Методы ранней диагностики. Выделение и идентификацию вируса проводят путем заражения фильтратом фекалий чувствительных животных (шимпанзе и обезьян-мармозеток), а также культуры человеческих лимфоцитов, стимулированных фитогемагглютинином.

Гепатит А в острой стадии заболевания диагностируют на основании выявления вируса в фекалиях больных методом иммунной электронной микроскопии. Для этого фекальный экстракт (10–20 %) смешивают с сывороткой реконвалесцента, содержащей анти-ВГА, в соотношении 9:1; инкубируют при температуре 4 °С в течение 16–18 ч или при комнатной температуре в течение 1,5–2 ч или при 37 °С в течение 30–40 мин; осаждают центрифугированием при 10 000 об/мин в течение 30 мин и осадок исследуют под электронным микроскопом. При исследовании приготовленных препаратов в электронном микроскопе с разрешающей способностью менее 10 А (инструментальное увеличение 30 000–50 000) могут выявляться отдельно лежащие частицы ВГА размером 27–29 нм, покрытые «венчиком» антител, и специфические иммунные агрегаты из «полных», «частично полных» или «пустых» частиц ВГА, соединенных друг с другом «мостиками», состоящими из молекул антител.

Вирусный антиген определяют с помощью реакции иммунофлуоресценции в зараженных клеточных культурах (первично-трипсинизированные почки эмбриона человека ПЭЧ, культура перевиваемых клеток почек обезьян и перевиваемая клеточная линия, полученная из печени человека (Chang Liver)). Для этого клетки выращивают на пробирках с помещенными в них покровными стеклами. В 1–2-суточную культуру перевиваемых клеточных линий или 3–5-суточную культуру клеток ПЭЧ вносят инфекционный материал (10–15 % фекальный экстракт, обработанный антибиотиками по 400 ЕД пенициллина и стрептомицина) в объеме 0,2 мл, выдерживают при комнатной температуре 2 ч, после чего культуру ткани отмывают раствором Хэнкса, заливают поддерживающей средой (среда 199 или среда Игла) в объеме 1,5 мл и инкубируют при 37 °С в течение 3–7 сут и более с 1–2-кратной сменой среды в зависимости от состояния клеточного монослоя. По истечении срока инкубации стекла из пробирок извлекают, промывают в изотоническом растворе натрия хлорида, фиксируют в охлажденном ацетоне 10 мин, высушивают и хранят при температуре 4 °С. Окраску препаратов для люминесцентной микроскопии (непрямой метод Кунса) проводят следующим образом: на обезжиренное предметное стекло наносят

каплю сыворотки реконвалесцента гепатита А, в которую помещают покровное стекло с культурой ткани — клетками в сыворотку, выдерживают во влажной камере при температуре 37 °С 30 мин, отмывают в проточной водопроводной воде 40 мин, затем инкубируют с люминесцирующей сывороткой против глобулинов человека 30 мин при температуре 37 °С во влажной камере, отмывают в проточной водопроводной воде 2 ч, заключают в 10 % глицерин на дистиллированной воде и просматривают в люминесцентном микроскопе с водяной иммерсией.

В тканевых культурах, зараженных инфекционным материалом, наблюдают специфическое свечение в цитоплазме. Характер флуоресценции — диффузный и гранулярный. Количество антигенсодержащих клеток, как правило, 10–20 % от общего количества клеток пласта. Антиген располагается в перинуклеазной зоне, занимая всю цитоплазму или ее часть. Наблюдается очаговость поражения, т. е. наряду с флуоресцирующими клетками в этом же препарате имеются участки совершенно интактных клеток, аналогичных контрольным. В контрольных препаратах (незараженная тканевая культура, окрашенная аналогично опытной) должно отсутствовать свечение. Следует предостеречь от ложноположительных результатов, которые могут быть обусловлены неспецифическим свечением клеток пласта. Для доказательства специфичности полученных результатов следует поставить «блокирующий» тест или феномен гашения специфического свечения с меченой ФИТЦ-референс-сывороткой против вируса гепатита А.

Вирусный антиген в фекальном экстракте определяют также с использованием методов РИА (см. с. 203) и ИФА (см. с. 207).

Радиоиммунологический анализ в твердой фазе состоит из трех этапов:

- 1) адсорбция антител на поливиниловую поверхность пробирок;
- 2) связывание антигена из фекального экстракта фиксированными антителами;
- 3) определение адсорбированного антигена с помощью специфических, меченных радиоактивным йодом антител.

Препарат меченых антител должен содержать 1–2 атома радиоактивного йода на молекулу гамма-глобулина (рис. 29).

Серологическая диагностика основана на выявлении в сыворотке крови больного антител к вирусу гепатита А, принадлежащих к классу М (анти-НАV Ig М) в первые 3 нед болезни методами РИФ, ИФА, РИА.

Ретроспективная диагностика гепатита А осуществляется путем исследования парных сывороток крови больного методами РСК, РНГА, РИА. Диагностическое значение имеет четырехкратное и большее повышение титра антител класса Ig G.

Гепатит Е (hepatitis E virus) (син.: *вирусный гепатит ни А ни В с фекально-оральным инфицированием*) — острая инфекционная болезнь, по клиническим проявлениям сходна с гепатитом А, обычно имеет доброкачественное течение, однако у беременных и рожениц характеризуется тяжелым течением с развитием печеночной энцефалопатии и высокой летальностью.

Диагноз устанавливается путем исключения вирусных гепатитов А и В, т. е. у больных нет в крови HBs-Ag, анти-HBc IgM, анти-HAV IgM. Кроме того, следует исключить цитомегаловирусную инфекцию и патологию, вызываемую вирусом Эпштейн — Барр. Все исследования следует проводить с использованием высокочувствительных методов — РИА, ИФА. Для определения антител к возбудителю гепатита Е используют ИЭМ, РИА, ИФА. Учитываются также данные эпидемиологического анамнеза.

Гепатит С (hepatitis C virus) (син.: *вирусный гепатит ни А ни В с парентеральным инфицированием*) — острая инфекционная болезнь, клинически и эпидемиологически сходна с гепатитом В.

Диагноз устанавливается путем исключения вирусных гепатитов А и В на основании отсутствия специфических иммунологических маркеров этих видов гепатита, а также обязательно учитывается эпидемиологический анамнез (гемотрансфузии).

Специфическая диагностика гепатита С основана на выявлении антител в сыворотке крови больного методом ИФА, РИА.

Интересной особенностью диагностической иммуноферментной тест-системы для выявления антител против вируса гепатита С является то, что она была создана раньше, чем найден возбудитель, из нуклеиновой кислоты, выделенной из плазмы крови шимпанзе, инфицированной вирусом гепатита С. С помощью обратной транскриптазы получена ДНК-копия, которая была встроена методом геной инженерии в бактериофаг.



Рис. 29. Радиоиммунный анализ в твердой фазе (схема постановки для определения HBs Ag или HBeAg)

ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ ГЕПАТИТОВ

Этиотропных средств для лечения больных вирусными гепатитом А, гепатитами ни А ни В нет. Больным легкими формами вирусных гепатитов назначают витамины (аскорбиновая кислота, никотиновая кислота, тиамин, рибофлавин, пиридоксин). При среднетяжелых формах показана дезинтоксикационная и инфузионная терапия (5 % раствор глюкозы, раствор Рингера — Локка, гемодез, реополиглюкин), в остром периоде — желчегонные средства (сорбит, магния сульфат). При тяжелых формах больным проводят инфузионную терапию, назначают мочегонные, кортикостероидные препараты. При угрозе или развитии геморрагического синдрома — 1 % раствор викасола, 5 % раствор аминокaproновой кислоты, цельную резус-совместимую одногруппную кровь. При психомоторном возбуждении — дроперидол и фентанил в 5 % растворе глюкозы.

Инактивированная вакцина для профилактики гепатита А приготовлена из культивированного на диплоидных клетках человека МRC5, очищенного и инактивированного формальдегидом вируса гепатита А. Предназначена для вакцинопрофилактики у лиц в возрасте старше 2 лет. Хранение при температуре 2–8 °С. Срок хранения 2 года.

Иммуноглобулин нормальный человеческий (Immunoglobulinum normale humanum) содержит антитела различной специфичности против многих вирусов и бактерий и назначается с целью профилактики ряда инфекционных заболеваний, в т. ч. полиомиелита. Иммуноглобулин применяют в виде 10 или 16 % раствора белка, изготовленного из плацентарной, абортной и венозной крови человека. Препарат представляет собой прозрачный или слегка опалесцирующий раствор. В процессе хранения возможно появление незначительного легко разбивающегося осадка.

Иммуноглобулин хранят в темном месте при температуре 3–10 °С. Срок годности 3 года.

ЗАДАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ЗАНЯТИЮ

1. Определите вирусный антиген (HAVAg) в инфицированных тканевых культурах методом иммунофлуоресценции (имитационная постановка).

2. Ознакомьтесь с диагностическими и профилактическими препаратами:

- ✓ инактивированной вакциной для профилактики гепатита А;
- ✓ иммуноглобулином нормальным человеческим.

3. Оформите протокол занятия.

Тема: ВОЗБУДИТЕЛЬ ГЕПАТИТА В

Цель: Уметь дать характеристику вирусам, возбудителям гепатита В, актуальным методам лабораторной диагностики этой инфекции; знать способы профилактики и препараты для лечения.

Вирус гепатита В относится к семейству гепаднавирусов. Нуклеокапсид вируса покрыт внешней липидно-белковой оболочкой. Размер сферических форм вируса 42–45 нм. Наряду с полноценными вирионами встречаются частицы, состоящие лишь из фрагментов наружной оболочки, которые могут иметь сферическую или нитевидную форму.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Таксономическое положение и морфология вируса гепатита В.
2. Охарактеризовать антигенную структуру возбудителя гепатита В.
3. Методы культивирования и резистентность во внешней среде.
4. Назвать источники заражения и пути передачи гепатита В.
5. Особенности патогенеза и клиника инфекции.
6. Дать характеристику основным методам лабораторной диагностики гепатита В.
7. Мероприятия по общей и специфической профилактике гепатита В.
8. Препараты для лечения и профилактики инфекции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Дикий И.Л., Холупяк И.Ю., Шевелева Н.Е., Стегний М.Ю.* Микробиология.— Х.: Прапор: Изд-во УкрФА, 1999 — С. 387–391.
2. *Елинов Н.П., Заикина Н.А., Соколова И.П.* Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии.— М.: Медицина, 1988.— С. 202.

МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Лабораторная диагностика гепатита В основана на выявлении вирусных антигенов с помощью антител, меченных флуоресцеинами в реакции иммунофлуоресценции. Наиболее часто определяют вирусный HBs Ag (антиген) в сыворотке крови. Обнаружение HBe Ag наблюдается

у больных хроническим гепатитом во время активации процесса, поэтому такие лица представляют большую эпидемическую опасность.

Исторически серологические методы определения HBs Ag в соответствии с их чувствительностью подразделяют на тесты первого, второго и третьего поколения. К тестам первого поколения относят реакцию преципитации в агаровом геле (иммунодиффузия), которая в настоящее время не нашла широкого применения из-за ее низкой чувствительности.

Встречный иммуноэлектрофорез является тестом второго поколения и все еще широко распространен благодаря своей простоте, низкой стоимости, отсутствию необходимости в антисыворотке с высокими титрами антител. Эти тесты не требуют больших расходов, дают быстрый ответ и могут применяться для определения субтипových поверхностных антигенов вируса гепатита В, когда другие методы неприемлемы.

Более чувствительными методами лабораторной диагностики являются тесты третьего поколения: радиоиммунный (РИА), иммуноферментный анализ (ИФА), обратная пассивная гемагглютинация (ОПГА). Наиболее чувствительным из вышеперечисленных методов лабораторной диагностики является РИА, но его постановка требует дорогой аппаратуры и нестабильных при хранении реагентов.

ИФА почти так же чувствителен, как РИА, и обладает преимуществами в использовании стабильных реагентов и недорогого оборудования.

ОПГА — широко распространенный метод лабораторной диагностики гепатита В благодаря простоте постановки, недорогой аппаратуре и реагентам, хотя эта реакция менее чувствительна, чем ИФА. ОПГА — это агглютинация покрытых антителами эритроцитов вирусными антигенами. Для постановки реакции бараньи эритроциты в растворе Alsever отмываются в 0,15 моль/л растворе хлористого натрия и обрабатываются в растворе химически чистого акролеина или глутаральдегида. Эритроцитарная 30 % суспензия может храниться при температуре 4 °С. К этой суспензии добавляют равный объем дубильной кислоты в разведении 1:50 000. После 15-минутной экспозиции при температуре 37 °С эритроциты отмывают и сенсibiliзируют раствором 0,5–1,0 г/л специфического иммуноглобулина, предварительно прогретого в течение 20 мин при 65 °С. Специфичность теста во многом зависит от качества используемого для сенсibiliзации иммуноглобулина. Примесь других белков приводит к появлению неспецифической гемагглютинации.

Эритроциты инкубируют с Ig G в течение 30 мин при температуре 56 °С, а затем отмывают. Осадок клеток ресуспендируют в фосфатном

буферном растворе (рН 7,2) с 10 мл инактивированной лошадиной сыворотки. Эта суспензия сенсibilизированных эритроцитов не теряет активности при температуре 4 °С до полугода.

Тест выполняется на планшетах для микротитрации. В каждую лунку помещают по одной капле антигена, фосфатного буферного раствора и сенсibilизированных эритроцитов. Результат учитывают через 1,5–2 ч.

ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ

Этиотропное лечение гепатита В осуществляют α -интерфероном, ацикловиром, аденин-арабинозидом. Хроническую циркуляцию вируса гепатита В подавляет ламивудин — нуклеозидный аналог, применяемый для лечения ВИЧ-инфицированных. Изучаются возможности комбинированного использования интерферона и ламивудина для лечения гепатита В.

ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ИММУНОПРОФИЛАКТИКИ ГЕПАТИТА В

Людам, находившимся в контакте с больными, носителями или инфицированным материалом, вводят специфический иммуноглобулин (HBs Ig). Для активной иммунизации проводят вакцинацию групп риска, включая новорожденных. Вакцинацию осуществляют убитой вакциной на основе HBs Ag, полученной из плазмы носителей; рекомбинантной вакциной на основе рекомбинантного штамма вируса оспенной вакцины, продуцирующего протективный HBs Ag. Кроме того, применяют рекомбинантные вакцины Recombivax B, Engerix B, полученные на культурах живых клеток. В том случае если ребенок рожден от HBs Ag-положительной матери, ему вводят иммуноглобулин одновременно с первой вакцинацией сразу после рождения.

ЗАДАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ЗАНЯТИЮ

1. Обоснуйте выбор методов лабораторной диагностики гепатита В.
2. Осуществите постановку реакции ОПГА.
3. Ознакомьтесь с препаратами для лечения и профилактики гепатита В.

Тема: ВИРУС ПОЛИОМИЕЛИТА

Цель: Знать методы культивирования и индикации вируса полиомиелита, освоить методы серодиагностики, уметь определять тип вируса полиомиелита методом биологической нейтрализации, изучить препараты для профилактики и лечения полиомиелита.

Возбудитель полиомиелита (*Poliovirus hominis*) относится к семейству Picornaviridae. *Poliovirus hominis* — икосаэдрический РНК-содержащий вирус размером 17–30 нм. Выделяют три типа вируса полиомиелита, которые отличаются антигенной устойчивостью и не обуславливают образования перекрестных антител.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Положение вируса полиомиелита в классификации: группа по типу нуклеиновой кислоты, семейство, род.
2. Структура и биологические свойства вируса полиомиелита.
3. Эпидемиология полиомиелита (источник заражения, механизм и пути передачи инфекции).
4. Патогенез и клиника полиомиелита.
5. Иммуитет при полиомиелите.
6. Лабораторная диагностика полиомиелита: используемый клинический материал; методы культивирования, индикации и типирования возбудителя; серодиагностика.
7. Лечение и профилактика полиомиелита. Препараты для создания активного и пассивного иммунитета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дикий И.Л., Холупяк И.Ю., Шевелева Н.Е., Стегний М.Ю. Микробиология.— Х.: Прапор: Изд-во УкрФА, 1999.— С. 361–366.
2. Елинов Н.П., Заикина Н.А., Соколова И.П. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии.— М.: Медицина, 1988.— С. 190–191, 203.

Полиомиелит (poliomyelitis) (*син.: острый эпидемический передний полиомиелит, детский спинальный паралич, острый атрофический спинальный паралич, болезнь Хайне — Медина*) — острая инфекционная болезнь, которая вызывается вирусом полиомиелита. Характеризуется фекаль-

но-оральным и воздушно-капельным механизмами передачи, имеет типичный продромальный период, после которого развивается поражение нервной системы (серого вещества передних рогов спинного мозга) преимущественно в виде проксимальных и асимметричных вялых периферических парезов и параличей.

Клиническая диагностика. Опорными симптомами клинической диагностики полиомиелита в препаралитической стадии (на фоне незначительных катаральных явлений, иногда диареи) являются значительный болевой синдром, гиперестезия, повышенная потливость, снижение и асимметрия рефлексов, фибриллярные подергивания отдельных групп мышц, клеточно-белковая диссоциация в цереброспинальной жидкости. В паралитической стадии к этим симптомам присоединяются периферические парезы и параличи разных групп мышц, характеризующиеся асимметрией, сохранением чувствительности, поражением дыхательных мышц.

Лабораторная диагностика. Материалом для выделения вирусов служат фекалии больных, взятые в первую и вторую неделю заболевания, и носоглоточное отделяемое, полученное в первые 3 дня болезни. Для повышения выделяемости вирусов исследуют 2–3 пробы кала, взятые ежедневно или с интервалом 1–2 дня. Кал собирают в количестве 1–2 г в банку и закрывают резиновой пробкой. При невозможности получить кал в прямую кишку вводят стерильный тампон, увлажненный физиологическим раствором, который затем погружают в пробирку, содержащую 5 мл солевого раствора или бульона. Для получения носоглоточного отделяемого сухими тампонами берут мазки с задней стенки глотки и миндалин и слизь из носа. Все тампоны помещают в одну пробирку с 5 мл солевого раствора. При серозном менингите исследуют также спинномозговую жидкость в первые дни болезни.

В летальных случаях исследованию подлежат кусочки спинного, продолговатого и головного мозга, миндалин, кишечника и содержимое прямой кишки. Секционный материал берут с помощью прокипяченных или прокаленных инструментов в стерильные банки, содержащие 50 % раствор химически чистого глицерина на физиологическом растворе. Вначале берут кусочки головного (мозжечок, затылочная, теменная, височная доли) и продолговатого мозга. Спинной мозг берут из трех отделов: шейного, грудного и поясничного. Затем берут кусочки миндалин, мышц, лимфатических узлов и других органов. В последнюю очередь забирают кусочки стенки кишечника и его содержимое. Кусочки органов могут сохраняться в глицерине при температуре 4 °С в течение нескольких недель.

Необходимо помнить, что в летальных случаях при полиомиелите вирус удается выделить из мозга только тогда, когда смерть наступает в течение первой недели от начала заболевания. Более регулярно и в более поздние сроки он выделяется из содержимого стенки кишечника, миндалин и лимфатических узлов.

Полученный от больных или погибших инфекционный материал подвергают обработке. Кал в банке заливают девятикратным объемом физиологического раствора или дистиллированной воды. Банку закрывают в салфетку, смоченную дезинфицирующим раствором (3 % раствором хлорамина или 5 % раствором лизола) и тщательно встряхивают до получения гомогенной взвеси. Полученную суспензию центрифугируют при 2000 об/мин в течение 30 мин. К надосадочной жидкости добавляют антибиотики (по 1000 ЕД пенициллина и 500 ЕД стрептомицина на 1 мл), выдерживают в течение 1–2 ч при комнатной температуре и замораживают на сутки. После оттаивания суспензии контролируют на стерильность и хранят в замороженном состоянии до использования для выделения вируса.

Кусочки органов и тканей отмывают от глицерина солевым раствором, гомогенизируют в ступке со стерильным кварцевым песком и готовят 10 % суспензию на физиологическом растворе, которую центрифугируют при 2000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость обрабатывают антибиотиками, концентрация которых определяется степенью загрязнения материала, выдерживают в течение 30 мин при комнатной температуре, проверяют на стерильность и используют для выделения вируса.

Если инфекционный материал после обработки антибиотиками оказывается нестерильным, его можно обработать эфиром, который добавляют в количестве 1/4–1/5 объема взвеси.

Методы ранней диагностики. Для выделения вируса в культурах клеток обработанный инфекционный материал вносят в 4 пробирки: в две с культурой клеток почек обезьян (или фибробластов эмбриона человека) и две с культурой амниотических клеток человека (или клеток HeLa). Зараженные культуры инкубируют при 35 °С. Энцефалитические вирусы вызывают в культурах клеток круглоклеточную дегенерацию, интенсивность которой зависит от инокулированной дозы вируса, чувствительности к нему культуры клеток. При развитии полной специфической дегенерации клеток через 2–7 дней после заражения культуральную жидкость отсасывают и используют для типирования выделенного цитопатогенного агента. В случае позднего (6–8 дней после заражения) развития слабых цитопатических изменений проводят 1–2 последующих пассажа вируса, а затем типировать его.

При отсутствии специфической дегенерации клеток в течение 10–12 дней проводят последующие пассажи. Для второго посева используют культуральную жидкость, взятую из первого пассажа, и заражают новую культуру клеток. При отсутствии дегенерации клеток во втором пассаже результат считают отрицательным.

Типирование выделенного вируса проводят с помощью реакции нейтрализации в культурах клеток того типа, где был выделен вирус, или в иной, более доступной культуре после предварительной адаптации к ней штамма. Перед постановкой реакции нейтрализации выделенный вирус титруют по методу Рида и Менча. В реакции нейтрализации используют 100 ЦПД₅₀ выделенного вируса. Реакцию нейтрализации проводят по общепринятой методике (см. с. 222).

Методы ретроспективной диагностики. Исследуют парные сыворотки переболевших в реакции нейтрализации с эталонными штаммами вирусов. Результаты учитывают по цитопатическому эффекту или по цветной пробе. В реакции используют 100 ЦПД₅₀ каждого эталонного штамма вируса и двукратно возрастающие разведения парных сывороток больного. При выявлении четырехкратного и большего увеличения титра антител к одному из эталонных штаммов во второй сыворотке по сравнению с первой считают, что инфицирование было обусловлено вирусом этого серологического типа.

Для серологической диагностики полиомиелита используют и РСК. В реакции исследуют парные сыворотки больного с эталонными штаммами 3 типов вируса полиомиелита, так как они не имеют общего комплементсвязывающего антигена. В качестве антигена применяют экстракты зараженных эталонными штаммами вирусов чувствительных культур клеток, подвергнутых повторному замораживанию и оттаиванию после наступления полной специфической дегенерации клеток, или стандартные комплементсвязывающие антигены. В последнее время более широко используется применение диагностикумов на основе ИФА и моноклональных антител.

ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ ПОЛИОМИЕЛИТА

Этиотропных средств для лечения больных полиомиелитом нет. Симптоматическая терапия включает использование в препаралитической и паралитической стадиях анальгетиков, седативных средств, детоксикационных методов. Назначают также гипосенсибилизирующие, противовоспалительные, антигистаминные препараты, в тяжелых случаях — глюкокортикостероиды. В стадии восстановления назначают

холиносенсибилизирующие средства — прозерин, галантамин и др. Рекомендуется применение аминокислот — глютаминовой кислоты, лейцина, сульфатирозина.

Для специфической иммунопрофилактики используются живая (аттенуированная) (вакцина Сэбина) и убитая (вакцина Солка) вирусные вакцины. Сравнительная характеристика вакцин Солка и Сэбина представлена в табл. 37.

Таблица 37

Сравнительная характеристика вакцин Солка и Сэбина

Вакцина Сэбина		Вакцина Солка	
достоинства	недостатки	достоинства	недостатки
<ul style="list-style-type: none"> — сравнительно дешевая, вводится перорально; — вызывает развитие местной (синтез IgA) и системной невосприимчивости; — способствует формированию иммунной прослойки в популяции 	<ul style="list-style-type: none"> — вакцинный штамм способен мутировать и резко увеличивать вирулентные свойства; — менее надежна в тропических странах 	<ul style="list-style-type: none"> — лишена возможности мутаций вакцинного штамма, способных приводить к увеличению вирулентности 	<ul style="list-style-type: none"> — вводится парентерально, не вызывает развития локальных иммунных реакций в лимфоидной ткани кишечника; — отдельные партии могут различаться по иммуногенным свойствам; — стойкая невосприимчивость развивается лишь после четырех инъекций; — изготовление требует постоянного контроля за эффективностью инактивации вируса

В нашей стране для иммунизации используют живую вакцину.

Полиомиелитная пероральная живая вакцина — вакцина Сэбина (*Vaccinum poliomyelitis per orale typus I, II, III*) представляет собой содержащую вирус жидкость, полученную из первичных культур почечных клеток африканских зеленых мартышек. Действующим началом являются аттенуированные штаммы вируса полиомиелита трех иммунологических типов — I, II, III. Механизм действия вакцины состоит в интерференции вирусов (вакцинный штамм вируса, заселяя клетки кишечника, блокирует репродукцию природного штамма), а также в образовании вируснейтрализующих антител.

С целью повышения термоустойчивости к вакцине добавляют раствор химически чистого хлорида магния. Вакцину выпускают в жидком

виде и в форме конфет-драже. Она может быть изготовлена в виде моновакцины и тривакцины, т. е. смеси вирусов трех типов. Полиомиелитная жидкая вакцина имеет красновато-оранжевый цвет. Драже выпускают разного цвета: розового (I тип), сиреневого (II тип), голубого (III тип) и белого (смесь трех типов).

Транспортировать вакцину необходимо в изотермических ящиках при температуре не выше 2–8 °С. Хранить жидкую полиомиелитную вакцину при постоянной температуре не ниже –20 °С можно в течение 2 лет, при 4–8 °С — до 6 мес. Хранение антиполиодраже при температуре от –15 до –20 °С возможно до 6 мес, при 4–8 °С до 90 дней.

Иммуноглобулин нормальный человеческий (Immunoglobulinum normale humanum) (см. с. 412).

ЗАДАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ЗАНЯТИЮ

1. Определите тип вируса полиомиелита методом биологической нейтрализации (цветной пробы) (имитационная постановка).

Цветная проба (колориметрическая реакция нейтрализации). В результате жизнедеятельности клеток в питательной среде, содержащей индикатор (фенол-рот), накапливаются кислые продукты обмена, которые приводят к соответствующему изменению рН среды (цвет ее становится оранжево-желтым). При заражении культуры клеток вирусом полиомиелита подавляется метаболизм клеток и рН среды не изменяется (среда остается малиново-красной).

Методика. В 1, 2, 3, 8 пробирки внесите по 0,25 мл рабочего разведения вируса полиомиелита (100 ЦПД₅₀); в 1–6 пробирки — иммунные сыворотки I, II, III типов. Смесь выдержите при комнатной температуре 60 мин. Добавьте в каждую пробирку по 0,25 мл клеточной суспензии, а в 4–8 пробирки и питательную среду. Закройте их резиновыми пробками или залейте стерильным вазелиновым маслом. Пробирки поместите в термостат на 6–8 дней при температуре 37 °С. Результаты реакции учтите визуально (по изменению цвета среды) или колориметрически: рН 7,4 и выше указывает на репродукцию вируса, рН 7,2 и ниже — на нейтрализацию вируса антителами. Результаты реакции нейтрализации внесите в табл. 38.

2. Ознакомьтесь с диагностическими и профилактическими препаратами:

- ✓ поливалентными и типоспецифическими полиомиелитными сыворотками I, II, III типов для типирования вирусов;
- ✓ иммуноглобулином нормальным человеческим;

Тема: ВИРУС ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА

Цель: Изучить наиболее объективные методы диагностики ВИЧ-инфекции, основные принципы лечения и профилактики.

Вирус иммунодефицита человека относится к семейству ретровирусов. Название семейства отражает наличие у вируса фермента ревертазы (обратной транскриптазы). Существует несколько разновидностей ВИЧ (см. цв. вкл. VI). Возбудитель СПИДа характеризуется большой генетической вариабельностью, однако у всех вариантов ВИЧ имеются общие антигенные детерминанты.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Теории происхождения вируса иммунодефицита человека.
2. Морфология, особенности антигенной структуры ВИЧ.
3. Эпидемиология ВИЧ-инфекции.
4. Охарактеризуйте заболеваемость ВИЧ-инфекцией в мире.
5. Патогенез заболевания, укажите клетки организма, наиболее чувствительные к ВИЧ.
6. Клинические проявления ВИЧ-инфекции.
7. Дайте характеристику наиболее объективных методов ВИЧ-инфекции.
8. Назовите основные принципы лечения больных СПИДом. Перечислите основные химиопрепараты для лечения.
9. Мероприятия по общей профилактике ВИЧ-инфекции.
10. Иммунопрофилактика СПИДа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дикий И.Л., Холуяк И.Ю., Шевелева Н.Е., Стегний М.Ю. Микробиология.— Х.: Прапор: Изд-во УкрФА, 1999.— С. 375–387.
2. Елинов Н.П., Заикина Н.А., Соколова И.П. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии.— М.: Медицина, 1988.— С. 196–200.

МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

В настоящее время наиболее чувствительными и специфичными тестами для лабораторной диагностики ВИЧ-инфекции признаны метод иммуноферментного анализа (ИФА) и вестернблота.

ИФА позволяет выявить антитела к вирусу иммунодефицита. Специфические антитела к ВИЧ обнаруживают через 2–6 нед после появления первых симптомов заболевания. Это антитела к гр 160, гр 120, р 24, гр 41 или их комбинации. Через 4–8 мес после заражения титр антител достигает максимума.

Метод иммуноферментного анализа (ИФА)

ИФА — высокочувствительный метод выявления антител к ВИЧ в сыворотке крови больного или носителя. Антитела появляются уже через 2 нед — 3 мес, в ряде случаев позже, через 6–9 мес и даже через год после заражения. Принцип метода заключается в образовании комплекса антиген — антитело при наличии антител к ВИЧ-инфекции у обследуемого.

В постановке реакции используются антиген вируса, антитело, меченное ферментом, индикаторная система (перекись водорода и ортофенилендиамин). Если в сыворотке человека имеются антитела к ВИЧ, то образуется комплекс антиген + антитело + АНТИ-антитело, меченное ферментом, + перекись водорода + ортофенилендиамин.

Под воздействием фермента происходит разложение перекиси водорода на воду и атомарный кислород. Атомарный кислород в свою очередь воздействует на ортофенилендиамин, и происходит изменение цвета комплекса.

С помощью аппаратов (так называемых ридеров) производят учет. Изменение цвета при проведении опыта говорит о наличии антител к ВИЧ. Метод ИФА является предварительным. Для получения окончательного результата необходимо положительную сыворотку изучить с помощью подтверждающих методов: метода иммуноблотинга или метода иммунофлуоресценции.

Иммуноблотинг

Иммуноблотинг — подтверждающий тест. Действующим началом этой тест-системы являются белки (антигены ВИЧ), предварительно фракционированные электрофорезом в полиакриламидном геле и в дальнейшем иммобилизованные на поверхности нитроцеллюлозной мембраны. При наличии в исследуемой сыворотке крови специфических антител к индивидуальным белкам ВИЧ образуется видимый преципитат. Индикацию образовавшихся комплексов проводят с использованием иммуноферментного или радиоиммунологического анализа. Метод иммуноблотинга выявляет антитела к одному или нескольким оболочечным или сердцевинным белкам ВИЧ. Чаще стараются исполь-

зовать в иммуноферментном анализе наиболее устойчивые и специфические белки оболочки (gp 41) и сердцевины (p 24) вируса.

Метод РИФ (реакция иммунофлуоресценции)

С помощью РИФ обнаруживают антигены в лейкоцитах крови. При использовании моноклональных антител в РИФ выявляются преранние и ранние белки в ядре зараженной клетки, говорящие об острой инфекции. Их можно наблюдать через 48–96 ч после инфицирования. РИФ используют в лабораторной диагностике ВИЧ-инфекции, цитомегаловирусной инфекции.

Несмотря на то что этот метод специфичен, он низкочувствителен. При невозможности применения методов определения антигенов или выявления вируса, а также в дополнение к ним значительная роль в диагностике отводится серологическим методам.

Из серологических методов используют РИФ и иммуноферментный анализ (ИФА) для определения антител к антигену p 25.

ПОСТАНОВКА ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА

Для постановки реакции из набора берут полистироловый планшет, на поверхности лунок которого уже адсорбирован рекомбинантный антиген ВИЧ.

Затем в 4 лунки (A1; B1; C1; D1) вертикального ряда планшета вносят по 0,1 мл разведенной 1:100 положительной контрольной сыворотки.

В следующие 4 лунки (E1; F1; I1; H1) вносят по 0,1 мл разведенной 1:100 отрицательной контрольной сыворотки.

В остальные лунки вносят по 0,1 мл разведенных 1:100 исследуемых сывороток. От каждого человека в 4 лунки соответственного вертикального ряда от 1-го A2; B2; C2; D2; от 2-го E2; F2; I2; H2 и т. д.

Планшеты ставят в термостат и инкубируют 1 ч при 37 °С.

После инкубации содержимое из лунок удаляют сильным встряхиванием и промывают трехкратно фосфатно-солевым буферным раствором.

Затем вносят по 0,1 мл конъюгата антивидовых иммуноглобулинов, меченных пероксидазой. Выдерживают в течение 1 ч или 30 мин при 37 °С. Планшет опять трехкратно промывают фосфатным буферным раствором. Вносят субстратную смесь ОФД — ортофенилендиамин 0,1 мл с 0,1 мл H_2O_2 , оставляют при 20 °С в темноте. Производят учет реакции по изменению окраски ортофенилендиамина в желтый

цвет в случае, если исследуемая сыворотка содержит антитела к рекомбинантному антигену ВИЧ.

После 2 и 3 стадии промывка фосфатным буфером.

Имуноферментный анализ (ИФА) основан на использовании в качестве метки антител ферментов, способных разлагать субстрат с образованием окрашенных продуктов. Конъюгированные с ферментом антитела сохраняют способность соединяться с антигенами. Количество образовавшихся комплексов антиген — антитело — фермент соответствует интенсивности окрашивания субстрата.

В качестве ферментов чаще всего используют пероксидазу, щелочную фосфатазу, а в качестве субстрата для пероксидазы — 5-аминосалициловую кислоту, ортофенилендиамин и другие вещества.

В процессе инкубации в присутствии пероксидазы ортофенилендиамин окрашивается в желтый цвет, а аминосалициловая кислота — в коричневый. Для остановки реакции расщепления субстрата в лунку добавляют по 0,1 мл 2М H_2SO_4 (или 1 М NaOH) (рис. 30).

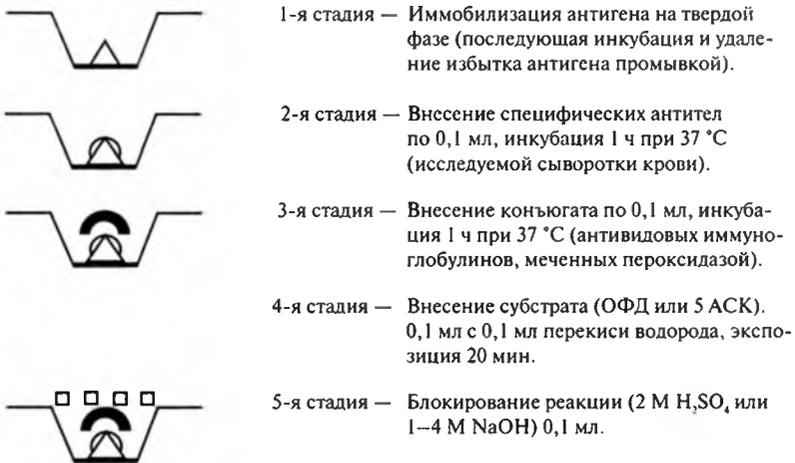


Рис. 30. Схема твердофазного иммуноферментного метода

Результаты реакции учитывают визуально или на спектрофотометре. При визуальном учете выявляют то наибольшее разведение исследуемого материала, в котором окраска интенсивнее, чем в контроле (бычьим сывороточным альбумином).

Вестернблот (иммуноблот см. разд. «Реакции иммунитета») — тест применяют для обнаружения наличия специфических антител

в сыворотке. Этот тест является подтверждающим и используется, как правило, после обнаружения антител к ВИЧ в иммуноферментной реакции.

Результаты вестернблота рассматривают как положительные после обнаружения антител к р 24, р 31, а также к гр 41 либо к гр 120.

На поздних стадиях ВИЧ-инфекции титр антител к вирусу иммунодефицита снижается, и в этих случаях выявляют р 24 антиген в сыворотке крови. У детей в возрасте до 1 года в сыворотке крови могут присутствовать материнские антитела, поэтому при лабораторной диагностике используют ИФА для выявления антигена. В этом случае на твердой фазе сорбируют известные антитела и добавляют сыворотку, содержащую антиген (см. разд. «Реакции иммунитета»).

Для специфической диагностики ВИЧ-инфекции используют также определение вирусной РНК (вирусной нагрузки) методом полимеразной цепной реакции.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Высокочувствительным методом является полимеразная цепная реакция (ПЦР) — выявление вирусной РНК.

В ПЦР производят увеличение количества копий детерминируемого участка генома в миллионы раз с использованием фермента ДНК-полимеразы.

ПЦР — это метод амплификации *in vitro*, с помощью которого в течение нескольких часов можно выделить и размножить определенную последовательность РНК в количестве, превышающем исходную в 10^8 раз. Предел чувствительности ПЦР-диагностикума инфекционных заболеваний (при условии использования 100 мл клинического образца) 100–1000 возбудителей в 1 мл.

Материал, используемый для исследования: слюна, моча, спинномозговая жидкость, сперма, слезы, молоко, кровь.

Преимущества ПЦР:

1) метод обладает высокой чувствительностью (до 1–5 копий возбудителя в пробе) и специфичностью;

2) проведение анализа возможно в минимальном объеме пробы: обычно несколько микролитров;

3) ПЦР-диагностикумы дают возможность избежать проблем, связанных с перекрестно реагирующими «антигенами»;

4) возможен анализ серонегативных пациентов на самых ранних стадиях инфекционного процесса, когда лечение наиболее эффективно;

5) метод позволяет поставить надежный диагноз в течение рабочего дня, т. е. за 6–8 ч;

6) возможна одновременная диагностика нескольких возбудителей заболеваний в одной пробе;

7) стоимость одного анализа при использовании отечественных приборов и реактивов сопоставима со стоимостью одного анализа иммуноферментным методом.

Метод проточной цитометрии

Метод проточной цитометрии позволяет проводить комплексные исследования в таких областях, как иммунология, онкология, микробиология, трансплантология, общая гематология, цитология и др.

Одним из наиболее перспективных и значимых является применение цитометрии в потоке для характеристики иммунологического статуса. Использование проточного цитофлуориметра позволяет достоверно дифференцировать популяции лейкоцитов, определять субпопуляционный состав лимфоцитов, стадии дифференцировки и активации клеток, оценивать их функциональную активность.

Определение субпопуляций лимфоцитов и выявление фенотипических маркеров, характеризующих изменения функционального состояния клеток, по рекомендациям экспертов ВОЗ, имеет диагностическое и прогностическое значение в трех случаях:

- ✓ при первичных иммунодефицитных состояниях;
- ✓ при ВИЧ-инфекции;
- ✓ при лимфопролиферативных заболеваниях.

Минимальная иммунофенотипическая панель для анализа субпопуляционного состава лимфоцитов включает: определение количества CD3+ Т-лимфоцитов, CD4+ Т-лимфоцитов, CD8+ Т-лимфоцитов, общего количества В-лимфоцитов (CD19+), степени активизации В-клеток (CD23+), а также содержание NK (клеток-убийц CD16+, CD56+).

Определение лейкоцитов осуществляется с использованием конъюгированных с флуорохромами моноклональных антител к поверхностным лейкоцитарным рецепторам CD45+, точное выделение популяции моноцитов производится с помощью моноклональных антител к CD14+-рецептору.

Проточный цитометр для целей иммунофенотипирования дает возможность подсчета абсолютного числа клеток. Прибор обеспечивает высокую производительность, точность и воспроизводимость результатов. Принципы работы: прибором анализируются клетки в су-

пензии в свободной структуре жидкости, которую пересекает луч света. Источником света является дуговая лампа нового поколения, обеспечивающая широкий диапазон длин волн возбуждения (350–600 нм), что позволяет работать практически с любыми флуоресцентными красителями.

При прохождении клеткой фокуса объектива измеряются характеристики рассеяния света под различными углами, а также интенсивность флуоресценции на двух или трех каналах регистрации. Последующая корреляция спектральных характеристик позволяет определить цитоморфологическую принадлежность клетки, оценить ее физиологическое состояние, причем за короткое время (до 10 тыс. клеток в сек).

ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ

Для этиотропного лечения ВИЧ-инфекции применяются препараты, ингибирующие обратную транскриптазу (зидовудин-ZDV, тимозид, ретровир, азидотимидин-AZT); ингибиторы протеаз (саквиповир, ритонавир, индинавир); ингибиторы сборки и созревания дочерних популяций (α-интерферон); препараты, взаимодействующие с регуляторными белками ВИЧ (проходят клинические испытания соединения, инактивирующие продукты генов *tat* и *rev*).

Функция фермента обратной транскриптазы заключается в транскрипции вирусной РНК в провирусную ДНК с последующей интеграцией провирусной ДНК с ДНК клетки хозяина. Кроме перечисленных нуклеозидных атомов обратной транскриптазы (азидотимидин и др.), применяют нуклеозидные — невирапин, делавирдин, ловирдин, ламивудин.

Механизм подавления аналогами нуклеозидов репликации вируса состоит в невозможности присоединения обратной транскриптазой других нуклеозидов к аналогам нуклеозидов, и процесс сборки нитей ДНК на этом прекращается.

Развитие резистентности к зидовудину обычно регистрируется через 6 мес после начала приема, устойчивость связана с мутацией в гене обратной транскриптазы.

Комбинация двух или нескольких препаратов, ингибирующих обратную транскриптазу вируса, может уменьшить вероятность появления устойчивых штаммов вируса. Практика показывает, что комбинированная терапия двумя ингибиторами обратной транскриптазы и ингибитором протеазы часто ведет к клиническому улучшению и снижению вирусемии у больных СПИДом. Особенно эффективно сочетание: азидотимидин + индинавир + ламивудин.

Важным звеном лечения СПИДа является своевременное лечение оппортунистических инфекций, вызванных бактериями, вирусами, простейшими, грибами, соответственно антибактериальными, противовирусными, протозойными и противогрибковыми препаратами.

Приоритетными направлениями профилактики ВИЧ-инфекции являются:

- ✓ предупреждение передачи вируса при медицинских и косметических манипуляциях;
- ✓ изменение человеческого поведения в обществе в целом и в группах риска в частности.

Попытки разработать вакцину против ВИЧ предпринимаются в течение длительного времени, однако надежной и безопасной вакцины не существует до сих пор.

Из рекомбинантных штаммов, лишенных генов, ответственных за развитие полноценной инфекции, изготавливают живые вакцины против вируса иммунодефицита обезьян.

Вакцины из убитых вирусов в опытах на животных не формируют защитного иммунитета, но препятствуют появлению клинических признаков заболевания.

Рекомбинантные вирусные вакцины изготавливают на основе включения генов гликопротеинов ВИЧ в геномы различных вирусов. Такие вакцины вызывают образование нейтрализующих антител у животных. Заметная эффективность рекомбинантных вакцин у человека не установлена.

Компонентные вакцины получают из изолированного gp 120, полимеризованного gp 120, или белков из gp 120, представляющих собой консервативные области, например, СД4-связывающий участок.

Трудности в создании эффективных вакцин обусловлены отсутствием животных, у которых ВИЧ-инфекция протекала бы так же, как у человека.

Отсутствие защитного эффекта антител объясняется в основном вариабельностью gp 120. ВИЧ может мутировать в организме инфицированного человека. Даже одна аминокислотная замена в участке gp 120 может привести вирус в состояние устойчивости к антителам, которые образовались в процессе заболевания.

Если говорить о безопасности разрабатываемых вакцин, существует вероятность трансформации рекомбинантного дефектного штамма ВИЧ в инфекционную форму, а иммунный ответ, направленный против участков gp 120, может реализоваться в отношении неинфицированных СД4+-клеток, связывающих растворимый gp 120.

Рекомбинантные вакцины, в состав которых входят вакцинирующие вирусы, могут вызвать клинические симптомы у вирусоносителей с явлениями иммунодефицита.

ЗАДАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ЗАНЯТИЮ

1. Обоснуйте выбор методов лабораторной диагностики для взрослого человека без клинических симптомов СПИДа и ребенка в возрасте 6 мес, рожденного от ВИЧ-инфицированной матери.
2. Осуществите постановку иммуноферментной реакции для выявления антител к вирусу иммунодефицита человека.
3. Обоснуйте выбор препаратов для лечения ВИЧ-инфекции.

Тема: ВОЗБУДИТЕЛЬ БЕШЕНСТВА

Цель: Изучить актуальные методы лабораторной диагностики, лечения и профилактики бешенства.

Вирус бешенства относится к роду *Lyssavirus* (от греч. *lyssa* — водобоязнь), семейству рабдовирусов (от греч. *rhabdos* — прут) (см. цв. вкл. XXXIX). Для вируса характерна адаптационная изменчивость, которую использовал Л. Пастер для получения вакцины против бешенства. Он пассировал уличный вирус бешенства на кроликах интрацеребрально. При длительном пассировании вирус потерял патогенные свойства для собаки и человека. Поэтому фиксированный вирус после дополнительной обработки высушиванием мозга кролика использовали для вакцинации.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. К какому роду, семейству относится возбудитель бешенства.
2. Морфология и ультраструктура вируса, антигенная структура.
3. Резистентность во внешней среде.
4. Методы культивирования возбудителя.
5. Эпидемиология бешенства: резервуар вируса в природе, источники и механизмы заражения.
6. Патогенез и клиника болезни.
7. Методы лабораторной диагностики.
8. Лечение и специфическая профилактика бешенства.
9. Особенности общей профилактики бешенства.
10. Сравнительная характеристика антирабических вакцин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дикий И.Л., Холуяк И.Ю., Шевелева Н.Е., Стегний М.Ю. Микробиология.— Х.: Прапор: Изд-во УкрФА, 1999.— С. 369–375.
2. Елинов Н.П., Заикина Н.А., Соколова И.П. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии.— М.: Медицина, 1988.— С. 191–192, 203.

МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Выбор методов прижизненной диагностики бешенства у человека зависит от стадии болезни. Вирусный антиген выявляют с помощью ме-

тода флуоресцирующих антител (МФА) в отпечатках роговицы глаза или биоптатах кожи в первые дни болезни. Однако чувствительность метода флуоресцирующих антител на ранних стадиях заболевания меньше и отрицательный результат реакции не исключает возможного заражения. Биоптаты кожи обычно берут в задней части шеи — они должны содержать волосяные мешочки с периферийными окончаниями нервов. Необходимо отметить, что чувствительность МФА является более высокой при исследовании биоптатов кожи, чем отпечатков роговицы.

Вирус бешенства можно выделить в культуре клеток из слюны и спинномозговой жидкости (СМЖ). Однако вирус может отсутствовать в слюне и спинномозговой жидкости даже на поздних стадиях болезни.

На 7–10 день болезни в сыворотке крови и спинномозговой жидкости невакцинированных больных могут появляться вируснейтрализующие антитела, титр которых может быть определен в реакции нейтрализации вируса сывороткой на мышцах либо в тесте быстрого ингибирования очага флуоресценции (см. разд. «Реакции иммунитета»).

Для определения титра вируснейтрализующих антител в сыворотке некоторых животных и человека можно применять иммуноферментный метод с иммобилизованными ферментами (ELISA). Этот тест можно провести в течение нескольких часов. Однако тест обладает недостаточной чувствительностью, так как, кроме вируснейтрализующих, в нем определяются и антитела других типов.

Для *постморальной диагностики бешенства* у людей и животных также применяют метод флуоресцирующих антител, в основе которого лежит микроскопическое исследование в ультрафиолетовых лучах отпечатков, мазков и замороженных срезов тканей, обработанных антирабической сывороткой или глобулином, конъюгированными с изотиоцианатом флуоресцеина. При этом нормальная мозговая ткань флуоресцирует тусклым желтоватым цветом. Антиген вируса бешенства выявляется в препаратах в виде ярких желтовато-зеленых или зеленых гранул различной формы и величины. С целью повышения чувствительности теста исследуют двусторонние отпечатки (или мазки) пробаммонового рога и ствола мозга.

Тельца Бабеша–Негри обнаруживают в мозговой ткани у 90–95 % погибших от бешенства собак и 70 % людей. Максимальное количество телец у собак и человека при буйной форме бешенства и типичном течении находят в клетках аммонового рога, при паралитической форме — в продолговатом и спинном мозге. Обнаружение телец Бабеша — Негри

имеет абсолютное диагностическое значение. В настоящее время уже редко применяют методы окраски мазков-отпечатков и гистологических срезов в связи с широким применением МФА. В мазках, окрашенных по Муромцеву, фон препарата и цитоплазма сохранившихся нервных клеток бледно-голубого цвета, тельца Бабеша — Негри резко очерчены, фиолетового цвета с розовым оттенком. По Селлеру тельца Бабеша — Негри окрашиваются в пурпурно-красный цвет, цитоплазма нервных клеток — синяя. В гистологических срезах, окрашенных по Туревичу, цитоплазма клеток серовато-желтая, тельца Бабеша — Негри рубинового цвета с четко выраженной зернистостью ядра, а ядрышки черные. Чаще всего встречаются тельца круглой или овальной формы диаметром от 4 до 10 мкм. Они окружены оболочкой и содержат от 1 до 15 зернышек различной величины. Наиболее точным является метод гистологических срезов, при котором выявляется даже небольшое количество телец. Менее точным, но наиболее простым, является метод мазков и отпечатков из нефиксированной мозговой ткани, позволяющий получить ответ в течение 1–2 ч.

Разработан вариант быстрой иммуноферментной диагностики бешенства (ELISA) для выявления антигена нуклеокапсида вируса бешенства в ткани головного мозга. Поскольку с помощью специального набора для диагностики антиген можно увидеть невооруженным глазом, тест можно проводить в полевых условиях. Данный тест применяют и для исследования частично разложившихся тканей, но он не пригоден для исследования фиксированных формалином проб.

Для более детальной характеристики вирусных изолятов используют заражение клеток мышинной нейробластомы (NaC 1300) диким вирусом бешенства. В данном случае результат исследований наблюдают в течение двух суток. По-прежнему важным является для лабораторной диагностики бешенства заражение мышей-сосунков в возрасте двух дней. Период наблюдения сокращают за счет постановки МФА головного мозга мышей, забитых через 3–4 дня после заражения.

Для сравнительного изучения штаммов вирусов, выделенных от людей, домашних и диких животных Европы, Азии, Америки, используют антирабические моноклональные антитела. Эти исследования показали, что штаммы вируса бешенства, выделенные в определенном географическом районе или от разных видов животных, характеризуются уникальным типом реактивности, связанным с нуклеокапсидным и гликопротеиновым компонентами вириона. Между штаммами вируса, выделенными от плотоядных животных и летучих мышей, отмечаются резкие различия.

ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЛЮДЕЙ С ПОДТВЕРЖДЕННЫМ ДИАГНОЗОМ БЕШЕНСТВА

При случаях клинически выраженного бешенства вводят, хотя и без видимого эффекта, видарабин, α -интерферон и антирабический иммуноглобулин, антитимоцитарный глобулин, большие дозы стероидов, рибавирин, антителосвязывающие фрагменты антирабического иммуноглобулина G, внутрикожно вводят во многие участки культуральную инактивированную вакцину, а также симптоматические средства для уменьшения страданий больного, снижения возбудимости нервной системы и улучшения сердечно-сосудистой деятельности.

Несмотря на исключительно неблагоприятный прогноз при бешенстве у человека, ВОЗ считает необходимым, чтобы соответствующие реанимационные центры продолжали попытки лечения таких больных с использованием новейших достижений науки.

ВАКЦИНЫ ДЛЯ ИММУНИЗАЦИИ ЧЕЛОВЕКА

Комитет экспертов ВОЗ рекомендует полную замену вакцин, получаемых из ткани мозга животных, на инактивированные вакцины, получаемые на клеточных культурах, для иммунизации людей.

ВАКЦИНЫ ДЛЯ ИММУНИЗАЦИИ ЖИВОТНЫХ

1. Приготавливаются из нервной ткани овец, кроликов, новорожденных мышей и крыс. Вакцинный вирус инактивируется фенолом, эфиром или формалином.

2. Приготавливаются на культуре первичных или перевиваемых клеток. Это модифицированные вакцины, включающие живой вирус (MLV), и инактивированные вакцины, которые приобретают все более широкое применение, так как снижают риск поствакцинальных осложнений.

ЗАДАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ЗАНЯТИЮ

1. Составить схему лабораторной диагностики бешенства.
2. Обосновать выбор профилактических и лечебных препаратов, применяемых при этом заболевании.

Тема: ВОЗБУДИТЕЛИ МЕДЛЕННЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Цель: Уметь охарактеризовать возбудителей медленных вирусных инфекций, особенности эпидемиологии и патогенеза прионных заболеваний.

Медленные вирусные инфекции — категория болезней, характеризующихся необычно длительным инкубационным периодом, очень медленно прогрессирующим развитием специфического симптомокомплекса, вплоть до смертельного исхода. К этой категории болезней относятся вирусные инфекции (болезнь Борна, болезнь Висна и др.) и заболевания прионной этиологии (скрепи у овец и коз; Куру, болезнь Крейтцфельда — Якоба, синдром Герстмана — Штреуслера и др. у человека).

Прион (акроним proteinaceous infectious particle) — инфекционный безнуклеиновый белок (PrP). Он устойчив к действию нуклеаз, нагреванию, УФ-лучей, ионизирующей радиации, ультразвука. Им нельзя заразить интактные клеточные структуры.

Прионные инфекции — трансмиссивные нейродегенеративные болезни животных и человека, иначе называемые трансмиссивные губкообразные энцефалопатии. Общим признаком являются губкообразные изменения в нервной ткани, отсутствие гуморальных или клеточно-опосредованных иммунологических реакций.

Куру (*син.: хохочущая смерть*) — эндемическая (Новая Гвинея) медленная инфекция человека прионной природы, характеризующаяся тяжелыми поражениями ЦНС, выражающаяся в медленно прогрессирующем нарушении координации движений, всегда заканчивается летально.

Источником заражения является больной человек, точнее, ткани умерших от куру людей.

Передача возбудителя куру связана с ритуалом людоедства (поедания мозга и других тканей и органов умершего человека). Продолжительность инкубационного периода в среднем составляет 5–10 лет, но может продолжаться 25–30 лет, если заражение происходит в детском возрасте или юности.

Болезнь обычно продолжается от 6 до 9 месяцев, очень редко продолжительность куру составляет 1–2 года.

Профилактика сводится к прекращению актов каннибализма, что прерывает передачу возбудителя здоровым людям.

Лечение не разработано.

Болезнь Крейтцфельда — Якоба (БКЯ) — медленная вирусная инфекция прионной природы, относится к группе подострых трансмиссивных губкообразных энцефалопатий. Распространена во многих странах мира.

БКЯ встречается в основном в виде спорадических случаев, но регистрируются и семейные очаги заболевания, так как при БКЯ у человека обнаружен ген. кодирующий прионный белок, а значит, не исключена генетически-детерминированная предрасположенность к заболеванию.

Заражение у людей при БКЯ происходит:

1. От животных и через продукты животного происхождения (плохо проваренное мясо, мозг свиней или коров, сырые морепродукты).

2. От человека, например, при пересадке роговицы, нейрохирургических операциях, стоматологических вмешательствах.

Клиническая картина БКЯ характеризуется симптомами психических нарушений, миоклонусом и прогрессирующими двигательными нарушениями. Продолжительность заболевания — от нескольких месяцев до двух лет. Исход летальный.

Лечение не разработано.

Профилактика основывается на эпидемиологических особенностях БКЯ и ее патогенезе.

Учитывая случаи передачи заболевания от человека человеку, рекомендуется:

1) инструменты, используемые для любых хирургических процедур в неврологических клиниках, стерилизовать автоклавированием в течение одного часа при 121 °С;

2) пластиковые, металлические предметы обрабатывать в течение одного часа 0,5 % раствором хлорноватистоокислого натрия или 1 N раствором NaOH;

3) руки следует обрабатывать в течение 10 мин 1 % раствором NaOH с последующим тщательным мытьем с мылом.

Синдром Герстмана — Штреуслера (СГШ) — заболевание прионной природы, сходное по клиническим признакам с куру и болезнью Крейтцфельда — Якоба. Отличием является медленное прогрессирование заболевания, а также более молодой возраст заболевших и умерших.

С целью профилактики необходимо употреблять в пищу только хорошо проваренное или прожаренное мясо. Следует избегать употребления сырых морепродуктов, также недостаточно термообработанного мозга овец и свиней.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Какие заболевания относятся к группе медленных вирусных инфекций?
2. Что такое прион?
3. Особенности эпидемиологии прионных инфекций.
4. Клинические проявления прионных заболеваний у человека.
5. Профилактические мероприятия по предупреждению прионных инфекций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дикий И.Л., Холуляк И.Ю., Шевелева Н.Е., Стегний М.Ю. Микробиология.— Х.: Прапор: Изд-во УкрФА, 1999.— С. 401–403.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Диагностика прионных инфекций основывается главным образом на клинических признаках и патогистологических изменениях ЦНС.

Лабораторная диагностика осуществляется постмортально и включает следующие методы:

1) гистопатологический — определение губкообразных изменений в мозгу умерших с помощью окраски гистологических препаратов гематоксилином и эозином;

2) иммуноцитохимический — определение прионного белка в срезах мозговой ткани с помощью моно- или поликлональных антител к РgР с последующим иммуноферментным окрашиванием. Интенсивность окрашивания зависит от концентрации прионного белка в материале;

3) иммуногистоблот — основан на принципе иммуноблотинга и позволяет определить местонахождение и количество прионного белка в мозге.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- CAMP — Christie, Atkins, Munch-Peterson test — тест на образование экстрацеллюлярного протеина, продуцируемого стрептококками
- CD — «Clusters of differentiation» — кластеры дифференцировки
- C — комплемент
- CPMP — Committee for Proprietary Medicinal Product — Комитет по патентованным лекарственным препаратам
- CIP — «clean in place» — система очистки помещений и оборудования, предусмотренная GMP
- Fc — фрагмент молекулы АТ (fragment crystalline) — кристаллический фрагмент
- GMP — Good manufacturing practice — надлежащая производственная практика
- HAV — hepatitis A virus — вирус гепатита А
- HCV — hepatitis C virus — вирус гепатита С
- HLA — human leukocyte antigens system A — генетический комплекс главной системы гистосовместимости человека
- HbsAg — поверхностный антиген вируса гепатита В
- Ig — иммуноглобулин
- Lf — Limes flocculation — доза токсина, нейтрализуемая 1 МЕ сыворотки
- McCoу — культура клеток Мак-Коя
- PYR — L-putrolidonyl-2-naphthylamide — фермент пирролидониларил-амидаза
- SIP — «sterile in place» — система стерилизации помещений и оборудования, предусмотренная GMP
- ТСBS — тиосульфат-цитрат-бромтимол сахарозный
- АлАТ — аланин-аминотрансфераза
- АсАТ — аспартат-аминотрансфераза
- АГ — антиген
- АКДС — ассоциированная коклюшно-дифтерийно-столбнячная вакцина
- АС — сыворотка
- АТ-АГ — комплекс антиген — антитело
- АТ — антитело
- АТСС — American Type Culture Collection

АФК	— активные формы кислорода
БОЕ	— бляшкообразующие единицы
БЦЖ	— от фр. <i>Bacille de Calmete et Guerin</i> — BCG — живая противотуберкулезная вакцина, полученная французскими учеными А. Кальметтом и Ш. Гереном
ДНК	— дезоксирибонуклеиновая кислота
ДСН	— додецилсульфат натрия
ЕС	— Европейский Союз
ЕД	— единица действия
ИЛ	— интерлейкин
ИПП	— иммунопиноксидазная проба
ИС	— индекс стимуляции
ИФА	— иммуноферментный анализ
ИЭФ	— иммуноэлектрофорез
Ка	— константа ассоциации
Кд	— константа диссоциации
КББ	— карбонатно-бикарбонатный буфер
КОЕ	— колониеобразующая единица
КонаА	— конканавалин А
КУА	— казеиново-угольный агар
КЭ	— куриный эмбрион
ЛПС	— липополисахарид
МБК	— минимальная бактерицидная концентрация
МЕ	— международная единица
МКМ	— микрометр (10^{-6} м)
МЛ (PWM)	— митоген лаконоса
НМ	— нанометр (10^{-9} м)
НПВП	— нестероидные противовоспалительные препараты
НСТ	— нитросиний тетразолиевый
НФАУ	— Национальная фармацевтическая академия Украины
ОКЗ	— острые кишечные заболевания
ОПГА	— обратная пассивная гемагглютинация
ОРЗ	— острые респираторные заболевания
ПАВ	— поверхностно-активное вещество
ПААГ	— полиакриламид
ПЦР	— полимеразная цепная реакция
ПЭГ	— полиэтиленгликоль
ПЭЧ	— почки эмбриона человека

РА	— реакция агглютинации
РАЛ	— реакция агглютинации латекса
РБТЛ	— реакция бластной трансформации лимфоцитов
РИА	— радиоиммунный анализ
РИП	— реакция иммунного прилипания
РИТ	— реакция иммобилизации трепонем
РИФ	— реакция иммунофлуоресценции
РН	— реакция нейтрализации
РНГА	— реакция непрямой гемагглютинации
РНК	— рибонуклеиновая кислота
РОК	— розеткообразующие клетки
РОНГА	— реакция обратной непрямой гемагглютинации
РП	— реакция преципитации
РПН	— реакция повреждения нейтрофилов
РСК	— реакция связывания комплемента
РСФ	— реакция с красителями по Сэбину — Фельдману
РТГА	— реакция торможения гемагглютинации
РТМЛ	— реакция торможения миграции лейкоцитов
РТНГА	— реакция торможения непрямой гемагглютинации
РТОНГА	— реакция торможения обратной непрямой гемагглютинации
РЭМА	— реакция энзимомеченных антител
РЭС	— ретикулоэндотелиальная система
СКВ	— системная красная волчанка
Смесь ОБ	— смесь окиси этилена и бромистого метила
СМЖ	— спинномозговая жидкость
СПИД	— синдром приобретенного иммунодефицита
ТР	— теofilлинрезистентные клетки
ТРИТЦ	— тетраметилпроламиноцитиоанин
ТТХ	— трифенилтетразолия хлорид
ТУ	— технические условия
Туберкулин (очищенный) ППД	— (Derivatium proteinosum purificatum tuberculini mamalinii)
ТЧ	— теofilлинчувствительные клетки
ФГА	— фитогемагглютинин
ФИТЦ	— флуоресцениноцитиоанин
ФЭ	— фосфатидилэтаноламин
ЦПД	— цитопатическое действие
ЦИК	— циркулирующие иммунные комплексы

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	3
Устройство микробиологической лаборатории и правила работы в ней	4
Часть I. Общая микробиология	
Раздел 1. МОРФОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ	11
Тема: Виды микроскопии. Назначение и принципы применения	11
Тема: Методы приготовления и окраски препаратов	26
Раздел 2. ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ	61
Тема: Питание бактерий. Культивирование бактерий. Искусственные питательные среды.	61
Тема: Рост и размножение бактерий. Колонии микроорганизмов. Пигментообразование	71
Тема: Ферменты бактерий. Методы изучения ферментативной актив- ности бактерий и их использование для идентификации бактерий	76
Тема: Дыхание бактерий. Брожение. Методы выделения чистых культур анаэробов.	81
Тема: Культивирование вирусов	88
Тема: Генетика микроорганизмов	96
Раздел 3. ЭКОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ	101
Тема: Распространение микроорганизмов в природе	101
Тема: Микрофлора организма человека	113
Тема: Действие факторов внешней среды на микроорганизмы	116
Раздел 4. ФИТОПАТОГЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ. МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ ЛЕКАРСТВЕН- НОГО СЫРЬЯ И ГОТОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ	132
Тема: Фитопатогенные микроорганизмы. Микробное загрязнение лекарственного сырья и готовых лекарственных средств. Фармако- пейные требования к микробиологической чистоте субстанций, вспомогательных веществ и готовых лекарственных средств, методы ее определения.	132
Тема: Стерильные лекарственные средства. Понятие о пирогенах. Методы определения стерильности лекарственных средств	144
Тема: Основы химиотерапии	148
Раздел 5. ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ.	163
Тема: Инфекция. Экспериментальная инфекция	163
Тема: Иммуниет. Неспецифические и специфические факторы защи- ты организма. Основы клинической иммунологии	168

Тема: Реакции антиген — антитело	183
Тема: Иммунотропные препараты	224
Часть II. Специальная микробиология	
Тема: Патогенные кокки	263
Тема: Возбудители бактериальных кишечных инфекций — эшерихиозов, брюшного тифа, паратифов А и В, сальмонеллезов, дизентерии, холеры	271
Тема: Возбудители кампилобактериоза.	289
Тема: Возбудители зоонозных инфекций — чумы, бруцеллеза, туляремии, сибирской язвы.	294
Тема: Патогенные клостридии и неспорообразующие анаэробные бактерии	308
Тема: Возбудители туберкулеза	320
Тема: Возбудитель дифтерии	328
Тема: Возбудители коклюша и паракоклюша	333
Тема: Патогенные спирохеты	337
Тема: Патогенные простейшие.	343
Тема: Патогенные грибы	376
Тема: Возбудители микоплазмоза	386
Тема: Патогенные хламидии	389
Тема: Патогенные риккетсии.	394
Тема: Возбудитель гриппа.	398
Тема: Возбудитель кори	403
Тема: Возбудитель краснухи	405
Тема: Вирусы гепатита А, гепатитов не А ни В	407
Тема: Возбудитель гепатита В	413
Тема: Вирус полиомиелита	416
Тема: Вирус иммунодефицита человека	423
Тема: Возбудитель бешенства	432
Тема: Возбудители медленных вирусных инфекций	436
Список сокращений.	439

У посібнику подані сучасні методи лабораторних досліджень в області мікробіології, вірусології, паразитології та імунології. Викладені методи ідентифікації збудників інфекційних хвороб.

Видання розраховано на студентів і викладачів фармацевтичних та медичних вузів, лікарів-бактеріологів, вірусологів та імунологів.

Навчальне видання

**Дикий Ігор Леонідович, Сидорчук Ігор Йосипович,
Холупяк Ірина Юріївна, Шевельова Наталія Юхимівна,
Велика Марина Марківна, Волкова Наталія Олексіївна,
Силаєва Людмила Федорівна, Стегній Марина Юріївна,
Стрілець Оксана Петрівна, Гейдеріх Ольга Григорівна,
Літаров Володимир Євгенович**

Мікробіологія

Порадник для лабораторних занять

Навчальний посібник
для студентів вищих навчальних закладів

За редакцією доктора медичних наук, професора І. Л. Дикого

Російською мовою

Редактор *А. М. Миколюк*
Коректор *С. А. Щербата*
Комп'ютерна верстка *О. В. Лєбєдєвої*

Підписано до друку 25.12.2002. Формат 60×90 $\frac{1}{16}$. Папір офсетний.
Гарнітура Ньютон. Друк офсетний. Умов. друк. арк. 27,75. Обл.-вид. арк. 30,52.
Тираж 2500 прим. Зам. 442.

Видавництво Національної фармацевтичної академії України.
Україна, 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53.
Свідоцтво серії ДК № 33 від 04.04.2000.

ТОВ «Золоті сторінки».
Україна, 61145, м. Харків, вул. Космічна, 26.
Тел./ факс: (0572) 30-32-10, 19-56-65.
Свідоцтво серії ДК № 276 від 12.12.2000.

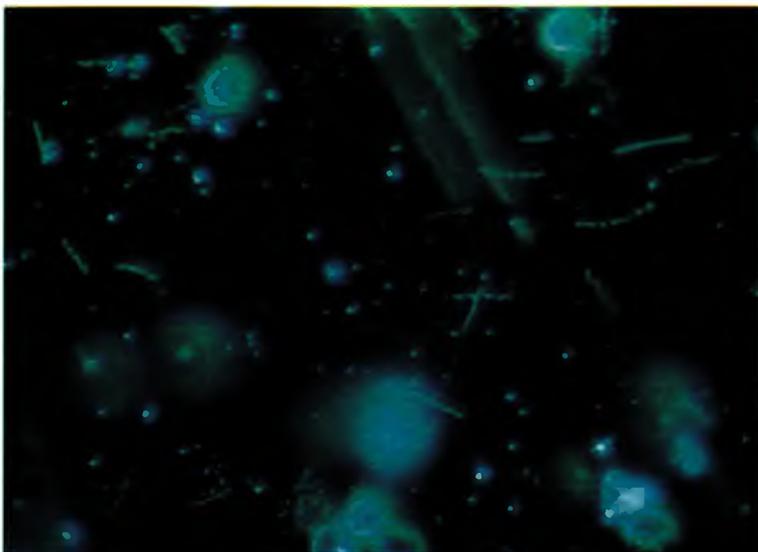


Рис. I. *Treponema pallidum*: темнопольная микроскопия



Рис. II. *Clostridium botulinum*: фазово-контрастная микроскопия (x600)

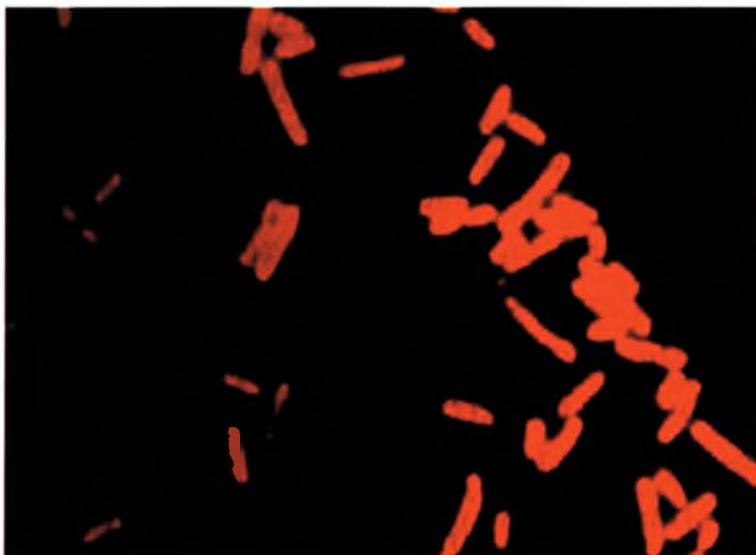


Рис. III. *Escherichia coli*: люминесцентная микроскопия ($\times 600$)

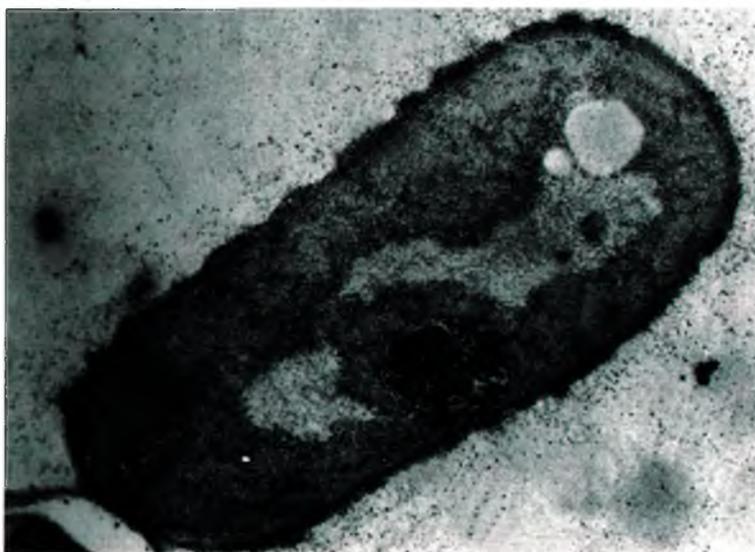


Рис. IV. *Bacillus subtilis*: трансмиссивная электронная микроскопия ($\times 30500$)

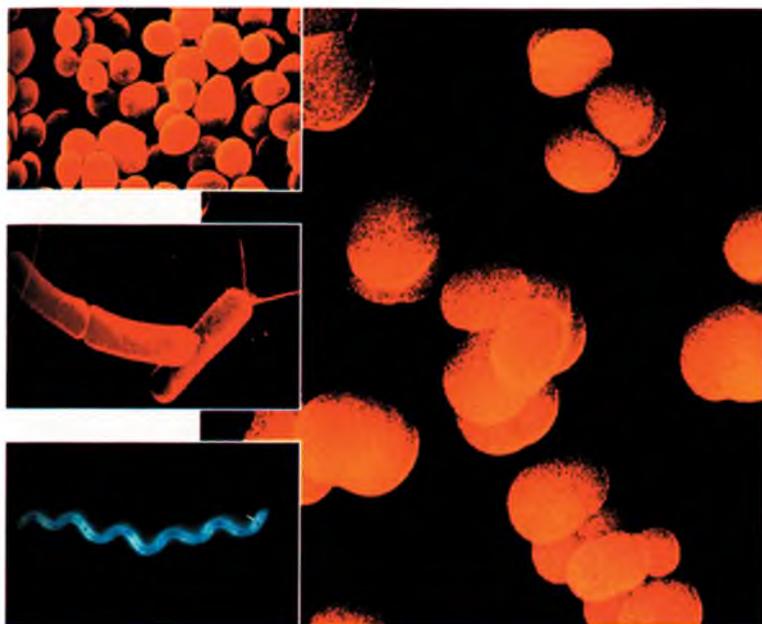


Рис. V. Типичные формы бактерий в сканирующем электронном микроскопе: кокки, палочки, спириллы, коккобактерии



Рис. VI. Вирусы иммунодефицита человека (ВИЧ-инфекции) на поверхности Т-лимфоцита: сканирующая электронная микроскопия ($\times 4000$)

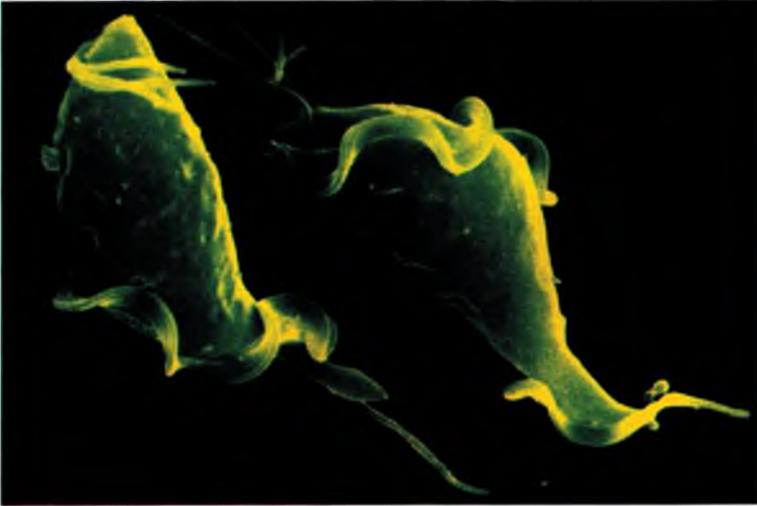


Рис. VII. *Trichomonas vaginalis*: сканирующая электронная микроскопия ($\times 12000$)



Рис. VIII. *Penicillium* species: сканирующая электронная микроскопия ($\times 12000$)



Рис. IX. Друзы актиномицетов из гноя. Окраска метиленовым синим

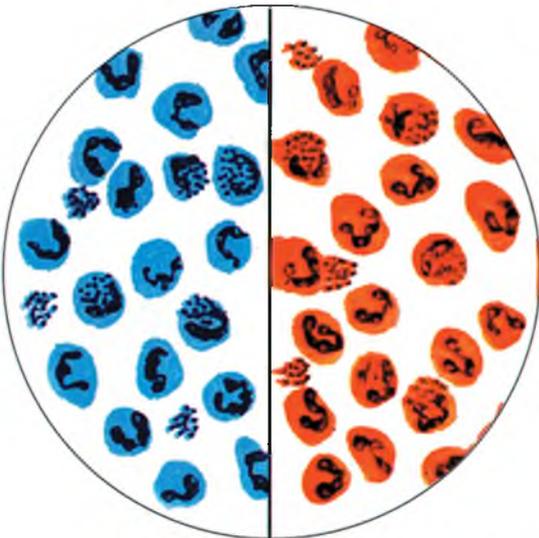


Рис. X. *Neisseria gonorrhoeae* в гное. Слева — окраска метиленовым синим; справа — окраска по Граму

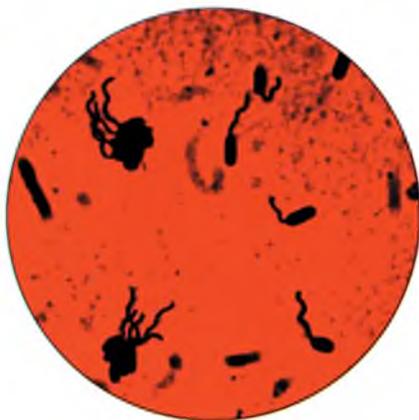


Рис. XV. *Pseudomonas aeruginosa*. Окраска жгутиков серебрением по Морозову

Рис. XVI. *Proteus vulgaris*. Окраска жгутиков по методу Шенка

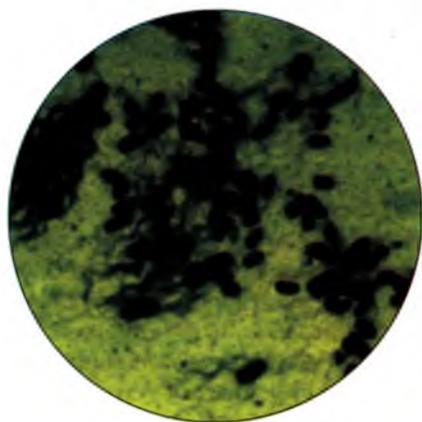


Рис. XVII. *Spirillum minus*. Окраска жгутиков по методу Петрука (модификация метода Грея)

Рис. XVIII. *Corynebacterium diphtheriae*. Окраска по Нейссеру

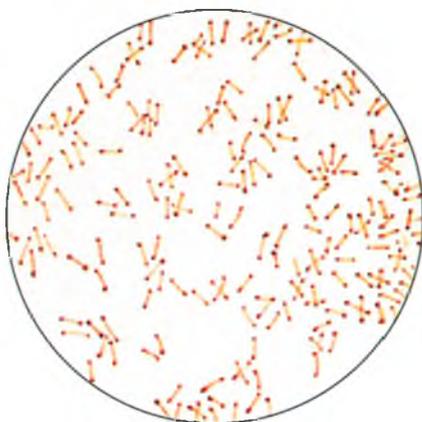


Рис. XIX. *Chlamydia trachomatis* в эпителиальных клетках. Окраска по Романовскому — Гимза

Рис. XX. *Chlamydia psittaci* в мазке крови. Окраска по Романовскому — Гимза

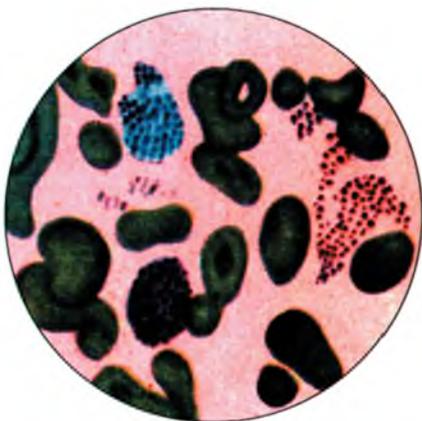




Рис. XXI. *Borrelia recurrentis* в мазке крови. Окраска по Романовскому — Гимза



Рис. XXII. *Leptospira interrogans*. Окраска серебрением по Морозову



Рис. XXIII. *Leishmania donovani* и *Leishmania tropica* в мазке крови. Окраска по Романовскому — Гимза

Рис. XXIV. *Trypanosoma gambiense* и *Trypanosoma cruzi* в мазке крови. Окраска по Романовскому — Гимза

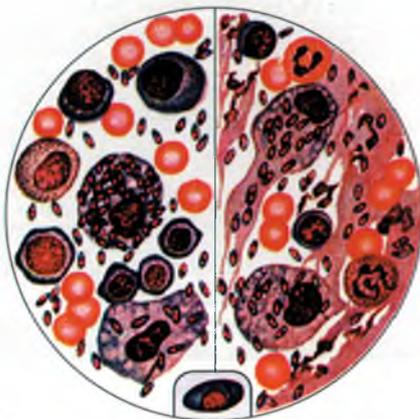
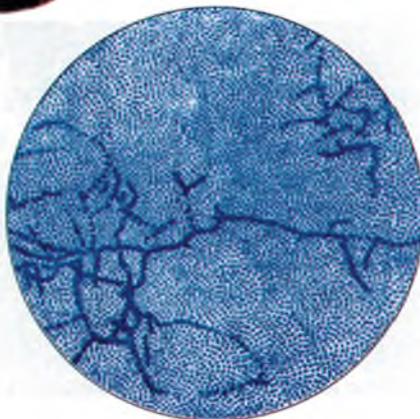


Рис. XXV. *Entamoeba histolytica*: вегетивная тканевая форма (1), вегетивная просветная форма (2), циста (3). Окраска по методу Хайденхайна

Рис. XXVI. Актиномицеты в чистой культуре. Окраска по Граму



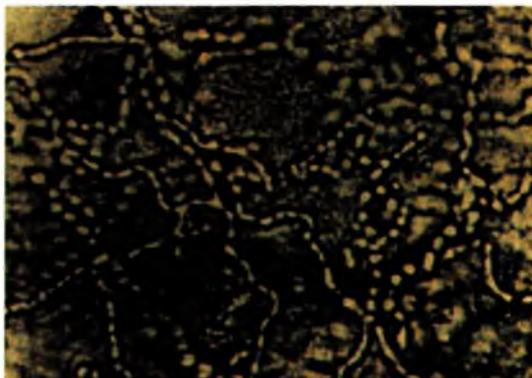


Рис. XXVII—XXVIII.
Мицелий грибов —
возбудителей дер-
матомикозов в че-
шуйке поражен-
ной кожи

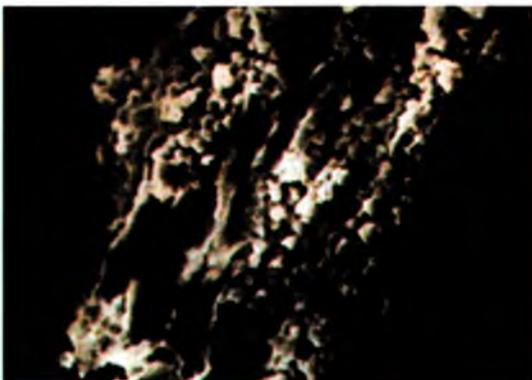


Рис. XXIX. Пора-
жение волос при
микроспории по
типу «эктотрикс»

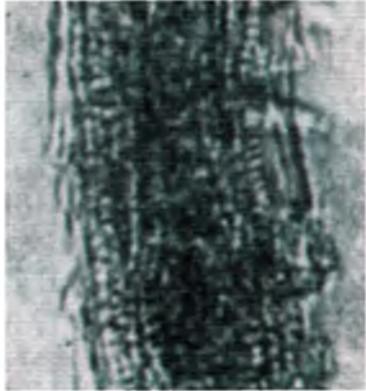


Рис. XXX. Поражение волос при трихофитии по типу «эндотрикс»

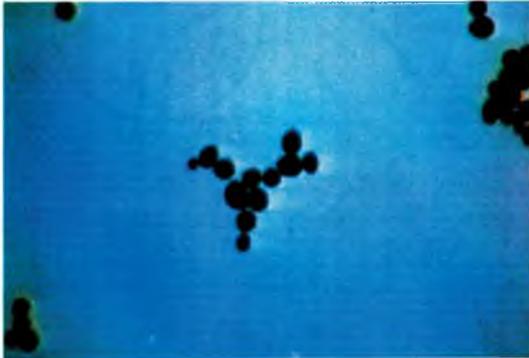


Рис. XXXI. *Candida albicans*. Окраска метиленовым синим

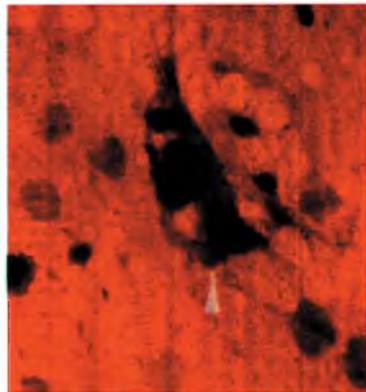


Рис. XXXII. Тельца Бабеша — Негри в препарате из мозговой ткани бешеной собаки. Окраска по методу Селлера

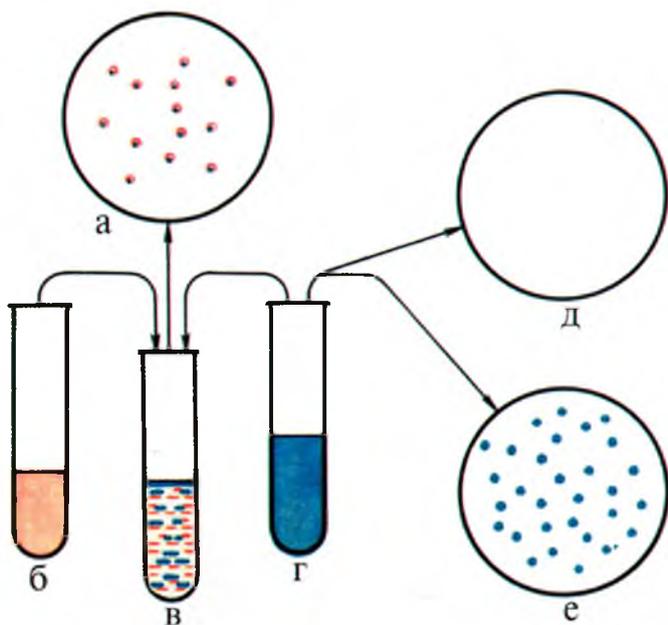


Рис. XXXIII. Схема постановки опыта трансформации:

а — рост колоний трансформантов на селективной среде со стрептомицином; б — раствор ДНК, выделенной из *B. subtilis*; в — контакт реципиентных бактерий с ДНК; г — реципиент *B. subtilis*; д — отсутствие роста реципиентного штамма на селективной среде со стрептомицином; е — рост колоний реципиентного штамма на среде без стрептомицина

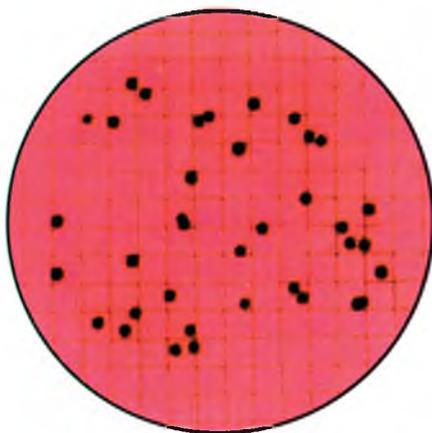


Рис. XXIV. Рост *Escherichia coli* на среде Эндо

Рис. XXXV. Пост *Salmonella typhi* на висмут-сульфитной среде

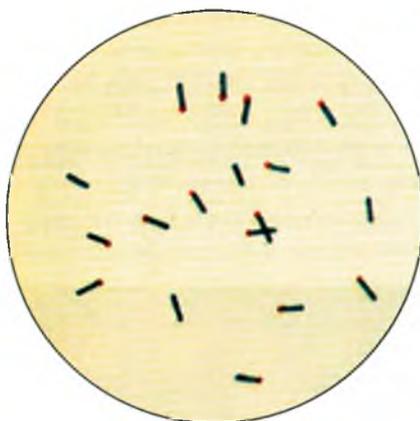
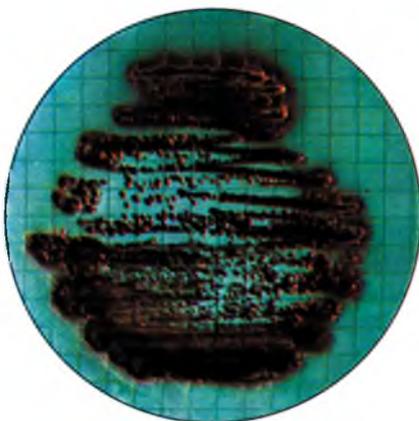
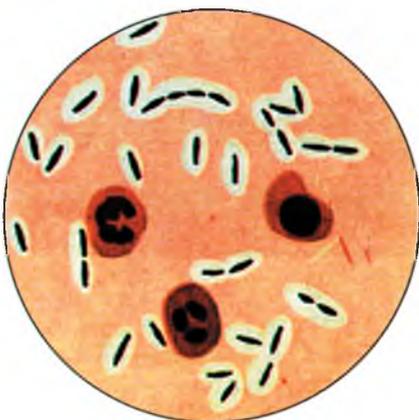


Рис. XXXVI. *Clostridium tetani* (чистая культура). Окраска по методу Ожешки

Рис. XXXVII. *Clostridium perfringens* в отечной жидкости



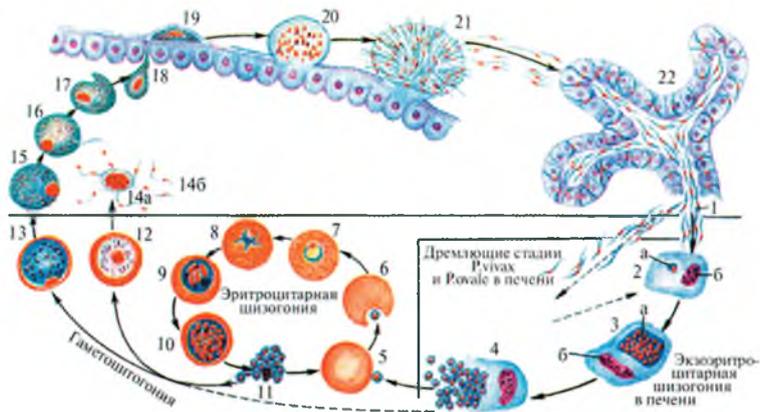


Рис. XXXVIII. Жизненный цикл *Plasmodium vivax* и *Plasmodium ovale*:

1 — выход спорозоитов из протока слюнной железы малярийного комара и проникновение в клетки печени (при укусе человека, через кожу); 2 — трофозоит в клетке печени: а — трофозоит, б — ядро клетки; 3 — экзоэритроцитарный шизонт в клетке печени: а — шизонт; б — ядро клетки; 4 — выход экзоэритроцитарных мерозоитов из клетки печени в плазму крови; 5 — прикрепление мерозонта к эритроциту; 6 — процесс проникновения мерозонта в эритроцит; 7 — кольцевидный трофозоит в эритроците; 8 — юный трофозоит в эритроците; 9 — незрелый эритроцитарный шизонт; 10 — зрелый эритроцитарный шизонт; 11 — эритроцитарные мерозонты; 12 — мужской гамонт; 13 — женский гамонт; 14а — образование мужских гамет (эксфлагелляция); 14б — мужская гамета; 15 — женская гамета; 16—17 — слияние мужских и женских половых клеток (гамет); 18—20 — стадии развития ооцисты на стенке желудка комара; 21 — выход спорозоитов из зрелой ооцисты; 22 — спорозоиты в слюнной железе комара

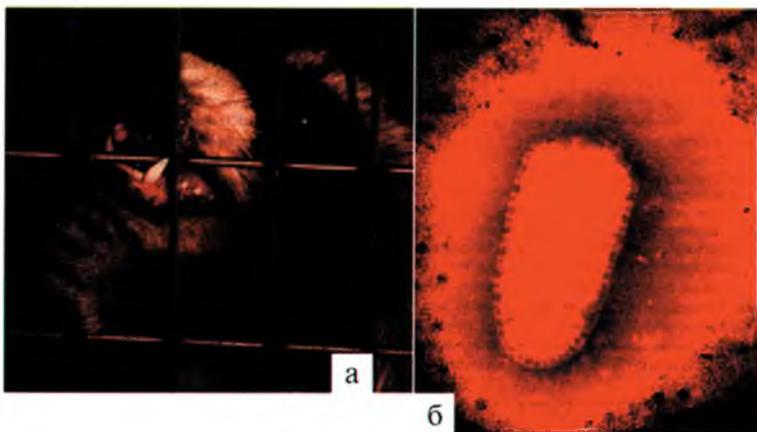


Рис. XXXIX. Бешенство: типичные признаки возбуждения больного животного (а); вирион вируса бешенства, трансмиссивная электронная микроскопия (б)