

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«ГОМЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии

Л. В. ЛАГУН

МЕТОДЫ
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ
ИССЛЕДОВАНИЙ

Учебно-методическое пособие
для студентов 1-3 курсов лечебного и медико-диагностического
ф.культетов медицинских вузов

Гомель
ГомГМУ
2016

УДК 616-093/-098+579(072)

ББК 52.6+28.4

Л 14

Рецензенты:

кандидат медицинских наук, доцент,
доцент кафедры клинической микробиологии
Витебского государственного ордена Дружбы народов
медицинского университета

В. К. Окулич;

кандидат медицинских наук, доцент,
доцент кафедры эпидемиологии и микробиологии
Белорусской медицинской академии последипломного образования

О. В. Тонко

Лагун, Л. В.

Л 14 Методы микробиологических исследований: учеб.-метод. пособие для студентов 2–3 курсов лечебного и медико-диагностического факультетов медицинских вузов / Л. В. Лагун. — Гомель: ГомГМУ, 2016. — 164 с.

ISBN 978-985-506-853-3

В данном учебно-методическом пособии представлены классические и современные методы микробиологических исследований, применяемые для диагностики бактериальных, вирусных и грибковых инфекционных заболеваний. Материалы пособия изложены в соответствии с действующими типовыми учебными программами по микробиологии, вирусологии, иммунологии.

Представленные материалы пособия позволят облегчить студентам усвоение учебного материала, обеспечат более эффективное овладение практическими навыками на учебно-практических занятиях.

Предназначено для студентов 2–3 курсов лечебного и медико-диагностического факультетов медицинских вузов.

Утверждено и рекомендовано к изданию научно-методическим советом учреждения образования «Гомельский государственный медицинский университет», 28 июня 2016 г., протокол № 3.

УДК 616-093/-098+579(072)

ББК 52.6+28.4

ISBN 978-985-506-853-3

© Учреждение образования
«Гомельский государственный
медицинский университет», 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|---|----|
| Список условных обозначений | 6 |
| Введение | 7 |
| Раздел 1. Микробиологические лаборатории | 8 |
| Понятие о микробиологических лабораториях..... | 8 |
| Устройство микробиологической лаборатории | 8 |
| Понятие о биологической опасности и безопасности при работе с микроорганизмами..... | 9 |
| Учебная микробиологическая лаборатория, правила работы в ней | 10 |
| Раздел 2. Принципы микробиологической диагностики инфекционных заболеваний | 12 |
| Материал для микробиологических исследований | 13 |
| Общее понятие о методах микробиологических исследований..... | 15 |
| Контроль качества лабораторных исследований..... | 16 |
| Раздел 3. Методы микробиологических исследований, применяемые для диагностики бактериальных инфекций | 18 |
| Микроскопический (бактериоскопический) метод | 18 |
| <i>Этапы бактериоскопического метода</i> | 19 |
| <i>Типы микроскопических препаратов</i> | 20 |
| <i>Бактериологический препарат-мазок</i> | 22 |
| <i>Простые методы окраски</i> | 23 |
| <i>Сложные методы окраски</i> | 24 |
| <i>Микроскопы и методы микроскопии</i> | 28 |
| Бактериологический (культуральный) метод..... | 32 |
| <i>Понятие о культивировании микроорганизмов</i> | 33 |
| <i>Питательные среды</i> | 34 |
| <i>Посев микроорганизмов на питательные среды</i> | 38 |
| <i>Условия культивирования бактерий</i> | 40 |
| <i>Характер роста бактерий на искусственных питательных средах</i> | 40 |
| <i>Выделение чистых культур микроорганизмов</i> | 41 |
| <i>Выделение и идентификация чистых культур аэробных и факультативно-анаэробных бактерий</i> | 42 |
| <i>Культивирование и выделение чистых культур анаэробных бактерий</i> | 46 |
| <i>Изучение биохимических свойств микроорганизмов</i> | 51 |
| <i>Автоматизация микробиологических исследований</i> | 55 |
| <i>Определение чувствительности бактерий к антибиотикам</i> | 60 |

| | |
|---|-----|
| Иммунологический метод исследования. Иммунологические реакции | 65 |
| <i>Понятие об иммунологическом методе</i> | |
| <i>и иммунологических реакциях</i> | 65 |
| <i>Серологическая идентификация микроорганизмов.....</i> | 67 |
| <i>Серодиагностика инфекционных заболеваний</i> | 69 |
| <i>Общая классификация иммунологических реакций</i> | 71 |
| <i>Реакции агглютинации</i> | 71 |
| <i>Реакции преципитации</i> | 79 |
| <i>Реакции нейтрализации.....</i> | 81 |
| <i>Реакции лизиса (реакции с участием комплемента)</i> | 85 |
| <i>Иммунные реакции с использованием меченых антител</i> | |
| <i>и антигенов</i> | 90 |
| <i>Иммуногистохимия, иммуноцитохимия.....</i> | 97 |
| <i>Иммунохроматографический анализ.....</i> | 98 |
| <i>Общие принципы аллергологического метода исследования.....</i> | 102 |
| <i>Методы изучения иммунного статуса человека. Иммунограмма.....</i> | 107 |
| <i>Методы контроля эффективности поствакцинального</i> | |
| <i>иммунитета.....</i> | 114 |
| Биологический (экспериментальный) метод..... | 115 |
| Молекулярно-генетический метод | 119 |
| <i>Метод молекулярной гибридизации (метод ДНК-зондов)</i> | 120 |
| <i>Полимеразная цепная реакция</i> | 122 |
| <i>Секвенирование.....</i> | 128 |
| <i>Направления исследований в инфекционной патологии</i> | |
| <i>с применением молекулярно-генетических методов.....</i> | 129 |
| Раздел 4. Методы микробиологических исследований, | |
| применяемые для диагностики вирусных инфекций..... | 130 |
| Экспресс-диагностика..... | 130 |
| <i>Электронная микроскопия и иммунная электронная микроскопия</i> | 130 |
| <i>Световая микроскопия (вирусоскопия).....</i> | 132 |
| <i>Иммунологические реакции для определения вирусного антигена.....</i> | 133 |
| <i>Молекулярно-генетические методы</i> | 135 |
| Вирусологический метод..... | 137 |
| <i>Основные этапы вирусологического метода.....</i> | 138 |
| <i>Выделение вирусов в куриных эмбрионах и методы их индикации.....</i> | 139 |
| <i>Выделение вирусов в культурах клеток и методы их индикации</i> | 140 |
| <i>Выделение вирусов на лабораторных животных</i> | 145 |
| <i>Общая схема идентификации выделенного вируса.....</i> | 146 |
| Серологический метод..... | 147 |
| <i>Основные иммунологические реакции, применяемые</i> | |
| <i>в серодиагностике вирусных инфекций</i> | 148 |

| | |
|--|------------|
| Раздел 5. Методы микробиологических исследований, применяемые для диагностики микозов | 151 |
| Классификация микозов | 151 |
| Общая характеристика методов микробиологической диагностики микозов | 153 |
| Лабораторная диагностика микозов..... | 155 |
| <i>Лабораторная диагностика поверхностных микозов и дерматофитий</i> | <i>155</i> |
| <i>Лабораторная диагностика подкожных микозов</i> | <i>157</i> |
| <i>Лабораторная диагностика глубоких микозов.....</i> | <i>158</i> |
| <i>Лабораторная диагностика респираторных эндемических микозов</i> | <i>158</i> |
| <i>Лабораторная диагностика кандидоза.....</i> | <i>159</i> |
| Литература..... | 161 |

РЕПОЗИТОРИЙ ГОМАНУ

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

| | |
|-------|--|
| АГ | — антиген, антигены |
| АГС | — антиглобулиновая сыворотка |
| АТ | — антитело, антитела |
| ВИЧ | — вирус иммунодефицита человека |
| ГВ | — генцианвиолет |
| ГЗТ | — гиперчувствительность замедленного типа |
| ГНТ | — гиперчувствительность немедленного типа |
| ДНК | — дезоксирибонуклеиновая кислота |
| ИГХ | — иммуногистохимия |
| ИФА | — иммуноферментный анализ |
| ИХА | — иммунохроматографический анализ |
| ИЭМ | — иммунная электронная микроскопия |
| МГ | — молекулярная гибридизация |
| МПА | — мясо-пептонный агар |
| МПБ | — мясо-пептонный бульон |
| МПК | — минимальная подавляющая концентрация |
| ПЦР | — полимеразная цепная реакция |
| РА | — реакция агглютинации |
| РГА | — реакция гемагглютинации |
| РГадс | — реакция гемадсорбции |
| РИА | — радиоиммунный анализ |
| РИФ | — реакция иммунофлуоресценции |
| РН | — реакция нейтрализации |
| РНГА | — реакция непрямой гемагглютинации |
| РНК | — рибонуклеиновая кислота |
| РП | — реакция преципитации |
| РПГА | — реакция пассивной гемагглютинации |
| РСК | — реакция связывания комплемента |
| РТГА | — реакция торможения гемагглютинации |
| ФИТЦ | — флюоресцеинизотиоцианат |
| ЦГЭ | — центр гигиены и эпидемиологии |
| ЦПД | — цитопатическое действие |
| ЭМ | — электронная микроскопия |
| CD | — cluster differentiation; кластер дифференцировки |

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время микробиологические исследования имеют приоритетное развитие, так как они востребованы практически во всех видах медицинской помощи. Задачи микробиологических исследований — идентифицировать микроорганизмы, выделенные из исследуемого материала (что позволяет поставить микробиологический диагноз), а также установить антибиотикочувствительность выделенных микроорганизмов, что играет важную роль в выборе антимикробных препаратов для этиотропной терапии инфекционного заболевания.

Несмотря на то, что проведение микробиологических исследований относится к компетенции врачей-микробиологов, профессиональная подготовка которых требует обязательного освоения практических лабораторных навыков, каждый врач-клиницист, имеющий дело со специфическими и неспецифическими инфекционными заболеваниями, должен знать, как и когда необходимо отбирать материал для исследований, на какие исследования его направлять и как интерпретировать полученные результаты. Таким образом, формирование знаний о методах лабораторной диагностики инфекционных заболеваний и освоение практических навыков по проведению микробиологических исследований является необходимым элементом обучения студентов в кафедре медико-диагностического, так и лечебного факультетов.

Учебно-методическое пособие создано для оптимизации процесса изучения предмета при выполнении практической работы на практических занятиях в учебной микробиологической лаборатории. При составлении учебно-методического пособия автором учтены последние достижения науки, использованы современные инструктивно-методические материалы, и, наряду с традиционными методами диагностики инфекционных заболеваний, изложены современные автоматизированные методы микробиологических, иммунологических и молекулярно-генетических исследований с применением микробиологических и иммунологических анализаторов. Материал пособия иллюстрирован схемами, рисунками и таблицами, которые позволяют студентам поэтапно изучить методику проведения исследований и улучшить усвоение знаний и навыков на практических занятиях.

Автор пособия будет признателен за конструктивные замечания и предложения по улучшению содержания материала данного учебно-методического пособия.

РАЗДЕЛ 1

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ЛАБОРАТОРИИ

Понятие о микробиологических лабораториях

Различают бактериологические, вирусологические, иммунологические и специализированные лаборатории.

Бактериологические, вирусологические и серологические лаборатории входят в состав центров гигиены и эпидемиологии (ЦГЭ), а также организуются в инфекционных больницах, в больницах общего типа, специализированных стационарах, например, туберкулезных, кожно-венерологических, а также в некоторых поликлиниках.

В лабораториях ЦГЭ выполняются бактериологические, вирусологические и серологические исследования материалов, полученных от больных и контактирующих с ними лиц, обследуются бактерионосители и проводится санитарно-микробиологические исследования воды, воздуха, почвы, пищевых продуктов и др. В частности, в вирусологических лабораториях проводится диагностика вирусных инфекций (грипп, корь, краснуха, вирусные гепатиты, клещевой энцефалит, полиомиелит, ВИЧ-инфекция и др.) и заболеваний, вызванных хламидиями и риккетсиями. При организации и оборудовании вирусологических лабораторий учитывается специфика работы с вирусами, тканевыми культурами, куриными эмбрионами, требующая строжайшей асептики. Диагностика особо опасных инфекций (чума, туляремия, бруцеллез, холера, сибирская язва и др.) осуществляется в специализированных лабораториях (лабораториях особо опасных инфекций), организация и деятельность строго регламентирована.

В бактериологических и серологических лабораториях больниц обычно проводят диагностические исследования при различных инфекционных заболеваниях бактериальной природы (гнойно-септических, воздушно-капельных, кишечных и др.), а также исследования по контролю за качеством дезинфекции и стерилизации.

Устройство микробиологической лаборатории

В микробиологической лаборатории предусмотрены следующие помещения:

- 1) комнаты для выполнения бактериологических исследований;
- 2) бокс для работы с отдельными группами бактерий или вирусами в асептических условиях;
- 3) специально оборудованное помещение для стерилизации — стерилизационная (автоклавная): для стерилизации питательных сред, посуды, обеззараживания отработанного инфицированного материала;

- 4) моечная, оборудованная для мытья посуды;
- 5) оборудованная комната для иммунологических исследований;
- 6) помещение для приготовления питательных сред (средоварочная);
- 7) регистратура для приема образцов и выдачи результатов анализов;
- 8) гардероб для персонала.

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.

Понятие о биологической опасности и безопасности при работе с микроорганизмами

Биологическую опасность, или риск для здоровья людей и окружающей среды, могут представлять инфицированные организмы или биологический материал, содержащий микроорганизмы или токсины биологического происхождения.

По степени опасности для человека и окружающей среды выделяют **4 группы возбудителей инфекционных заболеваний:**

I группа — возбудители особо опасных инфекций: чумы, натуральной оспы, лихорадки Ласса, лихорадки Эбола и другие.

II группа — возбудители высококонтагиозных бактериальных, грибковых и вирусных инфекций: сибирской язвы, бруцеллеза, туляремии, холеры, сыпного тифа, бластомикоза, листериоза, ВИЧ-инфекции, вирусных гепатитов В, С и D, бешенства и др.

III группа — возбудители бактериальных, грибковых, вирусных и протозойных инфекций, выделенных в отдельные нозологические формы (возбудители коклюша, столбняка, ботулизма, дифтерии, туберкулеза, сифилиса, малярии, лейшманиоза, трихомониаза, гриппа, полиомиелита, вирусных гепатитов А и Е, герпесвирусы и др.)

IV группа — условно-патогенные (возбудители микобактериозов, газовой гангрены, гемофильная палочка, клебсиеллы, стафилококки, стрептококки, синегнойная палочка, некоторые кандиды и аспергиллы, возбудители амебиаза, токсоплазмоза, аденовирусы, ротавирусы, энтеровирусы, риновирусы, парамиксовирусы и др.) и непатогенные микроорганизмы.

Регламентация условий работы с возбудителями инфекционных заболеваний производится в соответствии со степенью опасности микроорганизмов для человека и окружающей среды. Более низкий номер группы означает возрастающий риск при выполнении лабораторных исследований.

Биологическая безопасность — система медико-биологических, организационных и инженерно-технических мероприятий и средств, направленных на защиту работающего в лабораториях персонала, населения и

окружающей среды от воздействия патогенных биологических агентов (микроорганизмов).

Учебная микробиологическая лаборатория и правила работы в ней

Учебный практикум кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии считается **учебной микробиологической лабораторией**. На практических занятиях студенты при выполнении микробиологических исследований работают с микроорганизмами IV группы патогенности. При работе с культурами микроорганизмов требуется соблюдение специальных правил для обеспечения личной безопасности и безопасности окружающей среды. Соответственно, в начале каждого семестра преподаватель проводит **инструктаж по технике безопасности** при работе с микробными культурами, биоматериалом, спиртовками и электроприборами. Инструктаж фиксируется в журнале личной подписью студента и заверяется подписью преподавателя.

В учебной микробиологической лаборатории необходимо соблюдать следующие правила:

1. В учебной лаборатории студенты должны находиться в медицинских халатах, шапочках и сменной обуви. *Запрещается* приносить в практикум верхнюю одежду и класть на рабочие столы сумки, портфели и другие посторонние предметы.

2. В лаборатории категорически *запрещается* принимать пищу, курить.

3. *Запрещается* прикасаться к биоматериалу и микробным культурам руками. При работе с биоматериалами необходимо пользоваться инструментами (петлями, пинцетом, пинцетами). Инструменты, имевшие контакт с инфицированным материалом, фламбируются в пламени спиртовки, или полностью погружаются в емкости с дезраствором. Посевы проводят у спиртовки, фламбируя при этом края пробирок, петли, шпатели.

4. *Запрещается* держать вблизи работающих спиртовок легковоспламеняющиеся материалы и вещества, оставлять без присмотра работающие спиртовки. Перед зажиганием спиртовки необходимо удостовериться, что ее корпус исправен, фитиль выпущен на нужную высоту. Фитиль должен плотно входить в направляющую трубку держателя (иначе возможна вспышка паров внутри спиртовки и взрыв). *Зажженную спиртовку нельзя переносить с места на место, нельзя зажигать одну спиртовку от другой*. Гасить спиртовку нужно, накрывая пламя фитиля колпачком. Задувать пламя запрещается.

5. Каждый студент должен работать на закрепленном за ним рабочем месте. Во время работы в лаборатории *следует соблюдать* тишину и порядок.

6. При выполнении практического задания *студенты обязаны тщательно выполнять указания преподавателя*.

7. Все необходимое для работы на занятии (чашки Петри, пробирки, пипетки, бактериальные петли и др.) студенты берут на своем рабочем или специальном столе, а после выполнения работы ставят все на место.

8. При работе с микроскопом студенту нужно быть внимательным, обо всех обнаруженных недочетах в работе микроскопа сообщать преподавателю.

9. На каждом практическом занятии назначается *дежурный студент*, в обязанности которого входит контроль над обеспечением порядка на рабочих местах в учебной лаборатории. По окончании работы дежурный обязан сдать отработанный материал лаборанту, привести в порядок микроскопы, проверить состояние рабочих столов и устранить дефекты их уборки.

10. В случае загрязнения заразным материалом поверхности стола и других предметов (при аварии с посудой, проливание жидкого инфицированного материала и т. д.) студент обязан немедленно поставить в известность преподавателя и произвести тщательную дезинфекцию поверхности стола и предметов под контролем преподавателя (на месте аварии наносят дезраствор, время экспозиции 5–10 мин; затем дезраствор вытирают влажной поглащающей тканью, и проводят антисептическую обработку и мытье рук с мылом). В случае загрязнения заразным материалом кожи рук, лица, особенно при нарушении целостности кожных покровов (укол, порез), студент под контролем преподавателя должен обработать поврежденное место (70 % спиртом или 5 % йодом, или 3 % раствором перекиси водорода, или другим антисептиком).

11. В конце занятия студент обязан: использованные предметные стекла положить в специальный лоток; сдать дежурному отработанный материал; привести в порядок микроскоп и рабочее место; вымыть руки с мылом.

РАЗДЕЛ 2

ПРИНЦИПЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Наиболее важное место в лабораторной диагностике инфекционных заболеваний занимает специфическая *микробиологическая диагностика*, которую проводят в бактериологической, вирусологической, иммунологической и других лабораториях.

Цель микробиологической диагностики — установить наличие или отсутствие в исследуемом материале возбудителя заболевания и на основании этого расшифровать этиологию заболевания и обосновать соответствующее лечение.

Задачи микробиологических исследований — идентифицировать микроорганизмы в исследуемом материале, определить их видовую принадлежность, морфологические, биохимические, токсигенные и антигенные свойства (что позволяет поставить микробиологический диагноз), а также установить антибиотикочувствительность выделенных микроорганизмов, что играет важную роль в алгоритме выбора антимикробных препаратов для этиотропной терапии инфекционного заболевания.

Микробиологическая диагностика инфекционного заболевания состоит из трех этапов: преаналитического, аналитического и постаналитического. Первым этапом микробиологической диагностики является *преаналитический*, включающий взятие материала для исследования. *Аналитический этап* включает проведение различных методов микробиологической диагностики. **Постаналитический этап** микробиологической диагностики заключается в клинической интерпретации результатов лабораторных исследований.

Несмотря на то, что проведение микробиологических исследований относится к компетенции микробиологов, каждый врач, имеющий дело со специфическими и неспецифическими инфекционными заболеваниями, должен знать, как и когда необходимо отбирать материал для исследований, на какие исследования его направлять и как интерпретировать полученные результаты. Если микробиологическое исследование дает положительный результат, то предварительный клинический диагноз получает подтверждение. *Для установления этиологической роли облигатно-патогенных микробов*, как известно, достаточно выделения представителя того или иного вида из патологического очага (независимо от количества), обнаружения в

сыворотке крови больного антител против видовых антигенов микроба в диагностическом титре или нарастание титра антител к ним в процессе болезни в 4 и более раз, наличие корреляции между выделенным микробом и клинической картиной болезни. Следовательно, в данном случае положительный результат микробиологического исследования — это объективное фактическое доказательство достоверности клинического диагноза. В случае выделения условно-патогенных микробов лечащий врач должен правильно оценить этиологическую значимость выделенных от больного микроорганизмов, скорректировать на основании данных микробиологического исследования проводимую пациенту антимикробную химиотерапию.

Материал для микробиологических исследований

Любое микробиологическое исследование начинается со взятия исследуемого материала. Вид исследуемого материала зависит от цели исследования. При микробиологической диагностике заболевания клинический материал забирается из организма больного и/или носителя. В этом случае материалом для исследования служат различные биологические и патологические жидкости организма (кровь, гной, мокрота, ликвор, рвотные массы, испражнения и т. п.) и ткани — материал биопсии от живого организма или аутопсии от трупа (трупный, секционный материал). Выбор материала для лабораторной диагностики инфекционных заболеваний определяется локализацией патологического процесса, особенностями патогенеза болезни и биологическими свойствами возбудителя (таблица 1).

Таблица 1 — Материал для микробиологических исследований

| Вид исследуемого материала (примеры) | Примеры заболеваний, состояний, при которых проводят забор соответствующего материала |
|---|--|
| Кровь | Сепсис, возвратный тиф, при ранней диагностике брюшного тифа, вирусный гепатит В и др.; при отсутствии или неясности локальных очагов инфекции |
| Испражнения | Кишечные инфекции (дизентерия, сальмонеллез, эшерихиозы, ротавирусный гастроэнтерит и др.) |
| Рвотные массы | Холера, ботулизм, пищевые отравления |
| Моча | Заболевания мочевыводящей системы (цистит, пиелонефрит), лептоспироз (в период разгара болезни) |
| Мокрота | Поражение бронхов, легких (напр., бронхит, пневмония, туберкулез, легионеллез) |
| Гнойное содержимое | Инфицированная рана, фурункул, карбункул, абсцесс |
| Спинно-мозговая жидкость (ликвор) | Менингиты, энцефалиты |
| Отделяемое из носоглотки, с поверхности миндалин, из зева и др. | Энтеровирусные инфекции (в 1-ю нед. болезни), менингококковая инфекция, ангина, фарингит, дифтерия |
| Выделения из половых органов | Гонорея |

(например, отделяемое из уретры)

При проведении эпидемиологического анализа — дополнительно исследуются пробы из объектов внешней среды (воды, воздуха, почвы, продуктов питания, смывы с предметов и др.).

Общие правила забора, хранения и транспортировки материала для микробиологического исследования

Результаты диагностики многих микробных заболеваний во многом зависят от правильного выбора материала и соблюдения следующих условий его забора, доставки, хранения и обработки.

1. **Вид материала определяется клинической картиной заболевания**, и он должен соответствовать локализации предполагаемого возбудителя в организме на данном этапе патогенеза болезни. Например, при бронхолегочных заболеваниях для исследования берут мокроту, при поражениях мочевой системы — мочу, и т. д. В случаях отсутствия или неясности локальных очагов для исследования берут кровь.

2. **Собирают достаточное количество материала** (например, при исследовании крови берут 5–10 мл крови).

3. **Материал берут по возможности в начальном периоде болезни**, т.к. именно в этот период возбудители выделяются чаще, их больше, они имеют более типичную локализацию. Ранний этиологический диагноз предполагает более раннее и, следовательно, более эффективное лечение и профилактику новых случаев болезни.

4. **Забор материала должен осуществляться до начала антимикробной терапии**. Если такая терапия начата, то ее при необходимости надо прервать на 1–2 дня, а потом производить забор материала. Так же поступают при повторных исследованиях.

5. **Необходимо предупредить возможную контаминацию материала собственной нормальной микрофлорой больного и микробами окружающей среды**. Для этого получение материала должно проводиться в асептических условиях, в процедурном кабинете, стерильными инструментами, в стерильную посуду. Кроме того, пути, через которые выделяется или берется материал, должны быть максимально освобождены от нормальной микрофлоры.

6. **Следует предупредить возможность попадания в материал антимикробных препаратов** (дезинфектантов, антисептиков, антибиотиков), исключить контакт с металлами, с ватой.

7. **Любой клинический материал должен расцениваться как потенциально опасный для человека**. Поэтому при его заборе, хранении, доставке, обработке во избежание заражения должны соблюдаться такие же меры техники безопасности, как в микробиологической лаборатории.

8. **После взятия материал в возможно более короткие сроки необходимо доставить в лабораторию и начать его исследование**. При от-

сутствии возможности быстро доставить его в лабораторию (например, ночью), его помещают в бытовой холодильник (или добавляют консервант); можно использовать специальные транспортные среды.

9. **Любой доставляемый в лабораторию материал должен иметь сопровождающий документ — направление на микробиологическое исследование**, при оформлении которого необходимо указать название учреждения, данные о пациенте, предварительный клинический диагноз и дату заболевания, показания к обследованию; вид исследуемого материала, дату, время его взятия; цель и наименование исследования; фамилию и подпись врача, направляющего материал.

10. **В процессе доставки материал следует оберегать от действия света, тепла, холода, механических повреждений.** Лучше всего доставлять в специальных металлических контейнерах, которые удобно мыть и обеззараживать. Нельзя отправлять материал с больными и случайными людьми.

11. **После исследования остатки материала подлежат уничтожению** (лучше автоклавированием или сжиганием), посуда, контейнеры, инструменты — обеззараживанию.

Общее понятие о методах микробиологических исследований

Микробиологическая диагностика включает в себя следующие основные методы:

1. **Микроскопический метод** основан на изучении морфологических свойств микроорганизмов с использованием различных видов микроскопии; в бактериологии микроскопический метод получил название — бактериоскопический, в вирусологии — вирусоскопический.

2. **Культуральный метод:** в бактериологии получил название — бактериологический (основан на выделении чистых культур бактерий и их дальнейшей идентификации), в вирусологии — вирусологический, в микологии — микологический.

3. **Биологический (экспериментальный или биопроба) метод** основан на заражении лабораторных животных исследуемым материалом с целью воспроизведения у них инфекционного заболевания.

4. **Иммунологический метод** представляет собой совокупность методов, общим для которых служит использование в диагностических целях иммунологических реакций (варианты метода — серологическая идентификация микроорганизмов, серологический, аллергологический методы).

5. **Молекулярно-генетический метод** основан на обнаружении фрагментов генома (молекул ДНК, РНК) возбудителя в биологическом материале (метод молекулярной гибридизации, полимеразная цепная реакция, секвенирование и др.).

При диагностике инфекционного заболевания часто один из этих методов является основным, а другие — вспомогательными.

Особое значение приобретают **методы экспресс-диагностики**, которые позволяют поставить микробиологический диагноз в течение короткого промежутка времени (от нескольких минут до нескольких часов) с момента доставки исследуемого материала в лабораторию. К числу экспресс-методов относят: реакцию иммунофлюоресценции, иммуноферментный анализ, полимеразную цепную реакцию, хроматографию и другие.

Контроль качества лабораторных исследований

Контроль качества лабораторных исследований должен проводиться на всех этапах как устройства соответствующей лаборатории, так и обеспечения каждого этапа исследований, стандартизации используемого оборудования, стандартизации реагентов, применяемых в исследованиях, стандартизации схем и методик, применяемых в лаборатории. Все исследования, проводимые в микробиологических лабораториях, должны осуществляться согласно унифицированным методикам по выделению чистых культур, идентификации их и определению чувствительности выделенных микроорганизмов к антибиотикам.

Контроль качества лабораторных исследований подразделяется на *внутренний* (проводится внутри лаборатории персоналом этой лаборатории) и *внешний* (со стороны контролирующих организаций).

Оба типа контроля ставят цели: определить, насколько достоверные, надежные и сравнимые результаты выдает лаборатория или конкретный лабораторный работник, выяснить, на каких этапах исследования допущены ошибки, приведшие к получению некачественных результатов, какова природа и причины ошибок; предложить пути к устранению ошибок.

Принципы контроля:

- Осуществление контроля на всех этапах исследования от забора материала до выдачи результата.
- Включение в проверяемые серии анализов стандартных контрольных образцов.
- Систематическая проверка всех лабораторий и всех сотрудников, особенно тех, показатели которых вызывают сомнения.

Проверке подлежат:

1. Точность результата.
2. Правильность результата (например, правильность идентификации микроорганизмов, величины титров антител). *Правильность или достоверность* — это качество измерений или результатов анализов, которое дает результат (среднее значение), соответствующий истинному.

3. Сравнимость результатов (в пределах лаборатории). *Сравнимость* — качество измерений, отражающее близость друг к другу результатов измерений, выполненных в одинаковых условиях.

4. Воспроизводимость результатов. *Воспроизводимость* — качество измерений или результатов анализов, отражающее близость друг к другу результатов измерений (анализов), выполненных в разных условиях (в разных лабораториях или в одной лаборатории, но в разное время или разными сотрудниками).

5. Сопоставимость и величина разброса результатов, выполненных в разных лабораториях.

Методы контроля

1. Рассылка в лаборатории контрольных стандартных образцов (пробы, мазки, штаммы, сыворотки и др.), количественные и качественные параметры которых неизвестны контролируемым лабораториям или лицам и известны контролирующим. Лаборатории должны дать ответы на образцы в строго определенный ограниченный срок.

2. Одновременное параллельное проведение исследования контролируемым и контролирующим лицом с последующим сопоставлением результатов.

3. Проверка правильности выполненной текущей работы (подбор и приготовление среды, раствора, реактива, разведения сыворотки, определения плотности бактериальной суспензии и др.).

4. Систематическое ведение графика распределения результатов каждого типа анализов в каждой лаборатории.

РАЗДЕЛ 3

МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Микробиологическая диагностика бактериальных инфекций включает в себя 5 основных методов:

1. *Микроскопический (бактериоскопический) метод* основан на изучении морфологических свойств микроорганизмов с использованием различных видов микроскопии.

2. *Культуральный (бактериологический) метод* основан на выделении чистых культур бактерий и их дальнейшей идентификации.

3. *Биологический (экспериментальный или биопроба) метод* основан на заражении лабораторных животных исследуемым материалом с целью воспроизведения у них инфекционного заболевания.

4. *Иммунологический метод* представляет собой совокупность методов, общим для которых служит использование в диагностических целях иммунологических реакций (варианты метода — серологическая идентификация микроорганизмов, серологический и аллергологический методы).

5. *Молекулярно-генетический метод* основан на обнаружении фрагментов генома (молекулы ДНК) возбудителя в биологическом материале (метод молекулярной гибридизации, полимеразная цепная реакция, секвенирование и др.).

Микроскопический (бактериоскопический) метод

Микроскопический метод — метод, основанный на *изучении морфологических свойств микроорганизмов* в исследуемом материале (патологический материал, лабораторная культура) с использованием различных видов микроскопии.

Основная цель метода — установление этиологии инфекционного заболевания, а также определение чистоты выделенной чистой культуры.

Достоинства метода: быстрое получение результатов, техническая и экономическая доступность, простота.

Недостатки метода: малая чувствительность (определяется около 10^5 и более бактерий в мл); в какой-то мере небезопасен (работа с живыми микроорганизмами); сложность в распознавании схожих по морфологии микроорганизмов разных видов и родов, из-за наличия микробов-двойников; невозможность идентифицировать в связи с изменением характерной морфологии микроорганизмов под действием ряда факторов внешней среды, в первую очередь антибиотиков. Эти обстоятельства приводят к тому, что лишь при наличии морфологических особенностей микроорганизмов и типичной локализации в сочетании с правильно выбранной окраской и типом микроскопии препарата могут позволить сделать заключение об этиологии заболевания. В иных случаях микроскопический метод чаще используется как ориентировочный, предварительный метод исследования, а при некоторых видах инфекции он вообще опускается. Бактериолог, получив ориентировочные сведения о предполагаемом возбудителе, его концентрации, сочетании с сопутствующей микрофлорой, определяет тактику дальнейшего выделения чистой культуры возбудителя.

Морфологические свойства микроорганизмов:

1. *Форма* микробной клетки (рисунок 1).

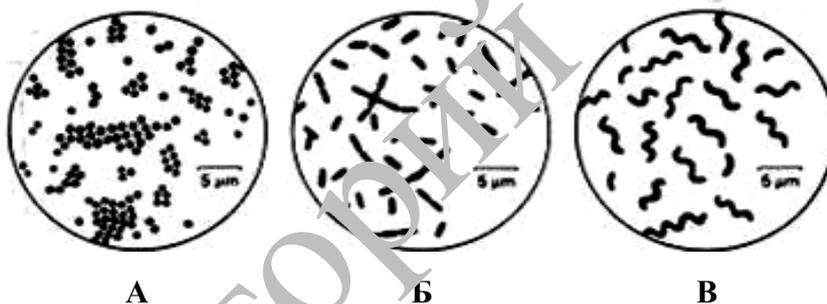


Рисунок 1 — Формы бактерий (на примере некоторых микробов):

А — кокковидные; Б — палочковидные; В — извитые

2. *Размеры* микробной клетки.

3. *Взаимное расположение особей в препарате* (рисунок 2).

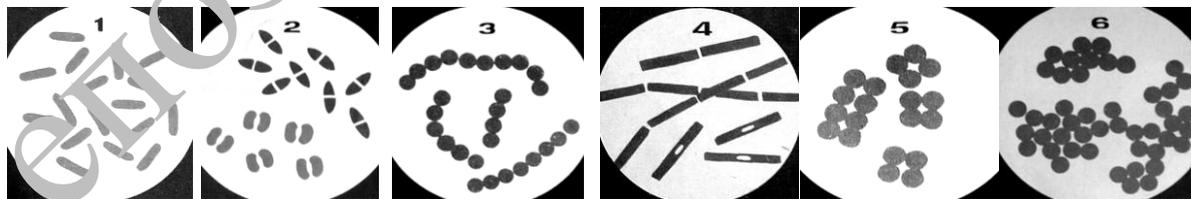


Рисунок 2 — Взаимное расположение особей в препарате (примеры):

1 — эшерихии (хаотичное, беспорядочное расположение); 2 — пневмококки, гонококки, менингококки (диплококки — располагаются парами); 3 — стрептококки (цепочки кокков); 4 — стрептобактерии (цепочки палочек); 5 — сарцины (пакеты кокков); 6 — стафилококки (образуют скопления в виде виноградной грозди)

4. *Защитные* (спора, капсула) и *дополнительные* (включения, жгутики и др.) *структурные компоненты* микроорганизма.

5. *Тинкториальные свойства* (способность микроорганизмов окрашиваться определенными красителями).

ЭТАПЫ БАКТЕРИОСКОПИЧЕСКОГО МЕТОДА

1. Забор исследуемого материала.
2. Транспортировка его в лабораторию, подготовка к исследованию
3. Приготовление микроскопического препарата.
4. Микроскопия и изучение морфологических свойств микроорганизмов.
5. Оценка результата и заключение.

ТИПЫ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

В лабораторной практике используют следующие типы микроскопических препаратов:

- 1) бактериологический препарат-мазок (фиксированный);
- 2) препарат-отпечаток;
- 3) мазки-близнецы;
- 4) «висячая» капля и «раздавленная» капля;
- 5) тонкий мазок крови;
- 6) «толстая» капля крови.

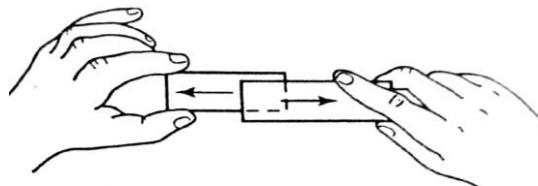
Бактериологический препарат-мазок. Бактериологический мазок используется наиболее часто. Этапы приготовления препарата-мазка: собственно приготовление мазка, его высушивание, фиксация, окрашивание.

Препарат-отпечаток

Готовят из органов группов следующим образом: прикасаются предметным стеклом к поверхности разрезов, выполненных стерильным скальпелем или вырезают из органа небольшой кусочек и, взяв его пинцетом, несколько раз прикасаются поверхностью разреза, как печатью, к предметному стеклу. Фиксируют мазки на пламени или, если хотят сохранить структуру клеточных элементов органа, в жидком фиксаторе: смесь Никифорова (равные объемы этилового спирта и эфира) — 15 мин, метиловый спирт — 5 мин. Окрашивают фуксином (или метиленовым синим) и по Граму.

Мазки-близнецы

Готовят из исследуемого материала вязкой консистенции, гноя и мокроты, следующим образом: материал прокаленным и остуженным пинцетом или петлей наносят на середину предметного стекла, затем плотно прикрывают его другим предметным стеклом так, чтобы осталась свободной треть первого и второго стекол. Взяв за свободные концы оба стекла, раздвигают их в стороны обеими руками: получаются два равномерных больших мазка



(рисунок 3).

Рисунок 3 — Приготовление мазка из гноя и мокроты

Препараты «висячая» капля и «раздавленная» капля

Используют при исследовании микроорганизмов в живом состоянии, главным образом, для изучения формы и подвижности бактерий. Особенности при приготовлении данных препаратов: их не фиксируют и не окрашивают. Более удобным способом для изучения препаратов «раздавленная» капля и «висячая» капля представляются темнопольная и фазово-контрастная микроскопия.

«Висячая» капля (рисунок 4). Каплю исследуемого материала наносят на середину обезжиренного покровного стекла. Затем берут второе предметное стекло с углублением в центре (лункой), предварительно смазав вазелином края лунки, и накладывают его на покровное стекло так, чтобы капля находилась против центра лунки. Препарат быстро переворачивают покровным стеклом кверху. Капля должна свободно свисать в углубление, не соприкасаясь с его дном и краями. В результате образовалась герметично закрытая влажная камера, в которой капля долго не высыхает.



Рисунок 4 — Схема приготовления препарата «висячая капля»

«Раздавленная» капля. На середину обезжиренного предметного стекла стерильной пастеровской пипеткой наносят каплю исследуемого материала. Осторожно накрывают («раздавливают») каплю покровным стеклом, накладывают его пинцетом так, чтобы в жидкости не образовались пузырьки воздуха. Капля должна заполнить все пространство между стеклами и не выступать за края покровного стекла.

Тонкий мазок крови

Каплю крови наносят на край обезжиренного предметного стекла. Мазок делают вторым предметным стеклом (желательно со шлифованным краем), установленным под углом 45° , продвигая его вдоль предметного стекла влево (рисунок 5). Получается равномерный тонкий мазок, который высушивают на воздухе. Фиксация мазка производится в жидком фиксаторе (смесь Никифорова — 15 мин, метиловый спирт — 3 мин), но не на пламени. Далее препарат окрашивают, например, по Романовскому — Гимзе.



Рисунок 5 — Приготовление тонкого мазка из крови

«Толстая» капля крови

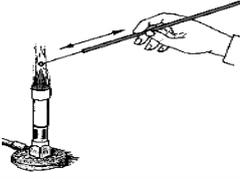
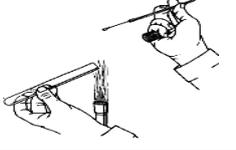
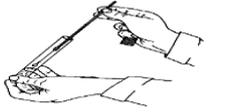
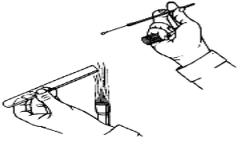
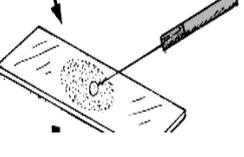
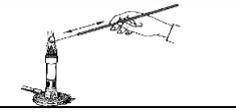
На предметное стекло наносят большую каплю крови или 2–3 обычные капли, которые смешивают петлей или углом второго стекла, чтобы получилось плоское кровяное пятно размером с небольшую монету. Препарат высушивают на воздухе, не фиксируют, и окрашивают по Романовскому — Гимзе.

БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ ПРЕПАРАТ-МАЗОК

Этапы приготовления препарата-мазка: собственно приготовление мазка (таблица 2); высушивание мазка; фиксация; окрашивание.

Собственно приготовление мазка

Таблица 2 — Техника приготовления препарата-мазка из культуры бактерий

| Этапы приготовления мазка | Схема этапов |
|--|---|
| 1. При приготовлении препарата-мазка из <i>агаровой культуры</i> бактерий на середину обезжиренного предметного стекла нанести небольшую каплю физиологического раствора; при приготовлении препарата-мазка из <i>бульонной культуры</i> бактерий физиологический раствор не используют |  |
| 2. Бактериальную петлю взять в правую руку, как пишущую ручку (левши — наоборот), и простерилизовать ее, внося в пламя горелки (спиртовки) в вертикальном положении, до покраснения. Затем перевести петлю в горизонтальное положение и провести ее в пламени, включая часть петледержателя |  |
| 3. Пробирку с агаровой культурой держать большим и указательным пальцами левой руки. Вынуть проволочку из пробирки мизинцем правой руки, в которой петля, и обжечь в пламени спиртовки края горлышка пробирки |  |
| 4. Простерилизованную петлю быстро ввести внутрь пробирки, охладить и прикоснуться к налету на скошенном агаре или же погрузить ее в бульонную культуру |  |
| 5. Не касаясь стенок пробирки, вынуть петлю, еще раз быстро обжечь края пробирки и пробку над спиртовкой, закрыть пробирку и поставить в штатив |  |
| 6. Внести бактериальной петлей взятый материал <i>агаровой культуры</i> бактерий в каплю физиологического раствора или нанести петлей или стерильной пастеровской пипеткой каплю <i>бульонной культуры</i> на предметное стекло и круговыми движениями петли равномерно распределить в виде мазка диаметром 1,0–1,5 см |  |
| 7. Простерилизовать петлю в пламени спиртовки |  |

Высушивание мазка. Высушить мазок при комнатной температуре. Для ускорения предметное стекло с мазком, обращенным кверху, высушить над пламенем спиртовки в струе теплого воздуха.

Фиксация мазка

Производится с целью:

- 1) убить микробы и сделать безопасным дальнейшее обращение с ними;
- 2) закрепить мазок на стекле, чтобы он не смылся при дальнейших манипуляциях;
- 3) сделать микробов более восприимчивыми к окраске, так как убитые микробные клетки окрашиваются лучше, чем живые.

Способы фиксации:

• Фиксация жаром

Наиболее простой, пригодный почти для всех объектов и самый распространенный в микробиологии. Принцип метода: стекло с мазком, обращенным кверху, берут указательным и большим пальцами за край и проводят в пламени 3–4 раза в течение 5–6 с.

• Фиксация жидкими фиксаторами

Применяется при исследовании мазков крови, препаратов из мокроты, гноя, органов и тканей, для которых фиксация жаром оказывается слишком грубой, изменяя структуру клеток. При этом фиксатор наливают на мазок или препарат погружают в сосуд с фиксирующей жидкостью на определенное время, а затем высушивают.

Используют следующие жидкие фиксаторы:

- этиловый спирт — 10–15 мин;
- метиловый спирт — 3–5 мин;
- ацетон — 5 мин;
- смесь Никифорова (равные объемы этанола и эфира) — 15 мин.

Окраска мазка

Способы окрашивания микроорганизмов делятся на: *простые* и *сложные*, или дифференциальные.

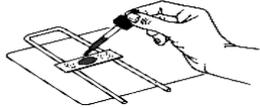
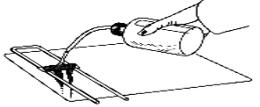
Способность микроорганизмов воспринимать красители называется *тинкториальными свойствами*.

ПРОСТЫЕ МЕТОДЫ ОКРАСКИ

При *простой окраске* употребляется только один краситель, например, из группы анилиновых красителей: водный фуксин (фуксин Пфейффера) — экспозиция 1–2 мин или метиленовый синий (синька Леффлера) — экспозиция 3–5 мин (таблица 3). Простые методы окраски позволяют определить наличие бактерий в препарате, их форму, размеры и взаиморасположение особей в микроскопическом препарате.

Таблица 3 — Простой способ окрашивания препарата-мазка с применением анилинового красителя

| Этапы окрашивания препарата-мазка простым способом | Схема этапа |
|--|-------------|
|--|-------------|

| | |
|---|---|
| 1. На фиксированный мазок нанести несколько капель одного красителя; выдержать время экспозиции |  |
| 2. Смыть краситель дистиллированной водой |  |
| 3. Высушить препарат фильтровальной бумагой |  |

СЛОЖНЫЕ МЕТОДЫ ОКРАСКИ

Сложные методы окрашивания включают последовательное использование нескольких красителей. Это позволяет выявить определенные структуры микробных клеток и дифференцировать отдельные виды микроорганизмов от других. *К сложным методам окраски относятся:* окраску по Граму, по Цилю — Нельсену, по Бурри — Гинсу, по Нейссеру, по Здрадовскому, по Романовскому — Гимзе и другие (таблица 4).

Таблица 4 — Сложные методы окраски клеточных структур бактерий и некоторых микроорганизмов

| Метод окраски | Структура бактерий | Некоторые микроорганизмы |
|-------------------------|--|--|
| По Граму | Клеточная стенка | |
| По Бурри — Гинсу | Капсула | |
| По Цилю — Нельсену | Споры | Кислотоустойчивые бактерии (а именно — микобактерии) |
| По Ожешко | Споры | |
| По Нейссеру | Включения (зерна волютина у коринебактерий дифтерии) | |
| По Романовскому — Гимзе | Нуклеоид | Риккетсии, хламидии, спирохеты, простейшие |
| По Здрадовскому | | Риккетсии |

Окраска по Граму

Используется для определения типа строения *клеточной стенки*. Это основной метод в бактериологии. В зависимости от окраски по Граму все бактерии подразделяются на грамположительные и грамотрицательные. Грамположительные бактерии окрашиваются в *сине-фиолетовый*, а грамотрицательные — в *красный цвет*. Техника окраски представлена в таблице 5.

Таблица 5 — Техника окраски по Граму

| Этап окраски | Результат окраски на данном этапе |
|--------------|-----------------------------------|
|--------------|-----------------------------------|

| | |
|---|---|
| 1. Фиксированный мазок окрашивается генциановым фиолетовым (генцианвиолетом — ГВ) : в модификации Синева на мазок кладут полоску фильтровальной бумаги, пропитанную раствором ГВ, и наносят 2–3 капли дистиллированной воды. Экспозиция — 1–2 мин. Далее бумагу снимают, а краситель сливают | И грамположительные (Гр+) и грамотрицательные (Гр–) бактерии окрашиваются этой краской в сине-фиолетовый цвет |
| 2. Наносят раствор Люголя на 1 минуту (мазок чернеет), после экспозиции его сливают | И Гр+ и Гр– бактерии на этом этапе остаются сине-фиолетовыми |

Окончание таблицы 5

| Этап окраски | Результат окраски на данном этапе |
|---|--|
| 3. Обесцвечивают препарат 96 % этиловым спиртом в течение 20–30 секунд, покачивая препарат, до прекращения отхождения фиолетовых струек красителя. Далее препарат промывают водой | У Гр+ бактерий за счет большого количества пептидогликана в клеточной стенке ГВ и йод образуют прочное соединение, которое удерживается при обесцвечивании спиртом (Гр+ бактерии остаются сине-фиолетовыми). А у Гр– бактерий, вследствие более тонкого слоя пептидогликана, красящий комплекс вымывается спиртом и, следовательно, они станут бесцветными |
| 4. Докрашивают мазок водным фуксином (1–2 мин), промывают водой, высушивают фильтровальной бумагой, наносят каплю иммерсионного масла и микроскопируют | Гр+ бактерии остаются <i>сине-фиолетовыми</i> , а Гр– бактерии, которые на предыдущем этапе обесцвелились, окрашиваются в <i>красный цвет</i> |

Окраска по Нейссеру

Является одним из методов для выявления *волутиновых зерен*.

Техника окраски

1. Фиксированный мазок окрашивают уксуснокислой синькой Нейссера 1–2 минуты, затем сливают краску, промывают водой.
3. Обрабатывают раствором Люголя 20–30 с.
4. Окрашивают везувином 0,5–1 мин.; промывают водой, высушивают фильтровальной бумагой, наносят иммерсионное масло и микроскопируют.

Зерна волутина в клетке бактерии являются включениями, по химической структуре представляют собой полифосфаты. Особенность волутина – способность к метахромазии, т. е. при сложной окраске они адсорбируют иные красители, чем цитоплазма, окрашиваясь в другой цвет. В связи с этим они называются также метахроматическими зёрнами.

Волутиновые зерна обнаруживаются, например, у коринебактерий дифтерии (рисунок 6), и при окраске по Нейссеру цитоплазма бактерий окрашивается в желтый цвет, а зерна волутина — в темно-синий, почти черный цвет.



Рисунок 6 — Коринебактерии дифтерии

Окраска по Цилю — Нельсену

Применяют для выявления *кислотоустойчивых бактерий* и *спор* (таблица 6).

Таблица 6 — Техника окраски по Цилю — Нельсену

| Этап окраски | Результат окраски на данном этапе | |
|--|--|--|
| | Спорообразующие бактерии (напр., бациллы, клостридии) | Кислотоустойчивые бактерии (напр., микобактерии туберкулеза) |
| 1. На фиксированный мазок накладывают фильтровальную бумагу, на которую наносят карболовый фуксин Циля, и 3 раза подогревают над пламенем спиртовки до появления паров, подливая краситель. После остывания мазка бумагу снимают | Вегетативные тела бактерий и споры окрашиваются в красный цвет | Бактерии окрашиваются в красный цвет |

Окончание таблицы 6

| Этап окраски | Результат окраски на данном этапе | |
|---|--|---|
| | Спорообразующие бактерии (напр., бациллы, клостридии) | Спорообразующие бактерии (напр., бациллы, клостридии) |
| 2. Препарат обесцвечивают 5 % раствором серной кислоты, погружая в стаканчик с кислотой на несколько секунд, после чего препарат промывают водой | Вегетативные тела бактерий обесцвечиваются, а споры — нет, так как споры обладают кислотоустойчивостью | Кислотоустойчивые бактерии кислотой не обесцвечиваются, остаются красными |
| 3. Препарат докрасивают метиленовым синим 3–5 мин, промывают водой, высушивают фильтровальной бумагой, наносят иммерсионное масло, микроскопируют | Вегетативные тела бактерий докрасиваются в синий (голубой) цвет, а споры остаются красными | Кислотоустойчивые бактерии остаются красного цвета |

Из-за особенностей своего химического состава споры не воспринимают анилиновые красители при обычном режиме окраски и остаются бесцветными (рисунок 7) внутри окрасившихся вегетативных тел бактерий (например, при окраске водным фуксином вегетативные тела бактерий окрасятся в красный цвет, а споры — бесцветные).

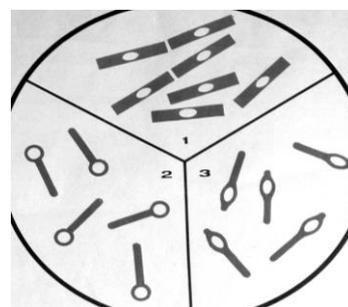


Рисунок 7 — Спорообразующие бактерии:

1 — бациллы; 2 и 3 — клостридии

Чтобы споры прокрасились, необходимо использование сочетанного действия трех факторов: воздействие концентрированных растворов красок, высокой температуры и обработка кислотой (так называемое термокислотное прокрашивание). Все это достигается специальными сложными методами окраски.

Окраска по Ожешко

Этот метод окраски также можно применить для выявления спор.

Техника окраски

1. На высушенный и нефиксированный мазок наносят 0,5 % раствор

соляной кислоты для размягчения оболочки споры («протравливания») и подогревают около 2 мин (до появления паров); промывают водой, высушивают, фиксируют в пламени.

2. Далее препарат окрашивают по Цилю — Нельсену.

При микроскопии спорообразующих бактерий споры за счет своей кислотоустойчивости рубиново-красного цвета, а вегетативные тела бактерий — синего.

Окраска по Бурри — Гинсу

Используют для выявления *капсул*.

Техника окраски

1. В каплю туши, разведенной водой в 10 раз, вносят исследуемые бактерии, равномерно перемешивают и при помощи стекла готовят препарат так же, как и мазок крови.

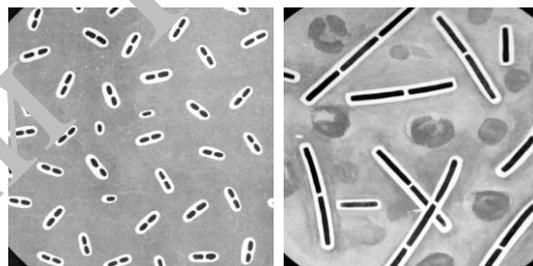
2. Мазок высушивают, фиксируют в пламени.

3. Окрашивают водным фуксином в течение 3–5 мин, промывают водой, высушивают, наносят иммерсионное масло и микроскопируют.

Микроскопическая картина.

В препарате по Бурри — Гинсу на темном тушевом фоне *капсулы* видны в виде *бесцветных* светлых ореолов вокруг красных бактерий (рисунки 8а).

При использовании простого метода окраски (например, метиленовым синим или водным фуксином), который может применяться для окраски *капсульных микроорганизмов в мазках из органов и тканей*, вокруг бактерий также обнаруживается бесцветный ореол, т. к. капсула не окрашивается (рисунки 8б).



а

б

Рисунок 8 — Капсульные бактерии (капсула имеет вид неокрашенного ореола вокруг клетки):

а — клебсиеллы в чистой культуре;
б — бациллы сибирской язвы в органах

Окраска по методу Здрадовского (модифицированный метод Циля — Нельсена)

Используют для выявления *риккетсий*.

Техника окраски

1. Фиксированный препарат-мазок окрашивают разведенным карболовым фуксином — 5 мин.

2. Погружают препарат на несколько секунд в слабый раствор органической кислоты (напр., 1 % лимонной или уксусной) и промывают водой.

3. Докрашивают метиленовым синим 5 минут. Промывают водой.

Микроскопическая картина: риккетсии окрашиваются в рубиново-красный цвет (вследствие относительной кислотоустойчивости), а остальные клетки и элементы препарата — в синий и голубой цвет.

Окраска по Романовскому — Гимзе

Техника окраски

1. Готовят микроскопический препарат и обрабатывают его в жидком фиксаторе.

2. Помещают фиксированный препарат на два стеклянных валика в чашку Петри вниз ко дну и в щель сбоку подливают разведенный в 10–20 раз свежеприготовленный краситель, который в этой замкнутой камере долго не высыхает. Краситель состоит из эозина, метиленового синего и азура, растворенных в смеси метанола с глицерином. Окрашивание длится от 30–60 мин до нескольких часов.

3. Мазки промывают водой и высушивают на воздухе.

Этот метод окраски является одним из основных методов при изучении морфологии *спирохет, риккетсий, хламидий, простейших*, а также при исследовании форменных элементов крови, и под действием красителя сложного состава они окрашиваются в различные цвета и оттенки. Например, спирохеты разных родов окрашиваются по Романовскому — Гимзе следующим образом: трепонемы — в бледно-розовых, лептоспиры — розово-красный, а боррелии — в сине-фиолетовых.

МИКРОСКОПЫ И МЕТОДЫ МИКРОСКОПИИ

Для изучения морфологии микрорганов применяют микроскопы. Микроскоп (от греческого слова *micro* — малый и *scopos* — смотрю) служит для изучения малых объектов, невидимых невооруженным глазом. В микробиологии микроскопом пользуются для изучения как живых, так и убитых микробов в окрашенном или неокрашенном виде.

В микробиологии используют *два вида микроскопии* — электронную и световую. *Световые* микроскопы предназначены для изучения микроорганизмов, которые имеют размеры не менее 0,2 мкм, а *электронные* микроскопы — для изучения более мелких объектов (вирусы и структуры микроорганизмов). Методы микроскопии представлены в таблице 7.

Таблица 7 — Методы микроскопии

| Методы микроскопии | Особенности микроскопа | Принцип метода и цель применения |
|---------------------------|---|---|
| Электронная микроскопия | Электронный микроскоп | Вместо световой волны используется поток электронов, что позволяет увеличить чувствительность метода на несколько порядков. Используется для изучения вирусов, ультраструктуры бактериальной клетки |
| Световая обычная световая | Обычный биологический микроскоп, «сухой» объектив | Принцип метода рассматривается в курсе физики. Используется в микробиологии редко (для микроскопии препарата «раздавленная капля» при определении подвижности бактерий) |

| | | | |
|--|---------------------|---|--|
| | иммерсионная | Обычный биологический микроскоп, оснащенный специальным иммерсионным объективом | Объектив погружают в иммерсионное масло (кедровое, персиковое, вазелиновое), показатель преломления которого близок к показателю преломления стекла (1,52). Благодаря этому пучок света, вышедший за пределы предметного стекла, не рассеивается, и лучи, не меняя направления, попадают в объектив, чем и достигается наилучшее освещение мельчайших объектов. Используется в бактериологии наиболее часто для изучения различных микроорганизмов |
| | темнопольная | Обычный биологический микроскоп со специальным темнопольным конденсором | Все прямые лучи минуют объектив, а в объектив попадают лишь те из них, которые преломились на объекте микроскопирования. Поэтому микробы видны как светящиеся объекты на темном фоне. Используют для обнаружения спирохет, подвижности микроорганизмов |

Окончание таблицы 7

| Методы микроскопии | | Особенности микроскопа | Принцип метода и цель применения |
|-----------------------------|---------------------------|---|---|
| Световая микроскопия | фазово-контрастная | Обычный биологический микроскоп оснащается специальной приставкой с особым набором линз | Смещение фазы колебания световой волны, происходящее при ее прохождении через прозрачные объекты и не воспринимаемое человеческим глазом, с помощью фазово-контрастного устройства преобразовывается в изменение амплитуды световой волны, что воспринимается нашим глазом (объект становится видимым). Применяют для изучения в неокрашенных препаратах живых объектов, внутреннее строение микробов |
| | люминесцентная | Особый люминесцентный микроскоп | Основана на способности некоторых клеток и флуоресцентных красителей светиться при попадании на них ультрафиолетовых и других коротковолновых лучей света. Для обработки мазков в качестве флуорохромов используют аурамин, акридиновый оранжевый, флуоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ), корифосфин. Широко используют в микробиологии (для выявления некоторых видов бактерий и для оценки РИФ) |

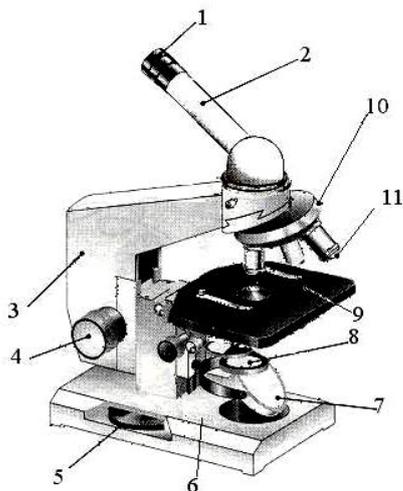
Устройство светового микроскопа

В микроскопе различают механическую и оптическую части (таблица 8).

Таблица 8 — Строение микроскопа

| Механическая часть | Оптическая часть |
|---|--|
| Штатив (состоит из основания и тубусодержателя) Тубус с revolverом для крепления и смены объективов Предметный столик для препарата Приспособления для крепления конденсора и светофильтров Встроенные в штатив механизмы для грубого (макрвинт) и тонкого (микровинт) перемещения тубуса | Окуляр Объективы Осветительная система, которая состоит из расположенных под предметным столиком конденсора Аббе, диафрагмы, зеркала |

Схема устройства светового микроскопа представлена на рисунке 9.



- 1 — окуляр;
- 2 — тубус;
- 3 — тубусодержатель;
- 4 — макровинт;
- 5 — микровинт;
- 6 — основание штатива;
- 7 — зеркало;
- 8 — конденсор;
- 9 — предметный столик для препарата,
- 10 — револьвер для объективов;
- 11 — объективы

Рисунок 9 — Устройство светового студенческого микроскопа

Зеркало служит для отражения световых лучей и направления их через конденсор в объектив. Одна сторона зеркала плоская, другая — вогнутая. Плоским зеркалом пользуются при дневном рассеянном свете, а вогнутым — при искусственном освещении.

Конденсор Аббе представляет собой двояковыпуклую линзу. Конденсор служит для собирания (конденсации) отраженных от зеркала пучка световых лучей, что обеспечивает наибольшее освещение препарата. 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 микроскопировании неокрашенных препаратов конденсор следует также опустить.

Между зеркалом и конденсором помещается **диафрагма**, которая регулирует объем лучей, падающих на объектив. Состоит диафрагма из стальных лепестков и при помощи рычага может суживаться или расширяться наподобие зрачка глаза. Окрашенные препараты следует рассматривать при совершенно открытой диафрагме. При рассматривании неокрашенных препаратов следует сузить отверстие диафрагмы.

Объективы представляют собой систему двояковыпуклых линз, заключенных в металлическую оправу, на которой наносится цифра, указывающая увеличение. Передняя (фронтальная) самая маленькая линза объектива является главной, производящей увеличение. Лежащие за ней линзы называются коррекционными, так как они предназначены для устранения недостатков оптического изображения. Объективы светового микроскопа различают по конструкции и качеству изображения, увеличению и среде, которая находится между объективом и исследуемым препаратом. Различают **объективы «сухие»** (их увеличение $\times 8$, $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$) — между

объективом и рассматриваемым препаратом находится воздух, и **иммерсионные**, или погружные (от латинского *immergo* — погружаю; их увеличение $\times 90$, $\times 100$) — *объектив погружают в каплю масла*, которое предварительно наносят на предметное стекло.

При использовании «сухого» объектива световые лучи, идущие от зеркала через конденсор в объектив, проходят через неоднородные среды различающиеся показателями преломления (показатель преломления воздуха равняется 1,0, а стекла — 1,52). При этом часть лучей отклоняется и не попадает в объектив (рисунок 10а), что значительно снижает освещение изучаемого объекта. Следовательно, обычная световая микроскопия с «сухим» объективом, имеющим слабое увеличение, в микробиологии используется редко — для изучения микроорганизмов, имеющих крупные размеры (более 10 мкм).

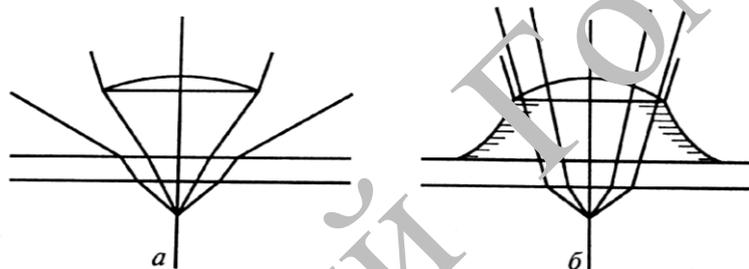


Рисунок 10 — Ход лучей в сухой (а) и иммерсионной (б) системах

Чтобы увеличить разрешающую способность микроскопа и исследовать более мелкие микроорганизмы, в микробиологии используют **иммерсионную систему световой микроскопии**. Иммерсионные объективы отличаются от «сухих» объективов по своему устройству (подвижная фронтальная линза) и по внешнему виду. Для иммерсионной микроскопии может использоваться кедровое масло или специальное синтетическое **иммерсионное масло**, показатель преломления которого близок к показателю преломления стекла ($\approx 1,52$). В таком случае *пучок света, вышедший за пределы предметного стекла, не рассеивается и лучи, не меняя направления, попадают в объектив* (рисунок 10б); разрешающая способность микроскопа увеличивается.

Окуляр (от латинского слова *oculus* — глаз) имеет две линзы: верхняя линза называется глазной, нижняя — собирающей. Расстояние между линзами равно полусумме их фокусных расстояний. На окулярах имеются цифры, указывающие на увеличение, которое они дают: $\times 7$, $\times 10$, $\times 15$.

Общее увеличение микроскопа равно произведению увеличения объектива на увеличение окуляра. Например, комбинация иммерсионного объектива $\times 90$ с окуляром $\times 7$ дает увеличение объекта в 630 раз.

Однако увеличение микроскопа не определяет качества изображения. Качество изображения, его четкость, определяется разрешающей способностью микроскопа. **Разрешающая способность светового микроскопа** — это наименьшее расстояние между двумя точками препарата, при котором они видны раздельно; **равна 0,2 мкм**. Размеры микроорганизмов, имеющих клеточное строение, составляют 0,2–20 мкм (чаще 0,5–10 мкм) и они легко обнаруживаются в иммерсионном микроскопе.

Правила работы с иммерсионной системой микроскопа

Перед работой проверяют исправность микроскопа и чистоту оптики.

1. Конденсор с помощью специального винта перемещают вверх до упора.
2. Открывают диафрагму (для окрашенных препаратов).
3. Опускают объектив малого увеличения (например, $\times 8$) на расстояние 0,5 см от предметного столика и, вращая зеркало, регулируют освещение поля зрения (при малой освещенности используют вогнутое зеркало, при достаточной — плоское).
4. Поворачивая револьвер, устанавливают иммерсионный объектив (например, с увеличением $\times 90$).
5. На предметный столик помещают препарат с каплей иммерсионного масла и закрепляют клеммами.
6. Под визуальным контролем сбоку с помощью макрометрического винта погружают иммерсионный объектив в каплю масла на препарате.
7. Глядя в окуляр, макровинтом медленно поднимают тубус до появления изображения в поле зрения. Затем с помощью микрометрического винта устанавливают четкое изображение объекта.
8. Во время микроскопирования правой рукой производят вращение микровинта, левой — передвижение препарата.
9. После просмотра препарата макровинтом поднимают тубус, снимают препарат, протирают фронтальную линзу иммерсионного объектива от остатков масла мягкой салфеткой.

Бактериологический (культуральный) метод

Бактериологический (культуральный) метод диагностики основан на *выделении* из патологического материала *чистой культуры* микроорганизмов на питательных средах и дальнейшей *ее идентификации*.

Как правило, выделенный от больного или из окружающей среды микроб нельзя быстро и точно идентифицировать. Для этих целей необходимо использовать множество фено- и генотипических признаков, точно выявляемых определенными тестами (методами). Базовой таксономической единицей у бактерий является *вид*.

Вид — это эволюционно сложившаяся совокупность микроорганизмов, имеющих единое происхождение, экологическое единство, сходный генотип и максимально близкие фенотипические признаки и свойства.

Генетические механизмы, лежащие в основе изменчивости микроорганизмов, обеспечивают только относительную стабильность признаков, которые в пределах вида могут варьировать. Отсюда сложилось представление о *вариантах (варах, типах) микроорганизмов*, которые отличаются отдельными признаками от стандартных видов.

В зависимости от характера дифференциального признака выделяют *морфовары* (отличие по морфологическим признакам), *резистенсвары* (по устойчивости к антибиотикам), *фаговары* (фаготипы) — по чувствительности к бактериофагам, *серовары* (серотипы) — по антигенной структуре, *хемовары* (типы) — по биохимическим свойствам, *биовары* — по биологическим свойствам, *колициновары* — по продукции бактерицинов, *геновары* (типы) — по строению части генома. *Патоеар* (тип) — штамм или несколько штаммов бактерий одного вида с одинаковыми или близкими патогенетическими свойствами (вирулентностью).

Идентификация — установление таксономического положения микроорганизмов и, прежде всего, их видовой принадлежности. Определение видовой принадлежности является решающим моментом бактериологической диагностики инфекционных заболеваний. Чаще всего для идентификации патогенных бактерий изучают их морфологические, тинкториальные, культуральные, биохимические и антигенные свойства.

Микроорганизмы, за исключением облигатных внутриклеточных паразитов (риккетсии, хламидии, вирусы), могут культивировать на искусственных питательных средах.

ПОНЯТИЕ О КУЛЬТИВИРОВАНИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Культивирование — выращивание микроорганизмов на искусственных питательных средах.

Цели культивирования:

1. Получение чистых культур патогенных микроорганизмов и их идентификация с целью постановки микробиологического диагноза инфекционного заболевания (т. е. культивирование является составной частью бактериологического метода исследования).

2. В санитарной микробиологии для определения санитарно-показательных микробов — индикаторов загрязнения окружающей среды.

3. Накопление биомассы продуцентов биологически активных веществ (витаминов, аминокислот, антибиотиков и др.).

4. Получение диагностических и профилактических препаратов (диагностикумов, вакцин).

5. Хранение эталонных музейных культур микроорганизмов.

6. В научных целях при изучении различных биологических свойств микроорганизмов.

В микробиологии широко применяются специальные термины: чистая культура, изолят, штамм, клон.

Чистая культура — это популяция микроорганизмов одного вида, выращенная на питательной среде. **Смешанная культура** — совокупность популяций бактерий разных видов. Термином «*популяция*» обозначают совокупность бактерий одного вида, вегетирующих в определенном объеме или выращенных на искусственной питательной среде из одной или нескольких клеток.

Изолят — популяция бактериальных клеток в чистой культуре, полученная в лаборатории из одной колонии с питательной среды и идентифицированная до уровня вида.

Штамм — чистая культура микроорганизмов одного вида, выделенная из определенного источника в определенное время (одномоментно), или из одного и того же источника в разное время. Штаммы одного вида могут несущественно отличаться биохимическими, генетическими, серологическими, биологическими и другими свойствами, а также местом и временем выделения. Каждый вид бактерий имеет *типовой штамм*, который является своеобразным его эталоном. Типовые штаммы имеют наиболее полную биологическую характеристику и хранятся в специальных коллекциях. Коллекции бактерий имеются во многих странах мира. Наиболее обширные из них находятся в США (Американская коллекция типовых культур — АТСС), Англии, Франции, Германии, Японии, Индии, России. Имеются коллекции микроорганизмов и в Республике Беларусь. Соответствующие типовые мест-культуры необходимо использовать для контроля точности и стандартности проведения исследований (например, при определении чувствительности выделенной чистой культуры бактерий к антибиотикам в качестве контрольных штаммов используют типовые культуры с известной антибиотикочувствительностью, тестирование которых проводят параллельно с тестированием клинических изолятов).

Клон — культура микроорганизмов, полученная в результате размножения одной бактериальной клетки.

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

Питательные среды применяются для искусственного выращивания микроорганизмов. В частности, питательные среды предназначены для накопления, выделения, изучения и сохранения микроорганизмов.

По своей сущности питательные среды являются искусственной средой обитания микробов, поэтому при их составлении учитывают как по-

требности микроорганизмов в веществах, необходимых для жизни, так и физико-химические условия, в которых микроорганизмы могут осуществлять обмен между клеткой и средой.

Требования, предъявляемые к питательным средам:

1) достаточное содержание питательных веществ, необходимых для жизнедеятельности микробной клетки — основных органических веществ (углеводов, аминокислот, витаминов, пурины, пиримидины и др.) — для ауксотрофов;

2) наличие факторов роста различного происхождения (аминокислоты, витамины, пурины, пиримидины и др.) — для ауксотрофов;

3) изотоничность среды для микробной клетки (для большинства микробов — 0,5 % NaCl; а для галотолерантных стафилококков — 7–10 % NaCl);

4) оптимальный показатель pH среды (большинство патогенных бактерий растут преимущественно при pH 7,2–7,6; алкалефилы (холерный вибрион) способен расти на средах со щелочным показателем pH 8,0–9,0; ацидофилы растут на средах с кислым показателем pH 4,0–5,0; туберкулезная палочка как относительный ацидофил нуждается в слабокислом pH 6,2–6,8);

5) определенный ОВП (окислительно-восстановительный потенциал) среды;

6) обязательная стерильность среды, т. к. посторонние микроорганизмы препятствуют росту изучаемого микроба, определению его свойств, приводят к заблуждению в правильной идентификации этиологического агента заболевания;

7) достаточная влажность (не менее 60 %) — для оптимального процесса диффузии питательных веществ в клетку;

8) определенная консистенция среды;

9) прозрачность.

Классификации питательных сред

Потребности в питательных веществах и свойствах среды у разных микроорганизмов неодинаковы. Это исключает возможность создания единой универсальной среды для всех микробов. Кроме того, на выбор той или иной среды влияют цели исследования.

В настоящее время предложено огромное количество сред, в основу классификации которых положены разнообразные признаки, представленные в таблице 9.

Таблица 9 — Классификация питательных сред

| Признак | Виды сред |
|---------|-----------|
|---------|-----------|

| | |
|--------------------|--|
| Происхождение | <ul style="list-style-type: none"> • Естественные — это среды из натуральных продуктов (молока, мяса, яиц, картофеля, сыворотки крови человека, животных и др.). • Искусственные — приготовленные искусственным путем специально для выращивания микроорганизмов; состав их относительно постоянен, они стандартны, широко используются в диагностических лабораториях. • Синтетические — среды со строго определенным составом входящих в них ингредиентов, создаются с учетом питательных потребностей микроба, применяют для выращивания микроорганизмов при получении антибиотиков, вакцин |
| Консистенция | <ul style="list-style-type: none"> • Плотные (в качестве уплотнителя питательных сред применяют 2–3 % агар-агар — из морских водорослей, желатин, диоксид кремния и др.). • Жидкие (бульон, молоко, пептонная вода). • Полужидкие (полужидкий агар содержит 0,5 % агар-агара) |
| Состав | <ul style="list-style-type: none"> • Простые — мясо-пептонный бульон (МПБ), мясо-пептонный агар (МПА), пептонная вода (ПВ). • Сложные — получают путем добавления к простым средам стимулирующих добавок, необходимых для размножения того или иного микроорганизма: кровь, сыворотку, сахара, асцитическую жидкость. Примеры сред: кровяной агар, сывороточный агар и бульон, сахарный агар и бульон, асцитический агар и бульон и др. |
| Целевое назначение | <ul style="list-style-type: none"> • Основные, общего назначения — предназначены для культивирования большинства нетребовательных микроорганизмов (МПА, МПБ). • Специальные — служат для выделения и выращивания микроорганизмов, не растущих на основных простых средах. Примеры сред: кровяной агар, сывороточный агар и бульон, сахарный агар и бульон и другие. |

Окончание таблицы 9

| Признак | Виды сред |
|--------------------|---|
| Целевое назначение | <ul style="list-style-type: none"> • Элективные (селективные) — избирательно способствуют росту одного вида микробов, задерживая или подавляя рост сопутствующих микроорганизмов. Такой эффект достигается при добавлении различных ингибиторов роста микробов (определенных антибиотиков, солей, желчи), изменении показателя рН, состава питательных веществ в среде и др. Примеры: солевой агар для стафилококков, щелочной агар для холерного вибриона. • Дифференциально-диагностические — среды, позволяющие отличить (дифференцировать) один вид микроба от другого, по их росту, ферментативной активности и другим признакам. В состав этих сред, кроме питательных веществ, включают субстрат как дифференцирующий фактор (например, углевод), и индикатор. Ферментативное расщепление субстрата микроорганизмами приводит к накоплению продуктов расщепления и сдвигу рН, что сопровождается окрашиванием среды и колоний в цвет индикатора. Примеры: Эндо, Левина, Гисса (для энтеробактерий) и др. • Дифференциально-элективные — среды, сочетающие в себе свойства дифференциально-диагностических и элективных сред. Они содержат, кроме питательных веществ, субстрат как дифференцирующий фактор, элективный химический субстрат, препятствующий росту других видов бактерий, и, в некоторых случаях, индикатор. Примеры: среда Плоскирева для шигелл и сальмонелл, желточно-солевой агар (ЖСА) для стафилококков. |

| | |
|--|--|
| | <ul style="list-style-type: none"> • Хромогенные — новый тип сред, получающий в последнее время широкое распространение в ускоренной диагностике инфекционных заболеваний. На хромогенных средах по цвету колоний можно проводить предварительную идентификацию микроорганизмов. В состав таких сред, кроме ростовых и селективных компонентов, входит меченый хромогеном субстрат (субстраты). При разложении субстрата микроорганизмами различных видов вырастают колонии, окрашенные в разные цвета. Разработаны хромогенные среды для выделения и предварительной идентификации листерий, сальмонелл, шигелл, кандид и других микробов. • Среды обогащения — среды для размножения и накопления бактерий определенного вида и подавления роста сопутствующей микрофлоры (например, щелочная пептонная вода для холерного вибриона, солевой МПБ для стафилококка, желчный бульон для сальмонелл). • Транспортные и консервирующие — среды для временного сохранения микроорганизмов после взятия исследуемого материала и при транспортировке его в лабораторию; бактерии при этом сохраняют жизнеспособность, но не размножаются в них, поэтому количественный и качественный состав микрофлоры не изменяется (например, среда Амиса — полужидкий агар с активированным углем) |
|--|--|

Приготовление питательных сред и их стерилизация

Большинство питательных сред, используемых в бактериологии, представляют собой высушенные концентраты в заводской фасовке, которые взвешивают (берут навеску среды согласно инструкции на этикетке), растворяют в дистиллированной воде и кипятят до полного растворения компонентов. Далее питательные среды стерилизуют и разливают в стерильную лабораторную посуду. Следовательно, лабораторную посуду (стеклянные пробирки, чашки Петри и др.), как и питательные среды, необходимо простерилизовать (таблица 10).

Таблица 10 — Способы и режимы стерилизации питательных сред и стеклянной посуды

| Стерилизуемые объекты | Аппаратура | Способы и режимы стерилизации |
|--|---|---|
| Стеклопластиковые изделия (пробирки, чашки Петри) | Воздушный стерилизатор (сухожаровой шкаф) | Стерилизация горячим воздухом (180 °С, 60 мин) |
| Основные питательные среды (МПА, МПБ) | Паровой стерилизатор (автоклав) | Стерилизация паром под давлением (121 °С, давление 1 атм., 20 мин) |
| Среды с углеводами | Паровой стерилизатор (автоклав) | Стерилизация паром под давлением (112 °С, давление 0,5 атм., 15 мин) |
| Сложные питательные среды | Паровой стерилизатор (автоклав) | Дробная стерилизация (100 °С, 0 атм. «текущий пар», 3 дня по 30 мин) |
| Питательные среды, содержащие белок, сыворотку, витамины | Водяная баня → | Дробная стерилизация (тиндализация) — прогревание сред при 56–58 °С в течение 1 ч, 5–6 сут подряд. Стерилизация фильтрованием |
| | Фильтры (глубинные, мембранные) → | |

При стерилизации воздушным методом стеклянные пробирки, закрытые ватными пробками, и чашки Петри стерилизуют упакованными в специальную бумагу (бумажные пакеты), что позволяет сохранить стерильность после проведенной стерилизации некоторый период времени.

При паровом методе используют стальные стерилизационные коробки (биксы), в которые помещают флаконы или пробирки с питательными средами, закрытые ватно-марлевыми пробками и бумажными колпачками.

На упаковках с простерилизованными изделиями должны быть сведения о дате стерилизации.

Контроль стерилизации предусматривает проверку параметров режимов стерилизации и оценку ее эффективности.

Контроль режимов стерилизации проводят следующими методами:

- *физическим* — с помощью контрольно-измерительных приборов (термометров, манометров и др.) наблюдают за температурой, давлением пара, временем стерилизационной выдержки и другими параметрами;

- *химическим* — с использованием химических индикаторов — термотестов (представляют собой вещества, изменяющие свой цвет или физическое состояние при стерилизации, в частности имеющие различную температуру плавления);

- *биологическим* (с использованием биотестов со споровыми формами тест-культур, с последующей оценкой гибели спор термоустойчивых микроорганизмов).

Упакованные биотесты помещают в те же контрольные точки стерилизационной камеры, что и средства физического и химического контроля.

Основанием для заключения об эффективной работе стерилизационной аппаратуры является *отсутствие роста тест-культуры при бактериологическом исследовании всех биотестов в сочетании с удовлетворительными результатами физического и химического контроля.*

Разлив питательных сред в лабораторную посуду

После приготовления и стерилизации питательных сред их разливают в стерильную лабораторную посуду (рисунок 11).



Рисунок 11 — Варианты разлива плотной питательной среды (агара):

ПОСЕВ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

В зависимости от цели исследования, характера посевного материала и среды используют разные методы посева. Все они включают обязательное условие: оградить посев от посторонних микроорганизмов. Поэтому работать следует быстро, но без резких движений, усиливающих колебания воздуха. Во время посевов нельзя разговаривать. Посевы лучше делать в боксе (при работе с заразным материалом необходимо выполнять правила личной безопасности).

Способы и техника посева микробного материала на питательные среды

Техника посева зависит от характера исследуемого материала и консистенции питательной среды.

Жидкий материал для посева берут бактериологической петлей или стерильной пипеткой. Бактериологическую петлю перед взятием материала и по окончании посева стерилизуют прокаливанием в пламени спиртовки. Пипетки после посева погружают в дезинфицирующий раствор.

При посеве в жидкую питательную среду петлю с материалом погружают в среду и легким покачиванием сливают материал. Пипетку погружают в среду и материал сливают.

Посев материала на пластинчатый агар в чашке Петри проводят с помощью бактериологической петли, шпателя или тампона.

Посев бактериологической петлей проводят штриховым методом по поверхности агара.

При посеве шпателем исследуемый материал наносят на поверхность среды петлей или пипеткой, а затем с помощью стеклянного или металлического шпателя материал распределяют по поверхности агара круговыми движениями. После посева шпатель помещают в дезинфицирующий раствор.

При посеве тампоном исследуемый материал распределяется по поверхности среды круговыми движениями при одновременном вращении тампона в чашке.

Посев газоном: 1 мл материала (жидкая бульонная культура или взвесь микробов в физиологическом растворе) наносят пипеткой на поверхность агара и тщательно распределяют жидкость по всей поверхности среды. Избыток материала удаляют пипеткой, которую затем помещают в дезинфицирующий раствор. Другой способ: бактериальную суспензию стерильным тампоном наносят на поверхность среды штриховыми движениями в трех направлениях, поворачивая чашку Петри на 60°.

После посева чашки Петри закрывают, переворачивают вверх дном, подписывают и ставят в термостат именно вверх дном, чтобы избежать размыва-

ния растущих колоний на среде капельками конденсационной воды, скапливающейся на внутренней поверхности крышки при обычном ее положении.

При посеве на скошенный агар в пробирке работают прокаленной бактериологической петлей и при открытии и последующем закрытии пробирки проводят ее края через пламя спиртовки (фламбируют). Непосредственно при посеве петлю с культурой бактерий вносят вблизи пламени спиртовки в пробирку и, штрихообразными движениями снизу вверх, начиная с конденсационной воды, распределяют по поверхности агара.

При посеве (пересеве) чистой культуры бактерий из пробирки пробирку обе пробирки (одна — с чистой культурой как посевной материал и вторая — со стерильной средой) держат слегка наклонно в левой руке между большим и указательным пальцами так, чтобы края пробирок были на одном уровне. Петлю держат в правой руке и прокалывают в пламени спиртовки. Пробки из пробирок вынимают (одновременно две) правой рукой, зажимая их между мизинцем и ладонью. Вставив пробки, края пробирок обжигают в пламени спиртовки. Прокаленную петлю вводят (работают вблизи пламени спиртовки) в пробирку с посевным материалом, охлаждают и небольшое количество культуры переносят во вторую пробирку со средой, ополаскивая петлю в жидкой среде или распределяя штрихом по поверхности скошенного агара. Петлю извлекают, фламбируют края пробирок и закрывают их прокладками через пробки, затем петлю стерилизуют, пробирки подписывают, ставят в штатив.

Посев уколом в столбик жидкой среды проводят с помощью бактериологической петли (или иглы) путем прокалывания столбика среды до дна.

УСЛОВИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БАКТЕРИЙ

Для того, чтобы успешно культивировать бактерии на искусственных питательных средах, необходимо учитывать не только их питательные потребности, но и **условия культивирования**: температуру культивирования и необходимые для конкретного микробу условия аэрации.

По **оптимальной температуре** культивирования бактерии классифицируются на три группы:

1. **Термофилы** (теплолюбивые) — оптимальная температура их культивирования составляет 50–60 °С.

2. **Мезофилы** — к ним относится подавляющее большинство бактерий, имеющих медицинское значение; лучше всего растут при температуре человеческого организма (35–37 °С).

3. **Психрофилы** (холодолюбивые) — к ним относится ряд патогенных для человека бактерий, которые лучше всего растут при более низких температурах (от 0 до 28–30 °С).

Для создания оптимальной температуры посева помещают в термостат. Термостат — это прибор, в котором с помощью регуляторов поддер-

живается постоянная температура.

По требованиям к **условиям аэрации** во время культивирования, микроорганизмы можно разделить на следующие основные группы (таблица 11).

Таблица 11 — Дифференциация микробов по отношению к условиям аэрации

| Группы микробов | Требования бактерий к условиям аэрации |
|-------------------------|--|
| Облигатные аэробы | Требуют во время культивирования постоянного доступа кислорода к поверхности питательной среды |
| Облигатные анаэробы | Культивируются в условиях без доступа кислорода |
| Факультативные анаэробы | Растут при любых условиях аэрации |
| Капнофилы | Для своего культивирования требуют повышенного содержания углекислого газа (5–10 %) |
| Микроаэрофилы | Требуют сниженного содержания кислорода (около 5 %) |

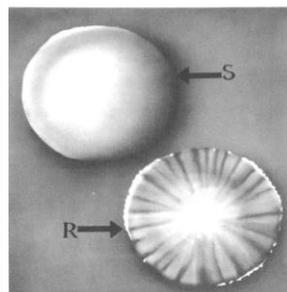
Время выращивания микроорганизмов

Время выращивания зависит от вида микроорганизма. Большинство бактерий культивируются при оптимальной температуре в течение 18–24 ч, а, например, возбудитель коклюша — в течение 2–4 сут, микобактерии туберкулеза около 3–6 нед.

ХАРАКТЕР РОСТА БАКТЕРИЙ НА ИСКУССТВЕННЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

Характер роста на плотных и жидких питательных средах относят к *культуральным признакам* микроорганизмов. Характер роста бактерий зависит, прежде всего от того, какая питательная среда (жидкая или плотная) используется для культивирования (таблица 12).

Таблица 12 — Характер роста бактерий на питательных средах

| | Жидкие среды | Плотные среды |
|-----------------------------------|---|--|
| Характер роста бактерий на средах | <ul style="list-style-type: none"> ✓ Диффузное помутнение (большинство бактерий) ✓ Плечка на поверхности бульона (характерно, напр., для холерного вибриона). ✓ Придонный или пристеночный рост — осадок или мелкие хлопья у стенки пробирки при прозрачном бульоне (характерно для стрептококков). | <ul style="list-style-type: none"> ✓ Рост в виде изолированных колоний (при посеве материала на чашки Петри методом механического разобщения микроорганизмов). <i>Колонии</i> — это видимые скопления особей одного вида микроорганизмов. Колонии по их внешнему виду (по форме, характеру краев, характеру поверхности, размерам, консистенции, прозрачности) можно свести к двум основным типам: S-форма («гладкая») — с ровными краями, гладкой поверхностью, блестящая, прозрачная или полупрозрачная. R-форма («шероховатая») — с неровными краями, шероховатой поверхностью, непрозрачная. |
| | |  |

| | |
|--|---|
| | ✓ Рост «газоном» или «сливной рост» как сплошной налет на поверхности агара (если плотность засева большая) |
|--|---|

ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ

Бактериологический (культуральный) метод диагностики *основан на выделении* из патологического материала *чистой культуры* микроорганизмов на питательных средах и дальнейшей *ее идентификации*.

Чистая культура — это популяция микроорганизмов одного вида, выращенная на питательной среде.

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

Достоинства метода: относительно высокая чувствительность и точность, возможность определить численность микробов в исследуемом материале, в ряде случаев доказать патогенность выделенных микроорганизмов, а также определить чувствительность к антибиотикам.

Недостатки метода: относительная длительность, метод дорогостоящий.

Методы выделения чистых культур микроорганизмов

Методы выделения чистых культур из микробных смесей можно разделить на несколько групп:

1. **Методы механического разобщения микроорганизмов:** посев материала по поверхности плотной пластинчатой питательной среды шпателем (метод Дригальского) или штриховым способом с помощью бактериальной петли; разобщение на основе подвижности микробов.

2. **Методы, основанные на избирательной чувствительности микроорганизмов к воздействию внешних факторов:** например, обработка кислотой или щелочью для выделения устойчивых бактерий; нагревание смеси микробов, где под действием температуры спорообразующие микробы выживают, а неспорообразующие — гибнут; при посеве смеси микробов на среду с добавлением определенного антибиотика уничтожаются чувствительные к нему микробы и вырастают нечувствительные; создание анаэробных условий позволяет отделить группу анаэробных микроорганизмов от облигатных аэробов.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР АЭРОБНЫХ И ФАКУЛЬТАТИВНО-АНАЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ

► 1-й этап: 1 день

- а) забор материала для исследования;
- б) транспортировка, хранение, подготовка к исследованию;
- в) приготовление мазков из патологического материала, окраска по Граму и микроскопия;
- г) *посев патологического материала при необходимости в среду обогащения.* Его проводят, если в исследуемом материале содержится малое количество бактерий, например, при выделении гемокультуры. Для этого кровь, взятую на высоте лихорадки, засевают в среду в соотношении 1:10 (для преодоления действия бактерицидных факторов крови); посев инкубируют при температуре 37 °С, 18–24 ч.

Зачастую сразу после микроскопии препарата производят посев патологического материала бактериологической петлей штрихом или шпателем по Дригальскому на **пластинчатые питательные среды** для получения изолированных колоний (рисунок 12). В случае инфекций, вызываемых условно-патогенными микроорганизмами, где имеет значение количество присутствующих микробов в патологическом материале, делают количественный посев материала, для чего предварительно готовят 10-кратные разведения (10^{-1} – 10^{-4}) материала в стерильном изотоническом растворе хлорида натрия, по 0,05 мл которых засевают на сектора чашек со средами.



Рисунок 12 — Способы посева исследуемого материала на пластинчатые питательные среды

Создание условий культивирования для микроорганизмов (температура культивирования и необходимые конкретному микробу условия аэрации). Инкубируют в термостате в основном при *температуре 37 °С*, т. к. большинство патогенных микробов являются *мезофилами*. Большинство бактерий культивируются при оптимальной температуре в течение 18–24 ч.

► 2-й этап: 2 день

а) изучение характера роста выросших изолированных колоний на средах, т.е. определяют *культуральные свойства* с целью отбора подозрительных колоний.

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

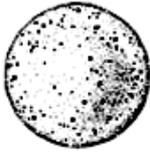
Изучают характер роста культуры простым глазом, с помощью лупы, под малым увеличением микроскопа или пользуясь стереоскопическим микроскопом. Величину и форму колоний, характер краев и прозрачность изучают в проходящем свете, рассматривая чашки со стороны дна. В отраженном свете (со стороны крышки) определяют характер поверхности, цвет колонии (рисунок 13). Консистенцию определяют подкосновением петли к поверхности изучаемой колонии.



Рисунок 13 — Изучение выросших изолированных колоний

Культуральные признаки колоний представлены в таблице 13.

Таблица 13 — Культуральные признаки

| Культуральные признаки | Характеристика колоний | | | |
|-----------------------------|--|---|---|---|
| Форма колонии | Правильная округлая, неправильная, плоская, возвышающаяся над поверхностью среды | | | |
| Размер или величина колонии | Крупная, мелкая, точечная (измеряют диаметр колонии миллиметровой линейкой со стороны дна чашки Петри) | | | |
| Характер края | Ровный, неровный, бахромчатый | | | |
| |  |  |  |  |
| Характер поверхности | Гладкая, блестящая, морщинистая, шероховатая, матовая | | | |

| | |
|--------------|--|
| |  |
| Цвет колонии | Бесцветная, пигментированная (цветная) |
| Консистенция | Сухая, вязкая, влажная, слизистая |

б) *Микроскопия препарата*, приготовленного из *подозрительной изолированной колонии* и окрашенного по Граму (для уточнения чистоты выделяемой культуры бактерий). При микроскопии препарата все микробы должны обладать одинаковыми морфологическими свойствами (рисунок 14).

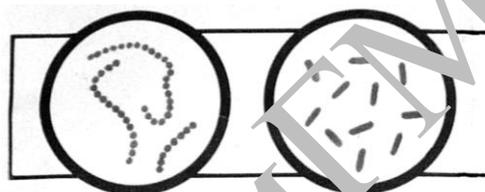


Рисунок 14 — Пример микроскопической картины препаратов

в) *Пересев* оставшейся части *изучаемой изолированной колонии* на скошенный агар (рисунок 15) для *выделения и накопления чистой культуры*; создают условия культивирования (инкубация в термостате).



Рисунок 15 — Пересев изолированной колонии на скошенный агар

► 3-й этап: 3 день

Идентификация выделенных чистых культур проводится по следующим признакам:

а) морфологические и тинкториальные свойства (приготовление мазка со скошенного агара, окраска по Граму, при необходимости — другие способы окраски);

б) культуральные свойства (исследуются свойства выросших колоний);

в) биохимические свойства (определение ферментативной активности исследуемой культуры микроорганизмов);

г) антигенные свойства (изучение антигенной структуры микроба и определение его серовара (серотипа), т. е. проводят *серотипирование* — определение неизвестного антигена выделенного микроорганизма с помощью известной диагностической сыворотки).

Также в ряде случаев проводится **определение чувствительности выделенной культуры микроорганизмов к антибиотикам** с получением антибиотикограммы, результаты которой имеют значение, например, для врача-клинициста при этиотропной терапии инфекционного заболевания. Таким образом, должен соблюдаться микробиологический принцип рациональной антибиотикотерапии, который требует применять антибактериальные препараты по результатам антибиотикограммы. Для определения чувствительности культуры микробов к антибиотикам применяют, например, диско-диффузионный или автоматизированные методы определения антибиотикочувствительности, которые описаны в последующем материале.

► **Заключение:** указывается вид выделенного микроорганизма, при необходимости указываются результаты по чувствительности выделенной культуры к антибактериальным препаратам (антибиотикограмма). При выделении условно-патогенных микроорганизмов дополнительно указывается их концентрация в исследуемом материале (КОЕ/мл).

Дополнительно в ряде случаев проводят **фаготипирование**, которое имеет большое эпидемиологическое значение (используют для выявления источника инфекции, например, при стафилококковых инфекциях). **Фаготипирование** — определение фаготипа (фаговара) выделенной чистой культуры бактерий (внутривидовая дифференциация) с помощью типовых бактериофагов. Принцип метода заключается в следующем (рисунок 16):

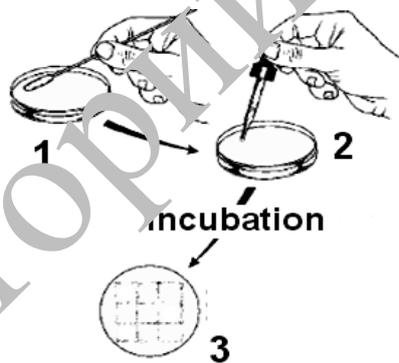


Рисунок 16 — Схема фаготипирования

1. Типируемый штамм бактерий засевают газодом на пластинчатый агар.
2. Затем на засеянную поверхность наносят капли известных типовых бактериофагов (каждую в свой квадрат, помеченный заранее на дне чашки Петри). Затем чашку с посевом инкубируют в термостате.
3. Учитывают опыт, регистрируя «стерильные пятна» или «бляшки» — места отсутствия роста культуры бактерий в месте нанесения капли бактериофага, к которому чувствителен данный вариант бактерий.

Пример фаготипирования стафилококков представлен на рисунке 17. На штаммы *S. aureus*, посеянные газодом, в квадраты нанесены капли известных типовых индикаторных стафилококковых фагов — 21 фаг с соответствующими номерами (80, 79, 52А, 29, 71, 55, 3С, 3В, 3А, 53, 47, 42Е, 7, 6, 42D, 77, 75, 83А, 54, 81, 187). При учете результатов фаговар

(фаготип) обозначается путем перечисления типовых фагов, лизирующих данный вариант. Разные фаготипы стафилококков (разные фагоформулы) свидетельствуют о разных источниках инфекции, одинаковые — о едином источнике. Например, совпадение фаготипа стафилококков, выделенных из послеоперационной раны пациента и с рук медсестры, осуществляющей перевязку ран, указывает на один источник инфекции.

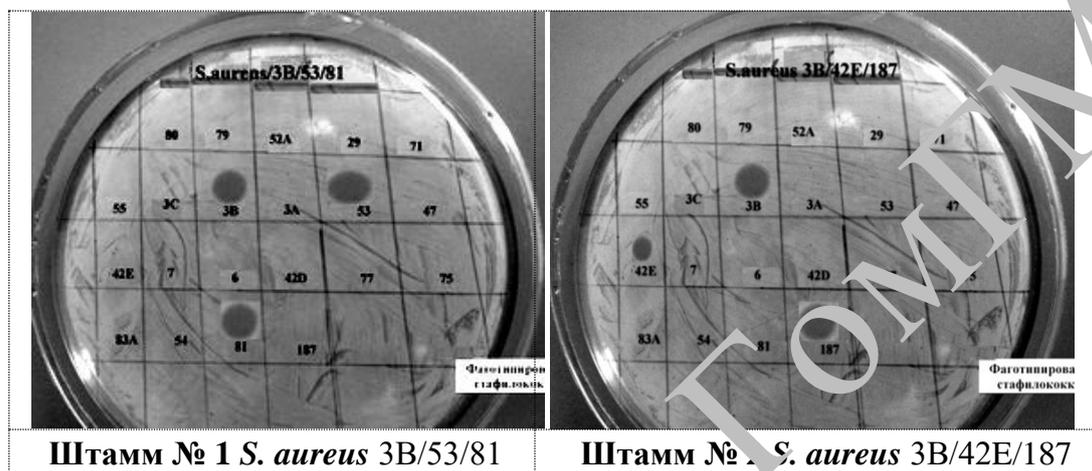


Рисунок 17 — Фаготипирование стафилококков

Общая схема выделения и идентификации чистых культур аэробных и факультативно-анаэробных бактерий представлена на рисунке 18.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ И ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР АНАЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ

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

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

I этап (исследуемый патологический материал):

- Микроскопия препарата, окрашенного по Граму.
- Посев патологического материала на пластинчатые плотные питательные среды — для получения изолированных колоний; создание условий культивирования.

II этап (изолированные колонии):

- Изучение культуральных свойств выросших колоний (форма, размер колонии, цвет, характер края, характер поверхности, прозрачность, консистенция).
- Микроскопия препарата, приготовленного из изолированной колонии и окрашенного по Граму.
- Посев изучаемой изолированной колонии на скошенный агар — для выделения чистой культуры; создание условий культивирования.

III этап (выделенная чистая культура):

- Идентификация выделенной чистой культуры по следующим свойствам: морфологические, культуральные, биохимические, антигенные, фаголизательность и другие свойства.
- Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.

Рисунок 18 — Этапы выделения и идентификации чистых культур аэробных и факультативно-анаэробных бактерий

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

Примеры **специальных питательных сред** для культивирования облигатно анаэробных микроорганизмов представлены в таблице 14.

Анаэробный тип дыхания во много раз менее продуктивный, чем аэробный, поэтому *питательные среды для анаэробов* должны быть значительно богаче питательными субстратами и соответствовать сложным пищевым потребностям анаэробов, также должны содержать различные редуцирующие средства, уменьшающие окислительно-восстановительный потенциал (например, тиогликолят натрия).

Таблица 14 — Питательные среды для культивирования анаэробных бактерий

| Название среды | Основной состав среды | Примечание |
|---|---|---|
| <i>Тиогликолевая среда</i> (среда для контроля стерильности) | МПБ, глюкоза, тиогликолят натрия, индикатор кислорода резазурин | Среда предназначена для контроля стерильности биоматериала. За счет индикатора кислорода резазурина контролируют анаэробные условия по появлению розового окрашивания верхней части среды |
| <i>Анаэробный кровяной сахарный агар (агар Цейсслера)</i> | МПА, глюкоза, дефибрированная кровь | Используют для получения изолированных колоний анаэробных микроорганизмов, а также для изучения гемолитической активности бактерий (например, вокруг колонии зона гемолиза) |
| <i>Среда Вильсона-Блера</i> | МПА, глюкоза, сульфит натрия, хлорид железа | Анаэробные бактерии дают рост в глубине среды и образуют колонии черного цвета, так как при культивировании образуется сульфат натрия, который реагирует с черным железом, в результате чего образуется чернистое железо, имеющее черный цвет |

Условия культивирования облигатно анаэробных микроорганизмов

Культивирование облигатных анаэробов производят в бескислородных условиях. Условия анаэробноза создают физическими, химическими, биологическими и смешанными методами.

1. Физический метод

- *Использование анаэробной камеры (бокса)*, анаэробные условия в которой достигаются созданием вакуума с последующим введением специальной газовой бескислородной смеси (анаэробный газ: N_2 (85–90 %) + CO_2 (5–10 %) + H_2 (5 %)); оборудование дорогостоящее, применяют только в крупных лабораториях. Анаэробный бокс представлен на рисунке 19.



Рисунок 19 — Анаэробный бокс

- *Использование герметически закрывающихся флаконов и пробирок*, использование плотно закрывающихся эксикаторов с горящей свечой.

- *Использование анаэростата*, который представляет собой цилиндрическую, герметично закрываемую металлическую или пластмассовую емкость, в которой производят механическое откачивание воздуха (рисунок 20).

- Предварительное кипячение жидких питательных сред (*регенерация питательной среды*) с последующей заливкой сред вазелиновым маслом для сокращения доступа кислорода.



Рисунок 20 — Анаэростат

- *Посев в высокий столбик агара* (в глубине среды создаются благоприятные условия для роста облигатных анаэробов).

- Применение *трубок Виньяля — Вейона*. Принцип метода. Исследуемым материалом, разведенным в расплавленной и остуженной до 40–45 °С среде Вильсона — Блера, заполняют капилляры пастеровских пипеток, концы которых запаивают. Через 2–3 сут в столбике агара вырастают колонии анаэробов, которые легко изолировать петлей, надломав капилляр выше уровня намеченной колонии. Устаревший метод.

2. Химический метод — применяют химические поглотители кислорода.

- *Метод Аристовского*. Посевы исследуемого материала в чашках Петри помещают в эксикатор — стеклянная емкость с притертыми краями крышки. На дно эксикатора вносят химический поглотитель кислорода: гипосульфит натрия или пирогаллол, и углекислый натрий.

- Химическое поглощение кислорода воздуха происходит при добавлении, например щелочного раствора пирогаллола в особых приборах, примером которого может служить *свеча Омеянского* — стеклянный прибор в форме свечи.

- Добавление к питательным средам *редуцирующих веществ*, которые связывают остатки кислорода в питательных средах (глюкоза, цистеин, тиогликолевая кислота, пиروвиноградная кислота и др.).

- Применение *газогенераторных пакетов* (например, AnaeroGas Pack, Generbox anaer) для создания анаэробных условий в герметически закрытых сосудах (рисунок 21).



Рисунок 21 — Применение газогенераторных пакетов для создания анаэробных условий в герметически закрытых сосудах

• *Применение анаэробных пакетов* (рисунок 22). Анаэробный пакет представляет собой прозрачный, герметично закрываемый пластиковый пакет, рассчитанный на 1–2 чашки Петри. Анаэробные условия в нем создаются химическим связыванием кислорода с безводной реакционной системой. Анаэробные пакеты удобны для транспортировки материала, культур анаэробов, в полевых условиях, а также в лаборатории при малой диагностической нагрузке.



Рисунок 22.
Анаэробный пакет

3. Биологический метод

• *Метод Фортнера*: совместное культивирование строгих аэробов и анаэробов (аэробы поглощают кислород и создают условия для размножения анаэробов). В настоящее время не используется.

Этапы выделения чистых культур анаэробных бактерий

► 1-й этап: 1 день

- а) забор материала для исследования;
- б) транспортировка, хранение, подготовка к исследованию;
- в) приготовление мазков из патологического материала, окраска по Граму и микроскопия;
- г) *посев патологического материала на жидкие питательные среды* для анаэробов (напр., тиогликолевая среда). Инкубация в термостате при 37 °С в анаэробных условиях.

► 2-й этап: 2 день

- а) *изучение характера роста на жидких средах*, приготовление мазков, окраска по Граму, микроскопия;
- б) *пересев с жидкой питательной среды на плотную пластинчатую питательную среду* (напр., анаэробный кровяной агар) с целью получения *изолированных колоний*. Для этого можно применить *метод Цейслера*: подготавливают 3 чашки Петри с кровяным агаром; каплю материала с тиогликолевой среды помещают на середину первой чашки Петри и распределяют шпателем, этим же шпателем производится посев на вторую чашку, а затем — на третью чашку. Инкубация в термостате в анаэробных условиях (анаэростат) 24–48 ч.

► 3-й этап: 3 день

- а) *изучение характера роста изолированных колоний на пластинчатых средах (культуральные признаки)* с целью отбора подозрительных колоний, приготовление мазков из подозрительных колоний, окраска по Граму, микроскопия;
- б) *пересев оставшейся части колонии в жидкую питательную среду с целью накопления чистой культуры*. Инкубация в термостате в анаэробных условиях.

Общая схема выделения чистых культур анаэробных бактерий представлена на рисунке 23.

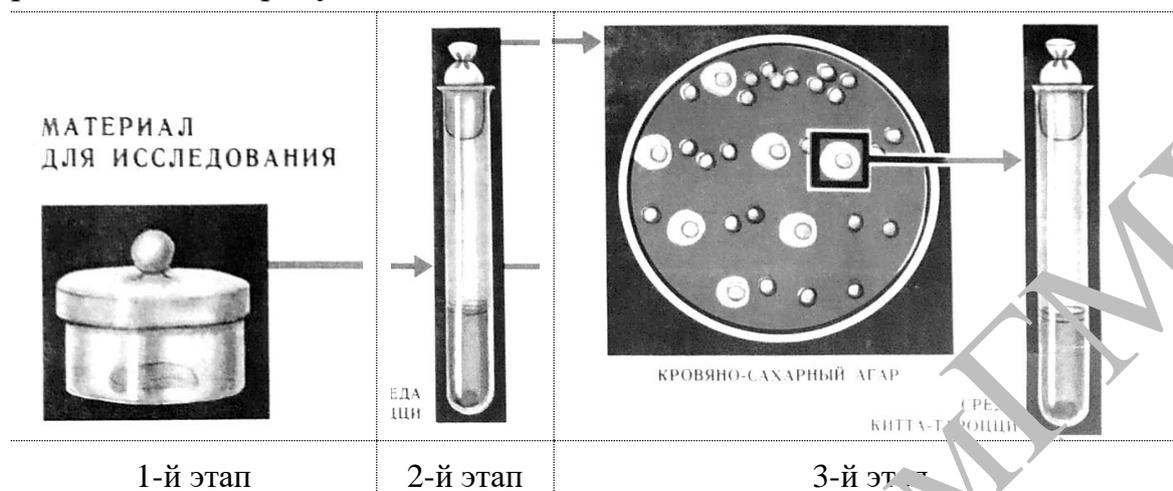


Рисунок 23 — Этапы выделения чистых культур анаэробных бактерий

► 4-й этап:

Идентификация выделенных чистых культур проводится по следующим признакам:

- а) морфологические и тинкториальные свойства (приготовление мазка, окраска по Граму);
- б) культуральные свойства (исследуются культуральные свойства выросших колоний);
- в) биохимические свойства (определение ферментативной активности исследуемой культуры микроорганизмов);
- г) антигенные свойства (определяют неизвестный антиген выделенного микроорганизма с помощью известной диагностической сыворотки);
- д) определение токсигенности (токсигенность — способность микроорганизмов продуцировать экзотоксины; проводят реакцию нейтрализации экзотоксина антиоксической сывороткой в опыте на лабораторных животных, например, на белых мышах).

Также в ряде случаев проводится **определение чувствительности выделенной культуры микроорганизмов к антибактериальным препаратам.**

► **Заключение:** указывается вид выделенного микроорганизма.

ИЗУЧЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МИКРООРГАНИЗМОВ

Биохимические свойства микроорганизмов обусловлены их ферментативной деятельностью. Ферменты микроорганизмов являются биологическими катализаторами, определяющими метаболические процессы, протекающие в микробных клетках.

Метод определения биохимических свойств микробов предусматривает изучение ферментативной деградации различных субстратов (углеводов, белков и аминокислот, мочевины, перекиси водорода и др.) с образованием промежуточных и конечных продуктов. Учитывая, что разные виды микробов нередко отличаются по набору ферментов, которые они способны синтезировать, следовательно, выделенную чистую культуру микроорганизмов можно идентифицировать по биохимической (ферментативной) активности.

Определение ферментов, имеющих важное значение для идентификации микроорганизмов по биохимическим свойствам

Выявление ферментов, *разлагающих углеводы*, позволяет определить **сахаролитические свойства микробов**. С этой целью используют следующие среды:

а) среды Гисса — моноуглеводные жидкие и полужидкие среды, в состав которых входят пептонная вода, *углевод* (моно- и дисахариды — глюкоза, лактоза, мальтоза, сахароза; полисахариды — крахмал, гликоген и др.), *многоатомные спирты* (глицерин, маннит и др.) и *индикатор pH* (индикатор Андресе или бромтимоловый синий). Для выявления газообразования в жидкие среды вносят поплавки (стеклянная трубочка, верхний конец которой запаян).

Принцип действия. Под действием образующейся при разложении углевода кислоты индикатор изменяет окраску среды; при отсутствии ферментативной активности микроба изменения цвета среды не наблюдается. Таким образом, различия в цветовых оттенках в нескольких пробирках со средой Гисса при проявлении различной ферментативной активности микроба позволило называть это «лестным» рядом Гисса. Газообразование определяется по наличию пузырьков газа в толщине полужидких сред или, если среда жидкая, поплавки всплывают на поверхность среды.

В состав *короткого «лестного» ряда Гисса* входят лактоза, глюкоза, маннит, мальтоза, сахароза. В случае необходимости определяют способность изучаемой культуры ферментировать и большее количество субстратов (моносахаридов, дисахаридов, спиртов). Тогда говорят о *длинном ряде Гисса*.

б) другие дифференциально-диагностические среды (Эндо, Левина, Плоскирева), в состав которых входит *лактоза* и соответствующий *индикатор*; эти среды применяют для энтеробактерий. Если микроорганизмы разлагают лактозу до кислоты (лактозоположительные), то цвет колонии изменяется соответственно индикатору, т. е. образуются цветные колонии, если бактерии не разлагают лактозу (лактозонегативные) — бесцветные колонии.

в) полууглеводные среды (двухсахарный агар Клиглера). При расщеплении глюкозы происходит пожелтение столбика среды, при разложении лактозы желтеет скошенная часть среды.

Определяя протеазы (*ферменты, разлагающие белки*), выявляют **протеолитические свойства микробов**. С этой целью используют следующие среды и тесты:

а) расщепление белков субстрата культурой микробов может идти с образованием пептона, альбумоз, аминокислот (за счет ферментов — протеиназ и пептидаз). Для выявления указанных ферментов исследуемую культуру засевают на ряд сред:

- *молоко* (происходит растворение сгустков казеина с образованием пептона — пептонизация молока, которое приобретает вид молочной сыворотки);

- *свернутая сыворотка* (разжижение при наличии протеолитической активности микробов);

- *столбик желатина* (при посеве уколом в столбик желатина в положительном случае происходит разжижение желатина, и у разных микробов — неодинаково, например, послойное, воронкообразное, в виде гвоздя, ёлочкой и другие варианты — рисунок 24).

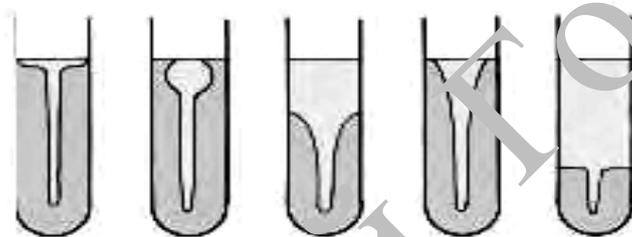


Рисунок 24 — Варианты разжижения желатина

б) при более глубоком расщеплении белков (ферментации пептонов, аминокислот) микробами образуются индол, сероводород, аммиак и другие соединения, которые выявляют с помощью следующих тестов:

- *Проба на индол*: при расщеплении аминокислоты триптофана (за счет действия фермента триптофаназы) образуется индол, который выявляют с применением индикаторной бумажки, смоченной щавелевой кислотой и закрепленной под пробкой в пробирке над жидкой питательной средой с посевом. В присутствии индола бумажка становится красной.

- *Проба на сероводород*: при расщеплении серосодержащих аминокислот ферментами десульфуразами образуется H_2S , который выявляют с применением индикаторной бумажки, пропитанной раствором уксуснокислого свинца и закрепленной под пробкой над питательной средой; в положительных случаях бумажка чернеет.

Также наличие H_2S выявляется и в среде Клиглера (при выделении H_2S происходит почернение среды).

- *Проба на аммиак*: применяют лакмусовую бумажку, закрепленную под пробкой над питательной средой; при наличии аммиака бумажка синее.

Окислительно-восстановительные ферменты (оксидоредуктазы)

Для определения каталазы вносят исследуемую культуру петлей в каплю 3 % раствора пероксида водорода на предметном стекле. При поло-

жительной реакции происходит бурное образование пузырьков газа. Используют, например, для дифференциации *Staphylococcus spp.* (каталазоположительные) и *Streptococcus spp.* (каталазоотрицательные).

Тест на оксидазу: суточную культуру бактерий бактериальной петлей наносят на поверхность фильтровальной бумаги, смоченной специальным реактивом (тетраметилпарафенилендиамин). При положительной пробе через 1–2 мин появляется фиолетовое окрашивание; используют для дифференциации *Pseudomonas spp.* (оксидазопозитивные) и эшерихий (оксидазонегативные).

Определение ферментов инвазивности, ферментов агрессивности, ферментов-токсинов бактерий

Фибринолизин

Принцип метода: в пробирку с фибрином (отмытый от эритроцитов сгусток крови) вносят испытуемую культуру. После инкубации в термостате учитывается результат. При положительном результате сгусток растворяется.

Гиалуронидаза

Принцип метода: в пробирку с гиалуроновой кислотой (ГУК) вносят испытуемую культуру. После инкубации в термостате добавляют реактив, вызывающий свертывание ГУК и учитывают результат. При положительном результате (вследствие расщепления ГУК) сгустка не образуется.

Плазмокоагулаза

Принцип метода: в пробирку, содержащую цитратную плазму крови кролика, вносится испытуемая культура. После инкубации в термостате учитывается результат. При положительном результате плазма свертывается (коагулирует).

Лецитовителлаза (лецитинлаза)

Принцип метода: выделенную чистую культуру стафилококка засевают на желточно-солевой агар (ЖСА), который содержит 7,5% хлорида натрия и суспензию из желтка куриного яйца. При положительном результате вокруг колоний вирулентных стафилококков образуется радужный ореол вследствие расщепления лецитина, содержащегося в желтке куриного яйца.

Гемолизины — ферменты, расщепляющие мембраны эритроцитов, вызывают гемолиз. Они выявляются посевом культуры на 5–10 % кровяной агар. Варианты гемолиза: α -гемолизины приводят к неполному гемолизу с образованием вокруг колоний зоны неполного просветления среды, которая в течение 2–5 сут приобретает зеленовато-бурый оттенок; β -гемолизины вызывают полный гемолиз с образованием зоны просветления вокруг колоний; γ -гемолизины не дают видимого глазом гемолиза.

Планшетные тест-системы

В последние годы в бактериологических лабораториях для быстрой идентификации выделенной чистой культуры микроорганизмов по биохимическим

мической активности применяются **планшетные тест-системы** — это системы с лиофилизированными субстратами и индикаторами в микроемкостях (лунках) в виде специальных планшетов (панелей биохимической дифференцировки), таблица 15.

Таблица 15 — Планшетные тест-системы

| Принцип действия | Учет результатов биохимической активности бактерий | |
|---|--|---|
| <p>Из изолированной колонии, выросшей на питательной среде в чашке Петри, или чистой культуры в пробирке, готовят взвесь микроорганизмов в физиологическом растворе (суспензию), которую вносят в лунки планшета; инкубируют в термостате</p> | <p><i>Визуально</i> (при разложении субстратов и образовании кислоты изменяется цвет индикатора в лунке «+», если цвет не изменяется «-»), учитывают по кодовым таблицам</p> | <p><i>С помощью автоматических анализаторов</i> (например, АТВ-expression), используя специальные планшеты</p>  |
| |  <p>диагностические панели API</p> |  |

АВТОМАТИЗАЦИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Выполнение бактериологических исследований в условиях современной лаборатории требует учитывать следующие условия:

- увеличение объема анализов;
- расширение спектра исследуемых возбудителей;
- увеличение частоты встречаемости резистентных штаммов.

В этих условиях оптимальным выходом является стандартизация и автоматизация всех этапов анализа.

Многие современные лаборатории оснащены **приборами автоматической идентификации бактериальных культур**, такими, как гемокультиватор ВАСТЕС, микробиологические анализаторы РНОENIX, ВИТЕК, АТВ-expression и другие. В этом случае работа врача-бактериолога значительно облегчается, он освобождается от проведения многих однообразных и требующих больших временных затрат процедур. Однако и в этом

случае принцип проведения культурального метода исследования совпадает с изложенным в этом разделе, лишь второй и третий этапы осуществляются без участия человека — они практически полностью автоматизированы. Но при этом следует помнить, что компьютер может работать только с той информацией, которую в него «вложил» человек, поэтому если какой-либо вид микроорганизма по той или иной причине не внесен в программу автоматического анализатора, работа по его выделению и идентификации проводится по изложенному в этом разделе классическому алгоритму.

Гемокультиваторы

Принцип работы и особенности применения. Гемокультиваторы (рисунок 25) предназначены для выделения микроорганизмов из крови и других стерильных жидкостей.



Гемокультиватор
Bact/Alert

Гемокультиватор BACTEC

Флакон
со средой

Рисунок 25 — Гемокультиваторы и пример флакона со специальной средой

Принцип их работы основан на автоматизированном выявлении роста микроорганизмов в образцах крови, помещенных во флакон со специальной средой. Индикация микробного роста во флаконах проводится с помощью флюоресценции или колориметрически.

Использование автоматических систем позволяет повысить чувствительность метода (100 микробных клеток в 1 мл) и гарантирует отсутствие посторонней контаминации микроорганизмами (флакон не открывают в течение всего мониторинга). Работой системы управляет компьютер. Во флакон со средой шприцем вносят исследуемый образец крови. Флакон помещают в индивидуальную ячейку инкубационного блока (в одном блоке 60 ячеек), дальнейший процесс происходит в автоматическом режиме. Флаконы инкубируются на борту аппарата при температуре 37 °С, каждые 10–15 мин инкубации проводится автоматическое считывание признаков микробного роста во флаконе (по изменению цвета индикаторного диска на дне флакона). При появлении роста микроорганизмов сраба-

тывает звуковая и световая индикация, флакон извлекают из аппарата для дальнейшей работы — выделения чистой культуры и ее идентификации.

Микробиологические (бактериологические) анализаторы

Микробиологические (бактериологические) анализаторы предназначены для идентификации микроорганизмов и определения их чувствительности к антибиотикам. В настоящее время на бактериологическом рынке нашей стране представлены *автоматические бактериологические анализаторы* BD Phoenix (Becton Dickinson, США), VITEK и VITEK2 (bioMérieux, Франция) и WalkAway (Dade Behring, США), а также *полуавтоматические бактериологические анализаторы*, например, АТВ-Expression (bioMérieux, Франция), рисунок 26.

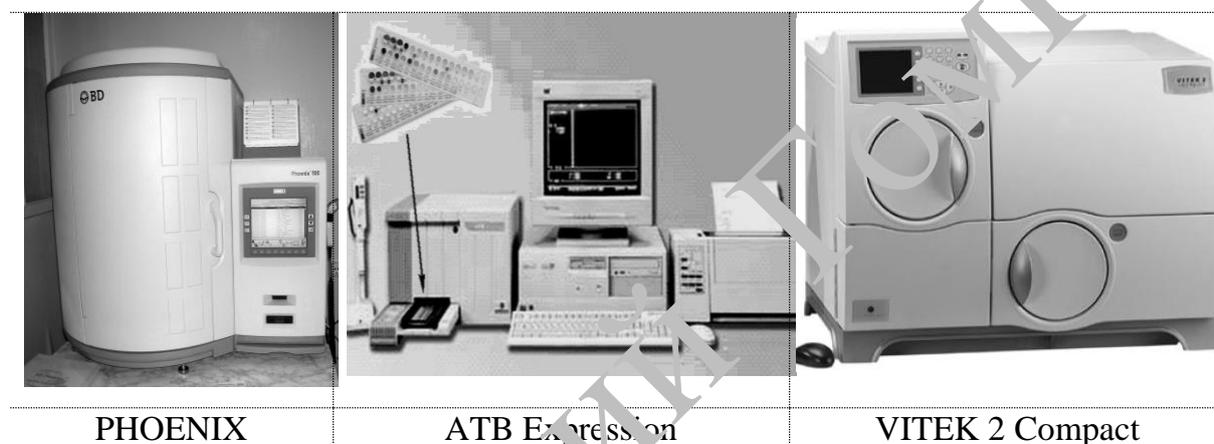


Рисунок 26 — Примеры микробиологических анализаторов

В сферу деятельности микробиолога при применении микробиологического анализатора входит получение чистой молодой культуры, постановка ориентировочных тестов, микроскопия и окраска по Граму, приготовление раствора тестируемых микроорганизмов, заполнение панелей или карт для идентификации и чувствительности, постановка панелей/карт в прибор, введение данных о пациенте. В автоматизированных системах инкубация, считывание результата и его обработка проходят без участия лаборанта.

Бактериологический анализатор VITEK, управляемый компьютером со специальной программой, состоит из двух блоков — устройств для заполнения и для запаивания карт, а также инкубатора и ридера. Тесты выполняются в пластиковых картах. После приготовления раствора из выращенной культуры, мутность которого (т. е. количество микроорганизмов в единице жидкости) обязательно оценивается на нефелометре, входящем в состав прибора, карта заполняется автоматически при помощи вакуума, что позволяет избежать контаминации и неравномерного заполнения ячеек, после чего карта герметически запаивается. Перемещение карты для заполнения, запаивания и инкубации, требует ручных действий лаборанта; затем вплоть до момента получения результата анализатор работает в автоматиче-

ском режиме. После использования карты удаляются из прибора вручную. Карты для идентификации возбудителей содержат 30 лунок с лиофилизированными биохимическими субстратами и необходимыми реагентами. Результат взаимодействия микроорганизма с реактивами фиксируется прибором и оценивается компьютерной программой. Карты для определения чувствительности к антибиотикам состоят из 45 лунок, заполненных антибиотиками различной концентрации. Время идентификации микроорганизмов (база данных прибора более 300 таксонов) и определения чувствительности к антибиотикам (более 12 вариантов карт с антибиотиками) при помощи анализатора VITEK для большинства микроорганизмов не превышает 4–5 ч.

Более совершенным является *бактериологический анализатор VITEK2*, в котором количество ручных манипуляций на этапе подготовки и приготовления раствора микроорганизмов уменьшено по сравнению с прибором VITEK. Прибор вмещает до 60 карт одновременно, удаление карт также происходит автоматически. Тесты выполняются также в пластиковых картах, отдельно для идентификации, отдельно для определения чувствительности, однако, количество ячеек в картах VITEK2 увеличено до 64, что в свою очередь ускоряет идентификацию за счет использования большего количества биохимических субстратов. В приборе используется флуоресцентный индикатор, а в случае ферментативных тестов используется меченый субстрат.

Автоматизированный бактериологический анализатор Phoenix обладает высокой производительностью (до 200 тестов одновременно) и создан для крупных лабораторий. Основной блок прибора состоит из инкубационного модуля на 100 мест и считывающего устройства. Прибор управляется компьютером, встроенным вместе с монитором в блок анализатора. Все анализы выполняются на специально разработанных панелях с 45 биохимическими субстратами для идентификации и специальных панелей для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам. Результаты учитываются по изменению цвета в процессе жизнедеятельности бактерии или наличию мутности, свидетельствующей о микробном росте, используя метод флуоресценции.

Другой *системой автоматизированного бактериологического исследования* является *WalkAway*, позволяющей проводить идентификацию микроорганизмов за 3–4 часа и определение их чувствительности к антибактериальным препаратам за 4–24 ч. Тестируемый спектр включает в себя более 300 микроорганизмов. Анализатор использует современный флуоресцентный метод детекции. Прибор позволяет при необходимости проводить только идентификацию или оценку чувствительности, а также одновременно идентифицировать микроорганизмы и определять их антибиотикочувствительность на одной панели.

Прибор *ATB-Expression* (или его аналог miniAPI) является *полуавтоматическим бактериологическим анализатором*. Он представляет собой

ридер со встроенным монитором, клавиатуру и денситометр для автоматического определения мутности бактериальной суспензии по МакФарланду. Стрипы для идентификации разработаны на основе API-технологии, хорошо известной в бактериологии. Панели для идентификации делятся на обычные (инкубация до 24 часов) и быстрые (4–5 часов). Они разработаны для следующих видов микроорганизмов: энтеробактерий, грамотрицательных палочек, стафилококков, грибов, анаэробов, стрептококков. Идентификационные стрипы могут считываться как автоматически, так и вручную. Стрипы для определения чувствительности к антибиотикам разработаны с расширенным набором антибиотиков.

Анализатор масс-спектров белковых молекул

Масс-спектрометрия (MS) — физический метод измерения отношения массы заряженных частиц материи (ионов) к их заряду. Приборы, которые реализуют этот метод, называются масс-спектрометрами. Масс-спектрометр — вакуумный прибор, определяющий массы атомов (молекул), использующий физические законы движения заряженных частиц в магнитных и электрических полях, необходимый для получения масс-спектра. Примеры масс-спектрометров: VITEK MS, MALDI-TOF (матричный лазерный десорбционный времяпролетный масс-спектрометр) и система MALDI Biotyper.

Наибольшая эффективность и клиническая значимость применения масс-спектрометрии достигается при анализе нуклеиновых кислот (ДНК/РНК) и пептидов (белков). *Белковое профилирование* — метод прямого масс-спектрометрического анализа белковой фракции, позволяющий получать уникальные для изучаемого объекта масс-спектры. Большое количество результирующих пиков на масс-спектре является репрезентативной фенотипической характеристикой при изучении микроорганизмов, белков плазмы крови, тканей, сравнимой с отпечатком пальца.

На примере системы *MALDI Biotyper* (рисунок 27) рассмотрим принцип метода и его основные этапы. Система MALDI Biotyper позволяет идентифицировать микроорганизмы по рибосомальным белкам, которые являются уникальными для любых микроорганизмов. Для исследования используется небольшое количество чистой культуры, которое наносится на одноразовый слайд. С помощью матричного раствора происходит разрушение клеточной стенки микроорганизма. Под воздействием лазера в вакуумной трубе извлекается спектр распределения масс рибосомальных белков. Биоинформационное программное обеспечение позволяет надежно и точно проводить видовую идентификацию любых микроорганизмов путем сопоставления получаемых масс-спектров бактерий с обширной базой данных (MALDI Biotyper содержит библиотеку масс-спектров, содержащую данные о штаммах нескольких тысяч микроорганизмов, которые по-

стоянно пополняются при участии лабораторий по всему миру). Полностью воспроизводимые результаты идентификации в течение 1–2 мин.



Рисунок 27 — Масс-спектрометр MALDI в лаборатории

Масс-спектрометрический анализ биологических макромолекул позволяет решать широкий круг диагностических задач практической медицины; может успешно применяться как в рутинной практике клиническо-бактериологических лабораторий, так и для осуществления санитарно-эпидемиологических исследований.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БАКТЕРИЙ К АНТИБИОТИКАМ

Для этиотропной терапии инфекционного процесса врач-клиницист назначает пациентам антибактериальные препараты.

В алгоритме выбора антибактериальных препаратов для этиотропной терапии инфекционного процесса выделяют следующие основные этапы.

Эмпирический выбор, осуществляемый на основании представления об этиологии патологического процесса, видовой антибиотикочувствительности предполагаемого возбудителя и опыта этиотропной терапии данной нозологической формы. Эта информация суммирована в многочисленных справочниках, руководствах и инструкциях по применению. Кроме того, во внимание принимается опыт применения отдельных препаратов, накопленный в данном регионе или в конкретном лечебном учреждении, учитывающий особенности резистентности к лекарственным средствам штаммов, циркулирующих в определенной местности.

Однако из-за формирования резистентности у микроорганизмов эмпирически назначенная антибиотикотерапия может быть неэффективной. Поэтому важно проводить *коррекцию эмпирического выбора*, т. е. **этиотропное назначение антибиотиков**, соблюдая микробиологический

принцип рациональной антибиотикотерапии (применять антибиотики с учетом результатов определения резистентности к антибактериальным препаратам (антибиотикограммы) штаммов, выделенных от данного пациента); сопоставление с клинической эффективностью проводимой терапии при лечении данного пациента.

Определение антибиотикорезистентности проводят согласно утвержденным документам — стандартам или приказам, которые регламентируют процедуру определения антибиотикорезистентности микроорганизмов. В РБ существует приказ Министерства здравоохранения по определению антибиотикорезистентности, в Европе и Америке разработаны рекомендации EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) — критерии Института клинических и лабораторных стандартов, США).

Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам

Диско-диффузионный метод (метод стандартных дисков)

Принцип метода: поверхность плотной питательной среды (агар Мюллера-Хинтон) засевают сплошным слоем исследуемой чистой культурой, суспензию которой готовят на 0,9 % растворе натрия хлорида до оптической плотности 0,5 по МакФарланду ($1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл). Не позднее, чем через 10 мин после инокуляции с помощью стерильного пинцета накладывают не более 6 дисков, пропитанных антибиотиками, на расстоянии не менее 2 см друг от друга.

Можно этот процесс автоматизировать: применить диспенсер для дисков с антибиотиками (вставляются картриджи с дисками), который предназначен для одновременного укладывания на поверхность засеянного агара 8 стандартных дисков с антибиотиками (рисунок 28).



Рисунок 28 — Применение диспенсера для дисков с антибиотиками

Регистрация результатов проводится через 18–24 ч инкубирования в термостате по диаметру зоны отсутствия роста вокруг дисков с антибиотиками (рисунок 29). Наличие роста вокруг диска свидетельствует о нечувствительности (устойчивости) данного микроба к антибиотику.

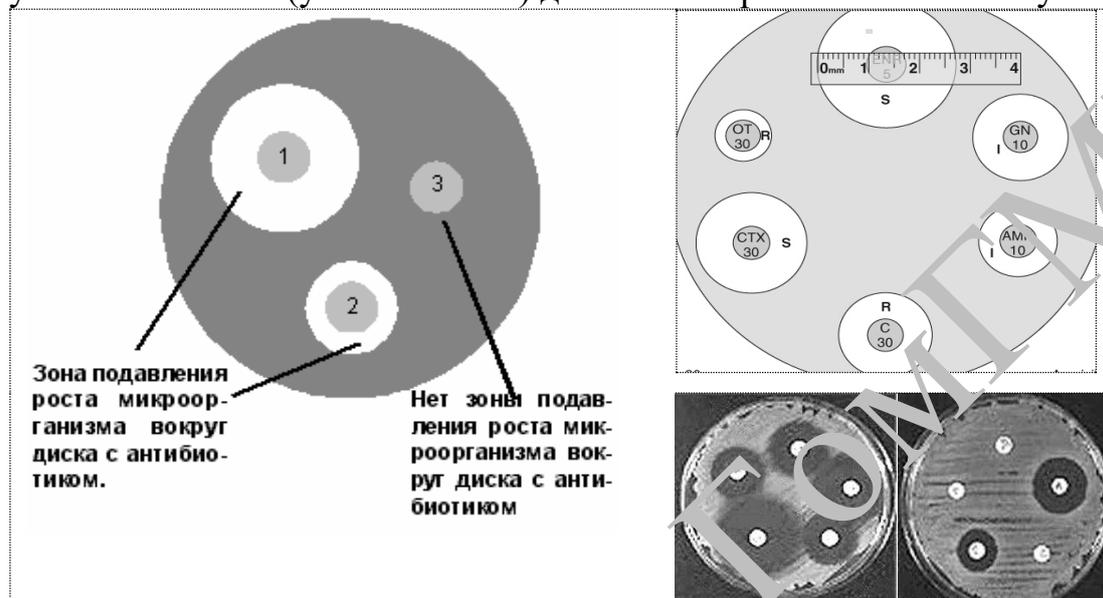


Рисунок 29 — Определение чувствительности микроорганизмов диско-диффузионным методом:

- 1 — микроорганизм чувствителен к антибиотику;
- 2 — микроорганизм умеренно устойчив к антибиотику;
- 3 — микроорганизм устойчив к антибиотику

Для интерпретации результатов используются специальные таблицы.

При характеристике микроорганизмов используют общепринятые показатели — чувствительные (**Ч**) к антибиотику, **S** (англ.: *sensitive*); умеренно устойчивые (**УУ**) к антибиотику, **I** (англ.: *intermediate*); резистентные или устойчивые (**У**) к антибиотику, **R** (англ.: *resistant*).

Параллельно с тестированием клинических изолятов проводят тестирование контрольного штамма. При соответствии зон задержки роста контрольного штамма его паспортной характеристике считают условия постановки эксперимента стандартными, а результаты определения антибиотикоуствительности клинических изолятов — достоверными.

Достоинства метода: легковоспроизводимый, можно определить чувствительность одновременно к нескольким антибиотикам.

Недостатки метода: качественный метод, не позволяет определить минимальную подавляющую концентрацию препарата, неприемлим для тестирования медленно растущих микроорганизмов (*M. tuberculosis*).

Метод Е-тестов

Принцип метода: определение чувствительности микроорганизма проводится аналогично тестированию диско-диффузионным методом. Отличие состоит в том, что вместо диска с антибиотиком используют полос-

ку Е-теста, содержащую градиент концентраций антибиотика от максимальной к минимальной. В месте пересечения эллипсовидной зоны подавления роста с полоской Е-теста получают значение минимальной подавляющей концентрации (МПК).

Пример метода Е-тестов представлен на рисунке 30.



Рисунок 30 — Определение чувствительности бактерий с помощью Е-тестов

Метод серийных разведений в бульонной среде

Принцип метода: в пробирках, содержащих 1 мл Мюллер-Хинтон бульона, готовят серийные двукратные разведения антибактериального препарата, например 100 мкг/мл — 1-я, 50 мкг/мл — 2-я, 25 мкг/мл — 3-я, 12,5 мкг/мл — 4-я и т. д. Затем в каждую пробирку вносят 0,1 мл испытуемой бактериальной суспензии. Одновременно ставят контроль роста (1 мл Мюллер — Хинтон бульона и 0,1 мл суспензии бактерий). Посевы инкубируют при 37 °С в течение 18–24 ч, после чего отмечают результаты. Отсутствие помутнения среды свидетельствует о задержке роста бактерий в присутствии данной концентрации препарата (рисунок 31).



Рисунок 31 — Определение значения минимальной подавляющей концентрации методом разведения в жидкой питательной среде

Минимальная подавляющая (ингибирующая) концентрация (МПК или МИК) — наименьшая концентрация антибиотика (в мкг/мл или мг/л), которая *in vitro* полностью подавляет видимый рост бактерий.

Достоинства метода: количественный, позволяет определить МПК препарата.

Недостатки метода: более материалоемкий и трудоемкий по сравнению с методом бумажных дисков.

Метод серийных разведений в агаре

Принцип метода. Суточные агаровые культуры микроорганизмов разводятся в стерильном изотоническом растворе хлорида натрия до стандарта мутности 0,5 по МакФарланду и используются для посева на агар Мюллера-Хинтона с различными концентрациями антибиотиков. Диапазон разведений антибиотиков может быть, например, 0,25–128 мкг/мл. После автоклавирования колбы с питательной средой помещают на водяную баню при 48–50 °С, после чего в них асептически вносят рабочие растворы антибиотиков (1 часть рабочего раствора антибиотика на 9 частей расплавленного агара). Затем среду тщательно перемешивают и разливают по чашкам Петри. Далее бактериальную суспензию помещают на поверхность агара в чашке; посеvy инкубируют в термостате 18–24 ч. Наличие роста микроорганизма на поверхности агара свидетельствует о том, что данная концентрация антибиотика недостаточна, чтобы подавить его жизнеспособность. По мере увеличения концентрации антибиотика рост микроба уменьшается. Первую наименьшую концентрацию антибиотика (из серии последовательных разведений), при которой визуально не определяется бактериальный рост, принято считать МПК. Измеряется МПК в мг/л или мкг/мл.

Одномоментный посев нескольких исследуемых культур микробов можно проводить с помощью специальных штампов-репликаторов. Штамп-репликатор состоит из основания с 50 лунками для заливки культур и верхней части (крышки), имеющей 50 штифтов, которые при наложении крышки на основание входят в лунки. Испытуемые культуры последовательно заливают по 50 мкл в лунки штампа. Затем накладывают крышку на основание штампа так, чтобы штифты вошли в лунки и смочились культурой. Посев производят путем прикосновения (отпечатывания) нижних концов штифтов к поверхности агара с антибиотиком в чашке Петри. Чашки инкубируют в термостате 18–24 часа. Культура считается чувствительной к данной концентрации, если ее рост полностью подавлен. МПК — минимальная концентрация антибиотика, подавляющая видимый рост исследуемого микроорганизма, в данном случае — на плотной питательной среде. Параллельно с чашками Петри с питательной средой, содержащими растворы антибиотиков, для контроля роста готовят чашки Петри с питательной средой без антибиотиков.

Автоматизированные методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам

При массовых исследованиях используют *автоматизированные методы определения чувствительности к антибиотикам*. Это позволяет упростить и ускорить проведение исследования. Для этого *применяют микробиологические (бактериологические) анализаторы*, например VITEK, АТВ-expression, РНОENIX (информация о них представлена в вышеизложенном материале), которые предназначены не только для идентификации микроорганизмов, но и определения их чувствительности к антимикробным препаратам.

Молекулярно-генетический метод

В последние годы в практике стали применять полимеразную цепную реакцию для выявления у микроорганизмов *специфических генов, ответственных за формирование лекарственной устойчивости* (как индикация антибиотикоустойчивых культур микроорганизмов).

Иммунологический метод исследования. Иммунологические реакции

ПОНЯТИЕ ОБ ИММУНОЛОГИЧЕСКОМ МЕТОДЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЯХ

Иммунологическим (серологическим) называют метод исследования, в основе которого лежит иммунологическая реакция.

Иммунологическая реакция — реакция специфического взаимодействия АТ с АГ, протекающая *in vitro*. Эту реакцию еще называют **серологической**, т. к. для ее постановки используют сыворотку (*serum*), содержащую антитела.

Практическое использование иммунологических реакций призвано решить ряд важнейших вопросов и задач в области инфекционной и неинфекционной иммунологии (клиники, лаборатории, эпидемиологического очага, судебной медицины и др.):

1. Текущая и ретроспективная серодиагностика инфекционного заболевания; серодиагностика аутоиммунных заболеваний и аллергических реакций немедленного типа.
2. Серологическая идентификация выделенных в бактериологической лаборатории возбудителей инфекционных болезней.
3. Экспресс-диагностика инфекционных заболеваний при обнаружении АГ микроорганизмов (например, диагностика хламидиозов, микоплазмозов методом РИФ).

4. Определение активности поствакцинального или постинфекционного индивидуального или коллективного иммунитета для последующего обоснования прогноза заболеваемости среди населения, для оценки эффективности применения вакцин.

5. Косвенная оценка эффективности специфического лечения или санации больных и носителей патогенных возбудителей.

6. Составление представления о размерах действующих и потенциальных очагов инфекционных, преимущественно природно-очаговых, заболеваний.

7. Оценка некоторых показателей иммунного статуса пациента.

8. Определение титров диагностических, лечебных и профилактических сывороток.

9. Диагностика опухолей при обнаружении в сыворотке опухолеассоциированных АГ (например, ПСА (простатспецифический АГ) при раке предстательной железы).

10. Определение групп крови, подбор доноров при пересадке органов, определение гормонов (напр., щитовидной железы, половых гормонов).

11. Определение фальсификации пищевых продуктов, судмедэкспертиза на основании определения видовой принадлежности антигенов.

12. Индикация возбудителей отдельных инфекционных заболеваний на объектах внешней среды.

Иммунологические реакции протекают в две фазы:

1) *специфическая* — фаза взаимодействия, в которой происходит комплементарное соединение активных центров антител и эпитопов антигена; обычно эта фаза длится несколько секунд или минут;

2) *неспецифическая* — фаза проявления, характеризующаяся внешними признаками образования иммунных комплексов; может развиваться от нескольких минут до нескольких часов (в среднем — 30 мин).

Реакция «АГ — АТ» в системе *in vitro* может сопровождаться возникновением нескольких феноменов — агглютинации, преципитации, нейтрализации, лизиса. Внешние проявления реакции зависят от физико-химических свойств АГ (размеры частиц, физическое состояние), класса и вида АГ (полные и неполные), а также условий опыта (консистенция среды, концентрация солей, рН, температура). Оптимальное специфическое взаимодействие АТ с АГ происходит в изотоническом растворе с рН, близким к нейтральному, при температуре +37 °С.

Иммунологические реакции используются с диагностической целью в двух направлениях (таблица 16), для выявления:

1) *антигена* микроорганизма (серологическая идентификация);

2) *антител* в сыворотке крови пациента (серодиагностика).

Таблица 16 — Применение иммунологических реакций

| Направление исследования | Цель исследования | Антиген | Антитела |
|---|--|---|--|
| <i>Серологическая идентификация</i> (серотипирование, экспресс-диагностика) | Установление родовой и видовой принадлежности микроорганизма | <i>Неизвестный</i> (чистая культура микроорганизма или исследуемый материал, содержащий микроорганизмы) | <i>Известные</i> (иммунная диагностическая сыворотка) |
| <i>Серодиагностика</i> | Обнаружение антител в сыворотке крови | <i>Известный</i> (антигенный диагностикум) | <i>Неизвестные</i> (сыворотка крови обследуемого пациента) |

Таким образом, в иммунологических реакциях один из двух основных компонентов (АГ или АТ) всегда должен быть известным, чтобы найти другой неизвестный компонент.

СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Серотипирование — это идентификация *неизвестного микробного АГ* в выделенной (бактериологическом методом) чистой культуре микроорганизмов с помощью *известной диагностической сыворотки*.

Экспресс-диагностика — это определение *неизвестного микробного АГ* непосредственно в исследуемом патологическом материале с помощью *известной диагностической сыворотки*. Для экспресс-диагностики инфекционных заболеваний при обнаружении АГ микроорганизмов (например, диагностика хламидиозов, микоплазмозов) часто применяют РИФ.

Диагностическая сыворотка — иммунная сыворотка, содержащая АТ известной специфичности в известном титре.

Известные диагностические иммунные антисыворотки получают путем гипериммунизации (многократной иммунизации) животных (кроликов, лошадей) соответствующими АГ (рисунок 32). *Иммунные сыворотки содержат АТ*. Различают следующие АТ: агглютинины, преципитины, бактериолизин, опсонины, антитоксины. Агглютинины вызывают склеивание микробов, дают реакцию агглютинации. Преципитины обуславливают осаждение АГ — преципитацию. Бактериолизины вызывают растворение (лизис) бактерий — бактериолиз. Опсонины способствуют фагоцитозу. Антитоксины нейтрализуют действие микробного экзотоксина.



Рисунок 32 — Принцип получения диагностических сывороток

Моноклональные АТ — АТ, продуцируемые одним клоном плазматических клеток. Ц. Мильштейн и Г. Келер в 1975 г. разработали методику получения моноклональных АТ, создав бессмертные клоны В-клеток, которые называют *гибридомами* (рисунок 33). Получают гибридомы путем слияния нормальных по продолжительности жизненного цикла антителопродуцирующих клеток (плазматитов) с опухолевыми (бессмертными) клетками миеломы, не способных к секреции АТ. Затем отобранные селекцией и размноженные В-лимфоциты гибридомного клона культивируют на питательных средах или прививают в брюшную полость мыши с асцитной опухолью, где (в экссудате брюшной полости) появляются многочисленные моноклональные АТ одной специфичности. С помощью гибридом можно получить неограниченное количество АТ, которые сохраняют свою высокую специфичность и чувствительность.

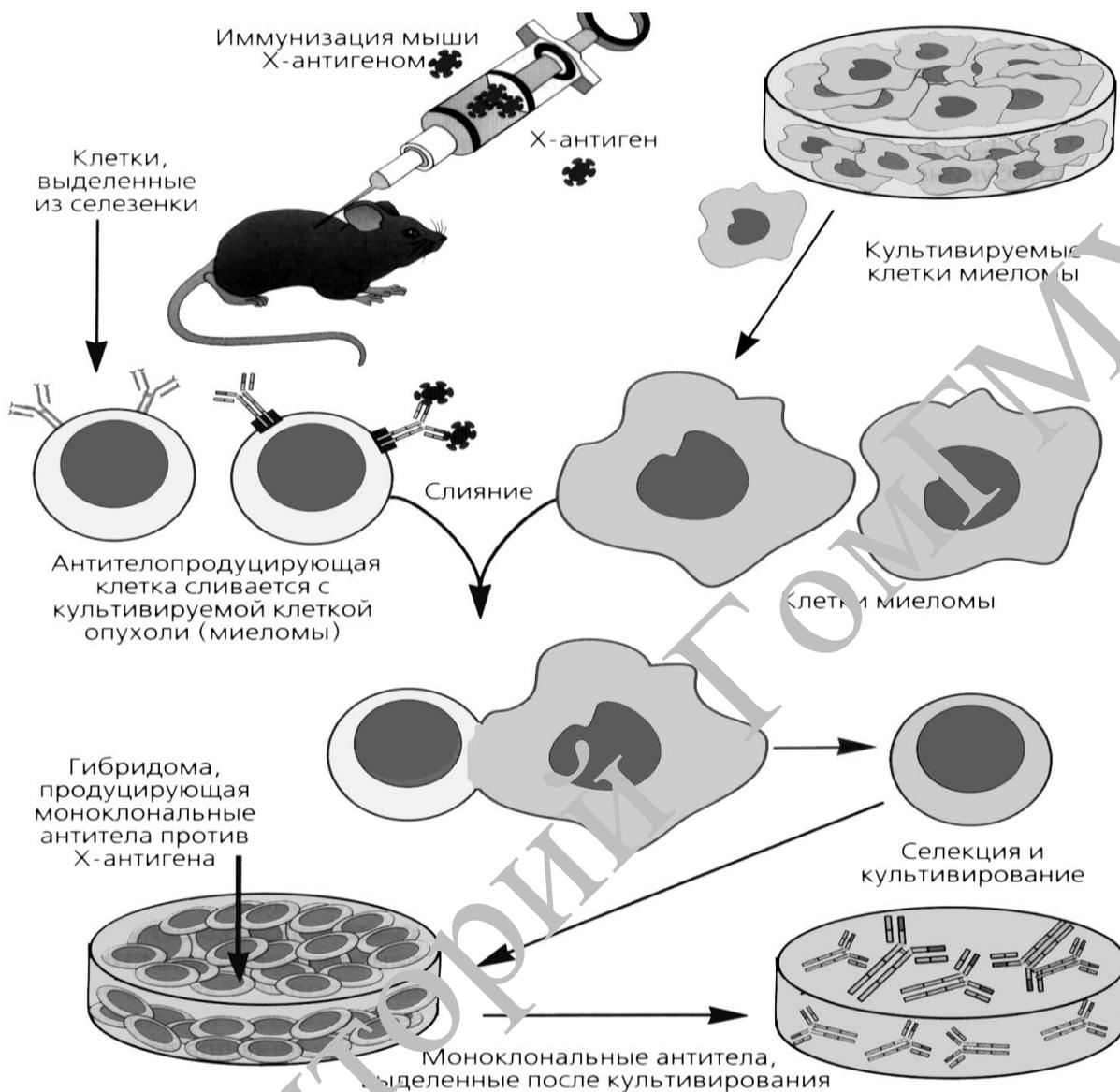


Рисунок 33 — Схема получения моноклональных антител

Полученные моноклональные АТ широко используются в клинико-диагностической практике в виде моноклональных диагностических сывороток.

Серологическая идентификация неизвестных микробов включает определение серологической группы (серогруппы), видовой и типовой (серотипы), принадлежности выделенных микроорганизмов. Соответственно, важна информация об антигенной структуре бактерий.

В составе бактерий различают АГ:

- групповые — общие для нескольких видов бактерий одного рода или семейства;
- видовые — характерные только для определенного вида;
- варианты (типоспецифические) — по которым группы микроорганизмов различаются внутри вида (серовары);
- штаммоспецифические — специфичные только для отдельных штаммов.

Серовары (серотипы) микроорганизмов — варианты микроорганизмов, различающиеся внутри вида по антигенной структуре, и объединенные наличием в структуре микроба идентичных антигенов (типоспецифических).

При идентификации выделенной чистой культуры не только до рода, вида, но и до серологического варианта — серовара (**серотипирование**) необходимо проводить иммунологические реакции с поливалентными, видовыми, монорецепторными или типоспецифическими диагностическими сыворотками.

СЕРОДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Серодиагностика — это определение *неизвестных АТ* в сыворотке крови больного с помощью *известного антигенного диагностикума*.

Диагностикум — взвесь убитых нагреванием или химическими веществами бактерий или извлеченных из них АГ. Виды диагностикумов: О-, Н-, Vi-диагностикумы, эритроцитарный антигенный диагностикум и др.

Антитела к возбудителю заболевания у пациента *появляются*, как правило, к концу 1-й недели заболевания, с этого времени и используют *серодиагностику*.

Серодиагностику могут проводить как для выявления *наличия АТ* (качественные реакции), так и для определения *количества АТ* (нарастание титра — метод «парных сывороток»).

При постановке иммунологических реакций для серодиагностики определяют титр АТ в сыворотке крови пациента (титр сыворотки). За **титр сыворотки** принимают максимальное (последнее) разведение сыворотки крови пациента, в которой еще наблюдается положительный результат реакции. Положительный результат серологической реакции свидетельствует о наличии в сыворотке крови обследуемого пациента АТ, гомологичных применяемому АГ; отрицательный результат указывает на отсутствие таковых. Далее полученный титр АТ в реакции сравнивают с диагностическим.

Критерии серодиагностики

Выделяют следующие *критерии серодиагностики*: диагностический титр и нарастание титра АТ.

Диагностический титр — это титр АТ, указывающий на заболевание, т.е. в данном титре реакция положительна только у больных и отрицательна у здоровых. Если полученный титр сыворотки крови пациента такой же, как и диагностический титр, или выше, следовательно, пациенту ставят серологический диагноз соответствующего заболевания; если полученный титр сыворотки ниже диагностического титра, то на данном временном этапе серологически диагноз заболевания не подтверждается.

Достоверные результаты получают при исследовании *парных сывороток* крови больного: одной — взятой к концу 1-й недели заболевания, и

второй — через 7–14 дней, когда титр антител повышается под воздействием находящегося в его организме патогенного микроорганизма. В этом случае удастся наблюдать динамику **нарастания титра АТ**. При установлении свежего случая заболевания либо при вирусных инфекциях диагностическое значение имеет 4-кратное нарастание титра АТ в парных сыворотках. Однако при наличии дополнительных клинических и эпидемиологических данных для установления диагноза достаточно 2-кратного нарастания титра АТ.

При острых инфекционных заболеваниях обнаружение АТ часто бывает ретроспективным диагнозом, т. к. они появляются в достаточных титрах к 7–8 дню от начала болезни, и к этому сроку болезнь может закончиться.

Определение антител различных классов

С внедрением в практику лабораторий метода ИФА стало возможным определять в крови больных АТ, относящиеся к различным классам иммуноглобулинов (IgM и IgG), что существенно повысило информативность серологических методов диагностики. При первичном иммунном ответе, когда иммунная система человека взаимодействует с инфекционным агентом в первый раз, синтезируются преимущественно АТ, относящиеся к иммуноглобулинам класса М. Следовательно, *выявление специфических IgM свидетельствует о свежем случае заболевания* (инфекционная реакция). Лишь позднее, на 8–12 день после попадания АГ в организм, в крови начинают накапливаться АТ — иммуноглобулины класса G. Таким образом, *выявление специфических IgG свидетельствует о более позднем периоде заболевания*, либо это анamnестическая реакция: постинфекционная (титр АТ выше) или поствакцинальная (титр АТ ниже).

При повторном контакте с АГ (вторичном иммунном ответе) уже с первых часов развития иммунного ответа количество сывороточных антител IgG против данного возбудителя инфекционного заболевания превышает количество АТ класса IgM. Поэтому, *количественное определение в крови пациентов АТ классов IgM и IgG к соответствующему АГ позволяет не только судить о наличии заболевания, но и оценить, первичное это инфицирование или вторичное.*

При иммунном ответе на инфекционные антигены вырабатываются также и АТ класса IgA, которые играют важную роль в защите от инфекционных агентов кожи и слизистых оболочек.

ОБЩАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ

К иммунологическим реакциям относят:

- *серологические реакции* — реакции между АГ и АТ *in vitro*;
- *аллергические пробы* — выявление гиперчувствительности;
- *клеточные реакции* — с участием иммунокомпетентных клеток.

Общая классификация серологических реакций:

а) *Простые* (2-х компонентные: АГ + АТ):

- РА — с корпускулярным АГ;
- РП — с растворимым АГ;
- РН экзотоксина антитоксинами.

б) *Сложные* (3-х компонентные: АГ + АТ + комплемент):

- реакция иммунного бактериолиза;
- реакция иммунного гемолиза;
- РСК.

в) *Реакции с использованием метки:*

- ИФА;
- РИФ;
- РИА;
- иммуноблотинг.

РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ

Реакция агглютинации (РА) (от лат. *agglutinatio* — склеивание) — склеивание корпускулярных АГ (бактерий, эритроцитов и др.) специфическими АТ в присутствии электролита, в результате чего выпадает осадок (агглютинат).

Реакция протекает в две фазы.

1) специфическая фаза — связывание детерминантной группы (эпитопа) АГ с паратопом иммуноглобулина (невидимая фаза);

2) неспецифическая (видимая) фаза — образующийся комплекс (АГ+АТ) утрачивает растворимость и выпадает в осадок в виде хлопьев.

Компоненты реакции (рисунок 34):

1) АГ — антиген (*агглютиноген*) в виде взвеси клеток (бактерий, эритроцитов и др.);

2) АТ — антитела (*агглютинины*) в виде иммунной сыворотки;

3) электролит (0,85 % раствор натрия хлорида).

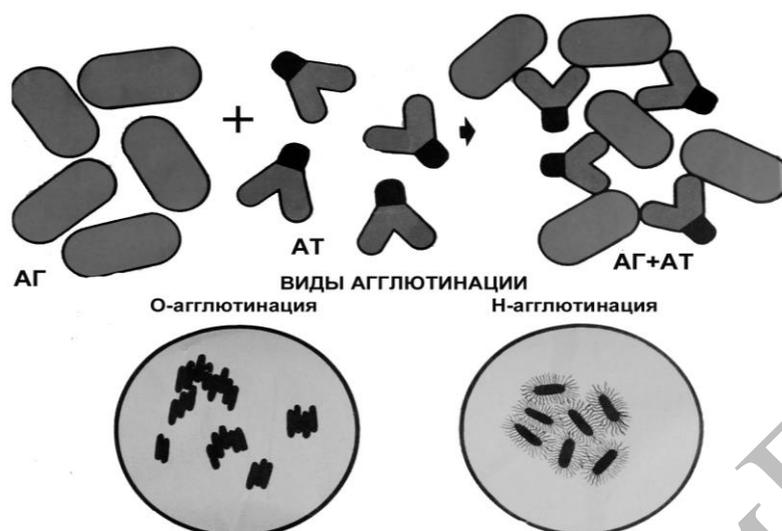


Рисунок 34 — Схема реакции агглютинации.

Характер агглютинации, т. е. тип образующегося агглютината (хлопьев) может быть разным. Крупнохлопчатая агглютинация (H-агглютинация) получается при соединении жгутиковых бактерий и дает рыхлый осадок; мелкозернистая агглютинация — при соединении безжгутиковых бактерий.

РА можно применять для обнаружения специфических АТ в сыворотке крови пациента (серодиагностика) и, наоборот, при помощи стандартной агглютинирующей сыворотки можно идентифицировать выделенные микробы (серотипирование).

Агглютинирующие сыворотки используются для постановки реакции агглютинации и содержат АТ — агглютинины.

Агглютинирующие сыворотки получают путем гипериммунизации кроликов: им вводят 5–7 раз парентерально с интервалом между инъекциями 2–7 дней в возрастающих количествах взвесь убитых, а в конце — 2–3 раза живых бактерий (рисунок 35).

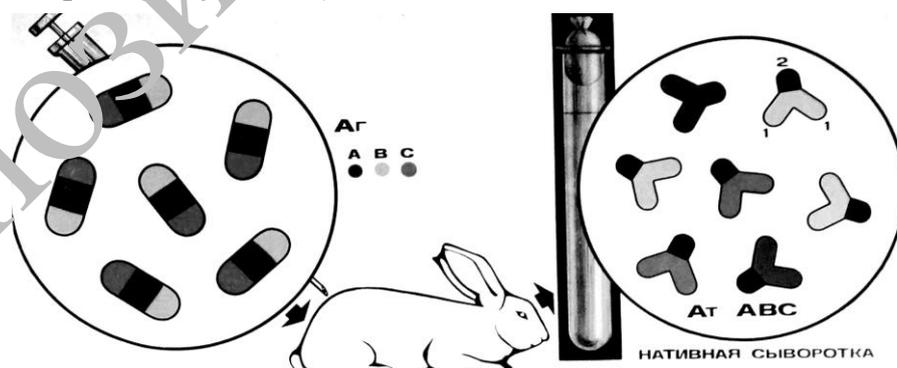


Рисунок 35 — Схема получения диагностической иммунной сыворотки

Через неделю после иммунизации определяют титр сыворотки. Титром агглютинирующей сыворотки является максимальное ее разведение, при котором наблюдается агглютинация (склеивание) гомологичных микробов. Полученные таким образом сыворотки называют неадсорбированными,

поскольку содержат групповые агглютинины и могут в небольших разведениях склеивать родственные в антигенном отношении бактерии. Естественно, что групповая реакция агглютинации с использованием таких сывороток затрудняет серологическую идентификацию микроорганизма.

Более достоверные результаты при определении вида или серовара (серотипа) бактерий дают **адсорбированные сыворотки**, которые не имеют групповых агглютининов и не вызывают групповой агглютинации. Их получают *методом адсорбции агглютининов по Кастеллани*: основан на том, что из неадсорбированной иммунной сыворотки последовательно извлекают групповые АТ, добавляя к ней групповые АГ (рисунок 36).

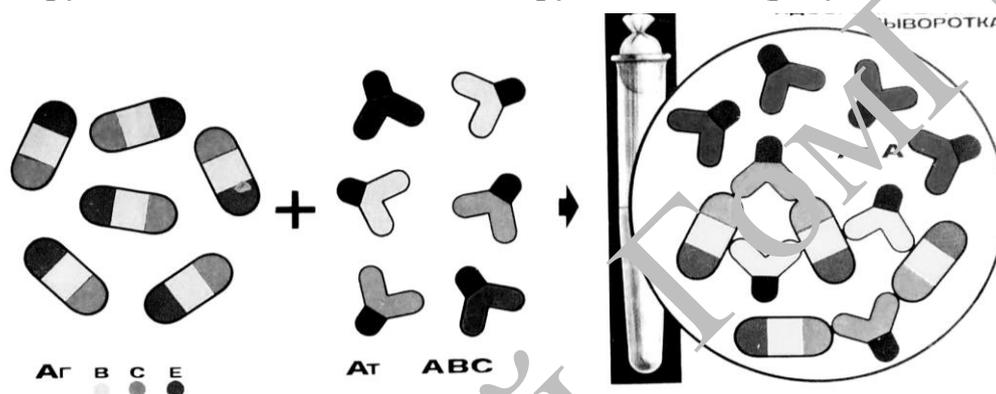


Рисунок 36 — Схема метода адсорбции агглютининов по Кастеллани

Наступает агглютинация, агглютинат оседает, удаляется. *Получается адсорбированная сыворотка*, в которой остаются только специфические антитела, не вступившие в реакцию с групповым АГ. Такая сыворотка при ее использовании уже не дает групповой агглютинации. Адсорбированные сыворотки могут быть *монорецепторными (моновалентными)* или *типоспецифическими* (содержат АТ одной специфичности, т. е. только к одному специфическому АГ возбудителя) и *поливалентными* (содержат АТ разной специфичности).

Классификация реакций агглютинации (рисунок 37)

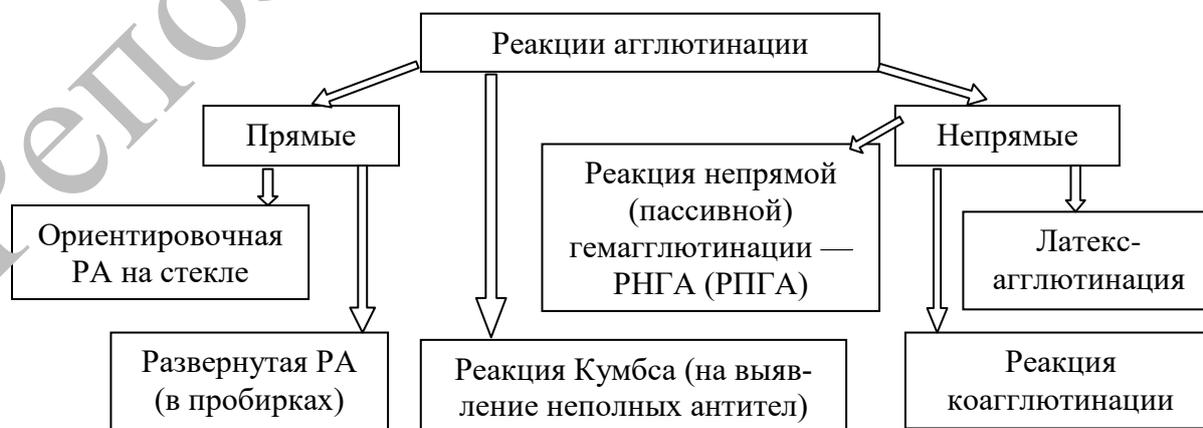


Рисунок 37 — Схема классификации реакций агглютинации

Ориентировочная реакция агглютинации на стекле для идентификации микроорганизма — реакция Грубера

Реакция служит для предварительного определения вида микроба.

Постановка реакции. На предметное стекло наносят каплю агглютинирующей сыворотки (опыт) и рядом – каплю физиологического раствора (контроль). Исследуемую культуру микроба, взятую с поверхности плотной питательной среды, петлей вносят в каплю физиологического раствора и в каплю сыворотки и тщательно эмульгируют до получения гомогенной взвеси, затем стекло слегка покачивают. Реакция происходит при комнатной температуре.

Результаты реакции учитывают невооруженным глазом через 2–4 мин, иногда для этого используют лупу. При положительной реакции в капле с известной сывороткой наблюдается скупивание бактерий в виде хлопьев-агглютинатов (крупных или мелких) на фоне прозрачной жидкости, а контрольная капля физиологического раствора остается равномерно мутной (рисунок 38). Хлопья хорошо видны на темном фоне при покачивании предметного стекла. При отрицательной реакции жидкость остается равномерно мутной, как и в контроле. Реакцию ставят перед постановкой развернутой РА для идентификации микроба.



Рисунок 38 — Схема ориентировочной реакции агглютинации на стекле

Развернутая (объемная) реакция агглютинации

Развернутую РА проводят в пробирках. Она используется для *серотипирования* — определения серогруппы, серовара микроорганизмов и для *серодиагностики* инфекционных заболеваний.

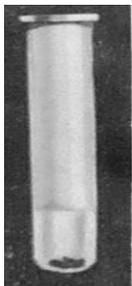
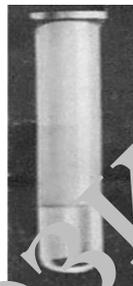
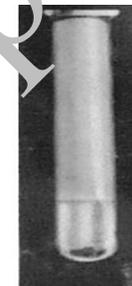
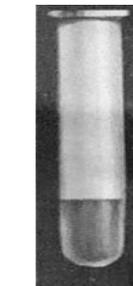
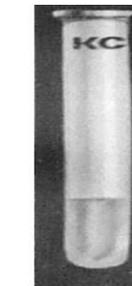
Применение РА для серологической диагностики инфекционных заболеваний — брюшного тифа и паратифов (реакция Видаля), сыпного тифа

(реакция Вейгля), бруцеллеза (реакции Райта), туляремии и других заболеваний — основано на определении АТ (агглютининов) в сыворотке больных.

Постановка реакции. Для проведения реакции (для серодиагностики) сыворотку крови больного разводят изотоническим раствором натрия хлорида от 1:50 или 1:100 до 1:800 или 1:1600. Более низкие концентрации АТ обычно не используют потому, что в крови могут находиться нормальные АТ, которые способны в небольших разведениях вызывать реакцию агглютинации. В качестве АГ в этой реакции используют *диагностикумы* — взвеси заведомо известных убитых микроорганизмов.

Результат реакции. При положительном результате реакции — агглютинация в виде осадка. Если используют О-диагностикум (убитые нагреванием или спиртом бактерии сохраняют О-антиген), агглютинация мелкозернистая (соединяются тела бактерий). Если используется Н-диагностикум (убитые формалином бактерии сохраняют жгутиковый Н-антиген), агглютинация в виде крупных хлопьев (соединяются жгутики бактерий). За **титр сыворотки** принимают последнее разведение сыворотки, в которой еще наблюдается положительный результат реакции — агглютинация в виде осадка (таблица 17). Далее полученный титр реакции сравнивают с диагностическим.

Таблица 17 — Постановка и учет разведенной реакции агглютинации

| Разведения сыворотки крови пациента | | | | | Контроль | |
|---|---|---|---|--|---|---|
| 1:50 | 1:100 | 1:200 | 1:400 | 1:800 | Сыворотки | Антигена |
|  |  |  |  |  |  |  |
| Результат реакции | | | | | | |
| + | + | + | + | - | Прозрач- | Диффуз- |
| Осадок | Осадок | Осадок | Осадок | Осадка | ность | ное по- |
| есть | есть | есть | есть | нет | | мутнение |
| <i>Примечание.</i> В данном примере титр антител в сыворотке пациента равен 1:400, так как 1:400 — это максимальное разведение сыворотки, в которой еще наблюдается положительный результат реакции (агглютинация в виде осадка). | | | | | | |

Реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации — РНГА (РПГА)

Антитела сыворотки крови пациента для серодиагностики выявляют с помощью *эритроцитарного антигенного диагностикума*, который представляет собой эритроциты с адсорбированными на них АГ (рисунок 39).

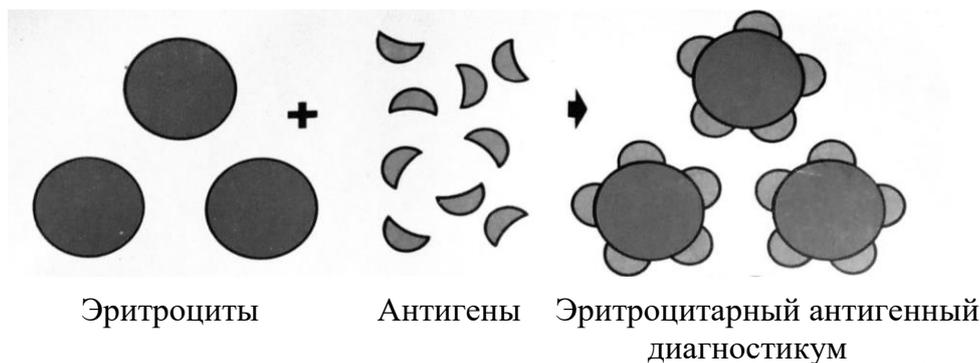


Рисунок 39 — Эритроцитарный антигенный диагностикум (схема)

Постановка РНГА. В лунках полистироловых планшетов готовят ряд последовательных двукратных разведений сыворотки пациента. В предпоследнюю лунку вносят 0,5 мл заведомо положительной сыворотки и в последнюю 0,5 мл физиологического раствора (контроль). Затем во все лунки добавляют 0,1 мл разведенного эритроцитарного антигенного диагностикума, помещают в термостат на 2 ч.

Результат реакции. В положительном случае эритроциты с адсорбированными на них АГ взаимодействуют с АТ сыворотки крови пациента, в результате эритроциты склеиваются и выпадают на дно ячейки планшета в виде фестончатого осадка — «зонтик». При отрицательной реакции эритроциты оседают в виде «пуговки» (рисунок 40).



Рисунок 40 — Постановка и учет реакции непрямой гемагглютинации

Реакция латекс-агглютинации

Помимо эритроцитов, в качестве носителей АГ или АТ можно использовать частицы латекса, которые служат носителями АГ и при образовании иммунных агрегатов играют роль «мостиков» между молекулами антител.

Постановка реакции: каплю суспензии латексного диагностикума прибавляют к капле исследуемой сыворотки, тщательно перемешивают. При положительной реакции образуются мелкие, но хорошо видимые невооруженным глазом агглютинаты.

Реакция латекс-агглютинации чаще проводится для выявления АГ (экспресс-диагностика).

Реакция коагглютинации

Белок А некоторых штаммов золотистого стафилококка способен неспецифически адсорбировать на своей поверхности Fc-фрагменты иммуноглобулина G (за исключением IgG₃). Получившаяся молекула способна агглютинировать гомологичные АГ. Схема реакции коагглютинации представлена на рисунке 41.



Рисунок 41 — Схема реакции коагглютинации

Реакция Кумбса (прямая, непрямая)

При помощи реакций прямой и непрямой агглютинации определяют полные (двухвалентные) антитела. **Неполные** (одновалентные, блокирующие) **АТ** не выявляются этими методами, т. к. у неполных АТ только один активный центр, а 2-й активный центр по неизвестной причине не работает (заблокирован).

Для выявления **неполных АТ** используют специальную **реакцию Кумбса**. С помощью реакции Кумбса выявляют неполные антиэритроцитарные АТ, фиксированные на поверхности эритроцитов или находящиеся в свободном состоянии в плазме. Они обнаруживаются у резус-отрицательных матерей при резус-конфликте, при гемолитической болезни новорожденных, гемолитических анемиях, при некоторых инфекционных заболеваниях (например, бруцеллезе), у больных системной волчанкой, при инфекционных полиартритах и при ряде коллагеновых заболеваний и других.

Неполные АТ при специфическом взаимодействии с эритроцитами (АГ) не вызывают их агглютинации.

Прямая реакция Кумбса: позволяет выявить *неполные АТ, фиксированные на эритроцитах*. Агглютинация эритроцитов осуществляется после добавления к неполным АТ, расположенным на эритроцитах, антиглобулиновой сыворотки (таблица 18).

Таблица 18 — Компоненты прямой реакции Кумбса и общая схема

| | |
|----------------------------------|---|
| Компоненты прямой реакции | 1 — эритроциты крови пациента (с неполными АТ); 2 — антиглобулиновая сыворотка кролика (содержит АТ против иммуноглобулинов человека (двухвалентные), получена гипериммунизацией кролика иммуноглобулинами человека) |
| Схема реакции | |
| Результат реакции | 3 — агглютинация эритроцитов и появление видимого осадка в результате связывания 2-х неполных (одновалентных) АТ (фиксированных на эритроцитах) с помощью полных (двухвалентных) антиглобулиновых АТ |

Непрямая реакция Кумбса: позволяет выявить *неполные АТ, находящиеся в свободном состоянии в сыворотке крови*. Свое название — непрямая — получила вследствие того, что реакция протекает в два этапа (таблица 19).

Таблица 19 — Компоненты непрямой реакции Кумбса и общая схема

| | |
|------------------------------------|---|
| Компоненты непрямой реакции | 1 — сыворотка больного, в которой определяют неполные АТ; 2 — эритроциты здорового человека; 3 — антиглобулиновая сыворотка кролика |
| Схема реакции | |
| Результат реакции | 4 — агглютинация эритроцитов и появление видимого осадка в результате связывания 2-х неполных (одновалентных) АТ с помощью полных (двухвалентных) антиглобулиновых АТ |

Первоначально сыворотка крови больного, содержащая неполные АТ, взаимодействует с добавленными нормальными эритроцитами 0 группы крови без видимых проявлений. На втором этапе внесенная антиглобулиновая сыворотка взаимодействует с неполными АТ, адсорбированными на эритроцитах, с появлением видимого осадка (феномен агглютинации).

РЕАКЦИИ ПРЕЦИПИТАЦИИ

В основе РП лежит образование и выпадение в осадок комплексов «антиген – антитело» (**реакция осаждения**).

В РП участвуют растворимые АГ — **преципитиногены** (продукты микроорганизмов, химические вещества и лекарственные препараты). АТ (**преципитины**), соединяясь с растворимыми АГ, вызывают их агрегацию, что проявляется в помутнении прозрачных жидкостей или выпадении осадка (**преципитата**). Иммунную сыворотку, содержащую преципитины, называют преципитирующей сывороткой. Диагностические преципитирующие сыворотки получают путем гипериммунизации лабораторных животных (например, кроликов) соответствующим АГ. В РП разводят не сыворотку, а АГ. Титром преципитирующей сыворотки является максимальное разведение АГ, который преципитируется данной сывороткой.

С помощью РП можно определять как неизвестный АГ, так и неизвестные АТ, но практически она применяется только с первой целью.

Реакция преципитации применяется в лабораторной практике для диагностики инфекционных заболеваний бактериальной этиологии, например, сибирской язвы (термопреципитация по Асколи). В судебной медицине РП используется для определения видовой принадлежности белка (кровавых пятен, спермы и т. д.). Особенно широко реакция применяется в экспериментальной биологии; с ее помощью, например, была определена степень родства различных видов животных. Применение РП для санитарно-гигиенического контроля пищевых продуктов позволяет выявить фальсификации мясных, рыбных, мучных изделий, примеси в молоке и т. д.

Реакцию преципитации проводят:

- в жидкой фазе;
- в агарозном геле (иммунодиффузия).

Реакция преципитации в жидкой фазе

Реакция кольцепреципитации по Асколи

Подготовка реакции

Реакцию ставят в узких преципитационных пробирках, куда вносят преципитирующую сыворотку, а сверху осторожно наслаивают растворенный неизвестный АГ. Пробирку при этом следует держать в наклонном положении. Добавив АГ, пробирку осторожно переводят в прямое положение.

При положительной реакции через несколько минут на границе соприкосновения двух жидкостей появится мутное кольцо преципитации (рисунок 42). Обязательны контроли АГ, сыворотки, заведомо положительный и заведомо отрицательный результаты.

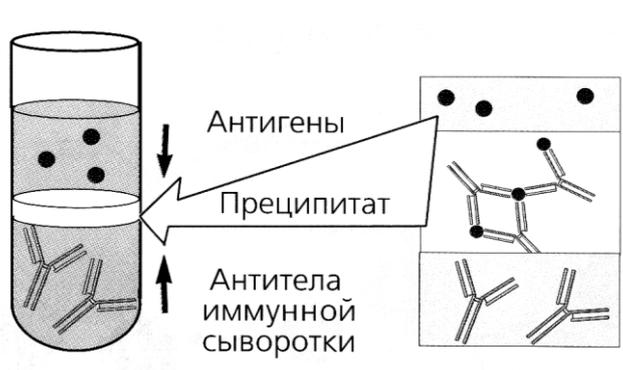


Рисунок 42 — Схема реакции кольцепреципитации по Асколи

Реакция преципитации в агаровом геле (иммунодиффузия)

Сущность реакции заключается в том, что АГ и АТ, помещенные в разные лунки в агаровом геле, диффундируют навстречу друг другу и при взаимодействии образуется комплекс, который проявляется в виде *линии преципитации*.

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.

Двойная радиальная иммунодиффузия по Оухтерлони

Постановка реакции. Реакцию проводят на пластинках или в чашках Петри с агаровым гелем. Газеттеры АГ и антисыворотки помещают в лунки, вырезанные на некотором расстоянии друг от друга.

Иммунореагенты (АГ и АТ) диффундируют в геле, при встрече образуют комплексы, которые проявляются в виде *линий преципитации*. Этот метод позволяет исследовать сразу несколько образцов иммунореагентов. Например, вокруг лунки с АГ можно разместить несколько лунок с разными антисыворотками (рисунок 43) или наоборот.

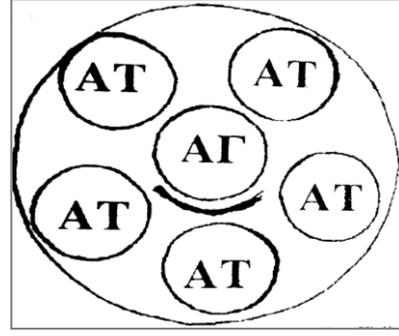
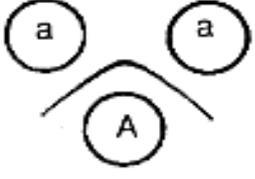
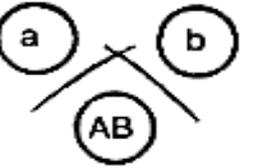
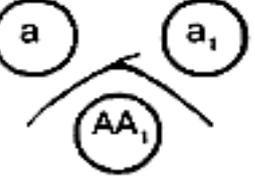


Рисунок 43 — Двойная радиальная иммунодиффузия по Оухтерлони

Двойная встречная иммунодиффузия по Оухтерлони

Принцип метода. В агаровом геле формируют лунки, в которые вносят АГ и сыворотку. АТ и АГ диффундируют навстречу друг другу в агар и образуют *линии преципитации*. Возможны три варианта расположения линий преципитации (таблица 20).

Таблица 20 — Варианты расположения линий преципитации

| Схема | Пояснения |
|---|---|
|  | <p>Обе линии преципитации полностью сливаются, что говорит об идентичности обоих АГ</p> |
|  | <p>Линии преципитации пересекаются, что говорит о неидентичности АГ</p> |
|  | <p>Если АГ частично идентичны, образуется одна, оторванная от общей, линия преципитации («шпора»), что говорит о наличии как общих детерминант между антигенами, так и дополнительных детерминант у одного из антигенов</p> |

Простая радиальная иммунодиффузия по Манчини

В данной реакции антисыворотка входит в состав агара, в который из лунки диффундирует АГ.

Принцип реакции

Агаровый гель смешивают с антисывороткой и ровным слоем наливают на стеклянную поверхность, например, в чашку Петри. После застывания в геле пробивают лунки и заливают в них растворы испытуемых АГ и стандартные. Реакцию проводят во влажной камере.

В положительном случае вокруг лунки с АГ образуется кольцеобразный преципитат. Диаметр кольца преципитации пропорционален концентрации АГ (чем выше концентрация внесенного АГ, тем больше диаметр кольца).

Если в реакции используется несколько стандартов с известной концентрацией АГ, то путем сравнения диаметров зоны преципитата и построения калибровочной кривой проводят количественное определение АГ в образцах.

Реакцию используют для определения в сыворотке крови иммуноглобулинов различных классов.

Схема простой радиальной иммунодиффузии по Манчини представлена на рисунке 44.

Иммуноэлектрофорез

Иммуноэлектрофоретический анализ (ИЭФ) представляет собой сочетание электрофореза в агаровом геле с иммунодиффузией. Существуют различные варианты иммуноэлектрофореза.

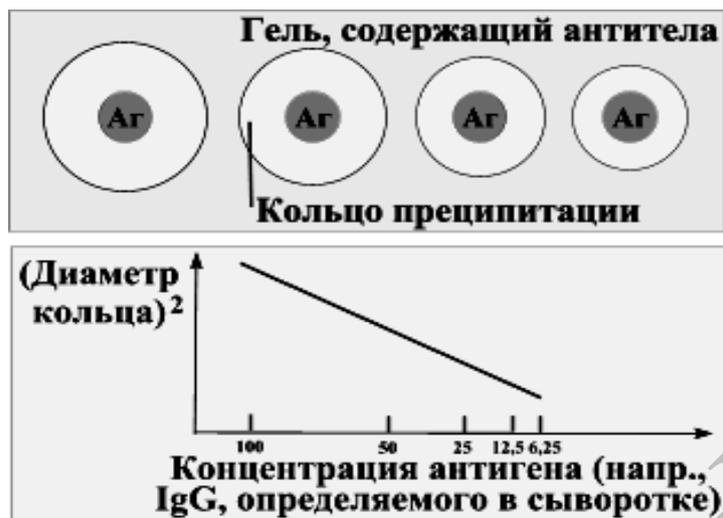


Рисунок 44 — Простая радиальная иммунодиффузия по Мэллери

Принцип ИЭФ. Вначале проводят электрофоретическое разделение белков (АГ) в забуференном агаровом геле; после снятия напряжения вдоль направления движения белков в электрическом поле в геле вырезают канавку, в которую вносят преципитирующую иммунную сыворотку. АГ и антисыворотка диффундируют в гель навстречу друг другу, и в месте их взаимодействия возникает дугообразные линии преципитации, число, положение и форма которых дают представление о качественном составе исходной смеси АГ (рисунок 45).

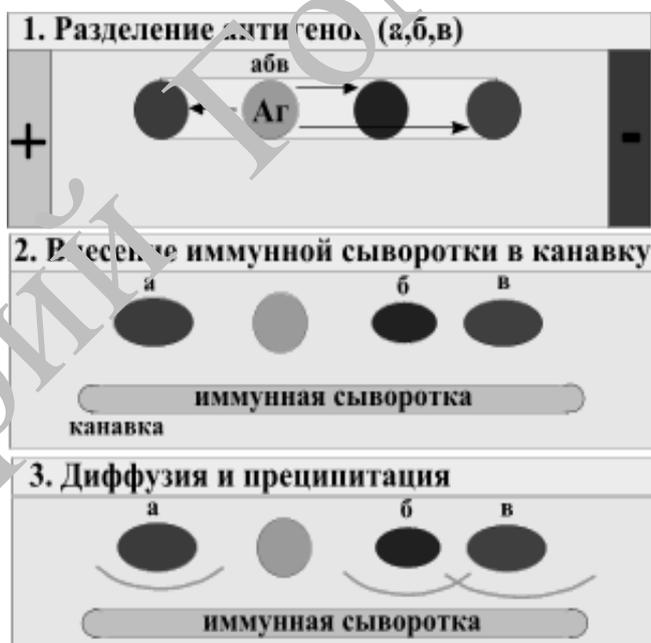


Рисунок 45 — Принцип иммуноэлектрофореза

С помощью данного метода в клинической иммунологии полуколичественно определяют концентрацию иммуноглобулинов различных классов, идентифицируют миеломные белки. Также ИЭФ используется при диагностике иммунодефицитных состояний.

Встречный иммуноэлектрофорез

Постановка реакции. Для проведения этого метода на стеклянную пластину наносят слой агара в буфере со щелочной реакцией. В агаре вырезают два параллельных ряда лунок — один ряд подключается к катоду (–), другой к аноду (+) электрофоретического устройства. В «катодный» ряд

лунок вносится исследуемая кровь с АГ, в «анодный» ряд — АТ к АГ. При прохождении постоянного тока отрицательно заряженный АГ, предположительно содержащийся в катодном ряду, мигрирует в щелочной среде к аноду. Наоборот, эндоосмотические силы «толкают» иммуноглобулины, находящиеся в анодном ряду, к катоду, навстречу АГ. При их взаимодействии образуется, в положительных случаях, линия преципитации.

РЕАКЦИИ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ

Реакции нейтрализации в основном применяются для идентификации бактериального экзотоксина по его видовой и типовой принадлежности, а также для определения содержания антитоксина в исследуемой сыворотке. Бактериальный экзотоксин в смеси с гомологичной антитоксической сывороткой не разрушается, а нейтрализуется (связывается).

Антитоксическую сыворотку (содержит АТ — антитоксины) получают путем гипериммунизации лошади соответствующим анатоксином. **Анатоксин** — это экзотоксин, лишенный своих ядовитых свойств, но сохранивший иммуногенные свойства. Для получения анатоксина к экзотоксину добавляют 0,3–0,4 % формалина и помещают в термостат при температуре 39–40 °С на 4 нед. (по Рамону). Полученный анатоксин контролируют на безвредность путем введения его морским свинкам или белым мышам, а также на стерильность и иммуногенность.

Нейтрализация экзотоксина антитоксином получается в строго определенных пропорциях и при одномоментном добавлении всего количества токсина к антитоксину. РН экзотоксина строго видо- и типоспецифична.

Реакция нейтрализации может проводиться:

- *in vitro*;
- *in vivo* (на морских свинках или белых мышах, и кожные иммунологические пробы).

Выявление токсигенности возбудителя дифтерии в реакции преципитации в геле по Оухтерлони (тест Илека)

Ингредиенты реакции. Исследуемый материал – исследуемые культуры возбудителя дифтерии. Диагностический препарат – антитоксическая сыворотка (в бумажной полоске), содержит антитела-антитоксины, получена путем гипериммунизации лошади дифтерийным анатоксином.

Принцип реакции. Иммунореагенты (АГ и АТ) диффундируют в геле, при встрече образуют комплексы, которые осаждаются в виде линий преципитации. И если есть линии преципитации, следовательно, культура микробов токсигенная, т. е. продуцирует экзотоксин. Если отсутствуют линии преципитации — нетоксигенная культура коринебактерий дифтерии (рисунок 46).

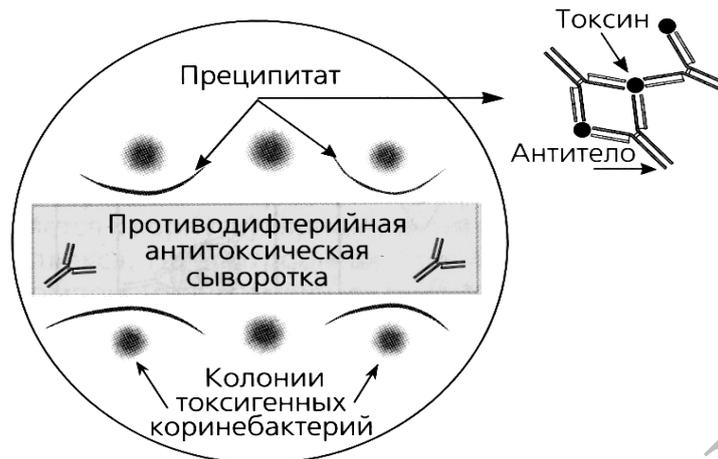


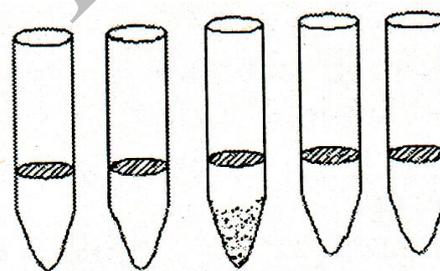
Рисунок 46 — Выявление токсигенности возбудителя дифтерии в реакции преципитации в геле по Оухтерлони

Реакция флоккуляции

Сила анатоксина, выражаемая в иммуногенных (антигенных) единицах, определяется реакцией флоккуляции с соответствующей антитоксической сывороткой.

Принцип метода

В пробирке, где количество антитоксических единиц (АЕ) сыворотки соответствуют количеству анатоксина и нейтрализует его раньше, чем в других, возникает помутнение (инициальная флоккуляция), рисунок 47. Количество анатоксина, дающее в смеси с 1 АЕ сыворотки инициальную флоккуляцию, называется 1 иммуногенной единицей анатоксина (ИЕ).



Флоккуляция

Рисунок 47 — Реакция флоккуляции

Постановка реакции. Антитоксическую сыворотку разливают в уменьшающихся количествах в ряд пробирок, в которые затем добавляют по 2 мл анатоксина и помещают на водяную баню при 45 °С. Время от времени пробирки просматривают и отмечают ту, в которой раньше всего произошла флоккуляция. Зная количество антитоксических единиц сыворотки в данной пробирке, можно легко вычислить и количество иммуногенных единиц анатоксина. Например, если инициальная флоккуляция появилась в пробирке, куда было внесено 0,2 мл антитоксической сыворотки силой 200 АЕ в 1 мл, то расчет производится следующим образом: в 0,2 мл сыворотки содержится 40 АЕ, а так как в пробирке находится смесь (произошла флоккуляция), то 2 мл анатоксина содержат 40 ИЕ, а 1 мл — 20 ИЕ.

Реакция нейтрализации на животных

РН на животных применяются для идентификации бактериального экзотоксина по его видовой и типовой принадлежности.

Принцип метода. Для постановки реакции нейтрализации *in vivo* исследуемый материал, в котором предполагается наличие экзотоксина, смешивают с антитоксической сывороткой (применяют стандартные виды- и типоспецифические сыворотки), инкубируют в термостате и вводят лабораторным животным (белым мышам, морским свинкам).

При нейтрализации токсина антитоксинами, содержащимися в антитоксической сыворотке, подопытные животные выживают, а контрольные, которым вводится фильтрат исследуемого материала с экзотоксином, не обработанный сывороткой, погибают (рисунок 48).

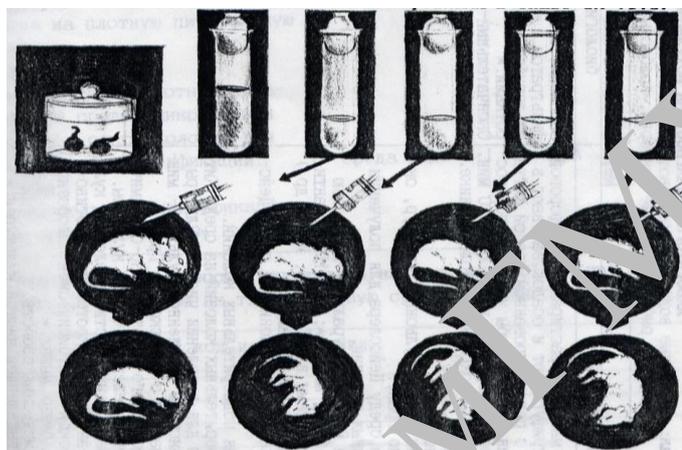


Рисунок 48 — Реакция нейтрализации на животных

Кожные иммунологические пробы

Кожные иммунологические пробы основаны на внутрикожном введении малых доз токсина в ладонную поверхность левого предплечья пациента. При отсутствии антитоксического иммунитета на месте введения токсина наблюдается покраснение, а при наличии антитоксического иммунитета введенный токсин нейтрализуется антитоксинами сыворотки и на месте введения остается лишь след от укола.

РЕАКЦИИ ЛИЗИСА (РЕАКЦИИ С УЧАСТИЕМ КОМПЛЕМЕНТА)

В реакциях лизиса принимают участие **3 компонента: АГ, АТ и комплемент**. Сущность этих реакций состоит в том, что при взаимодействии специфических АТ с АГ клеток (эритроцитов, бактерий), на их поверхности образуется комплекс, который активизирует комплемент по классическому пути, и на мембране клеток образуется мембранатакаяющий комплекс, вследствие чего наступает лизис этих клеток. **Комплемент** является составной частью любой сыворотки теплокровных. Он термолабилен, полностью инактивируется при температуре 56 °С в течение 30 мин. В лабораториях в качестве комплемента используют сыворотку морской свинки, взятую непосредственно перед опытом; можно также применять сухой комплемент.

Классификация реакций лизиса представлена на рисунке 49.

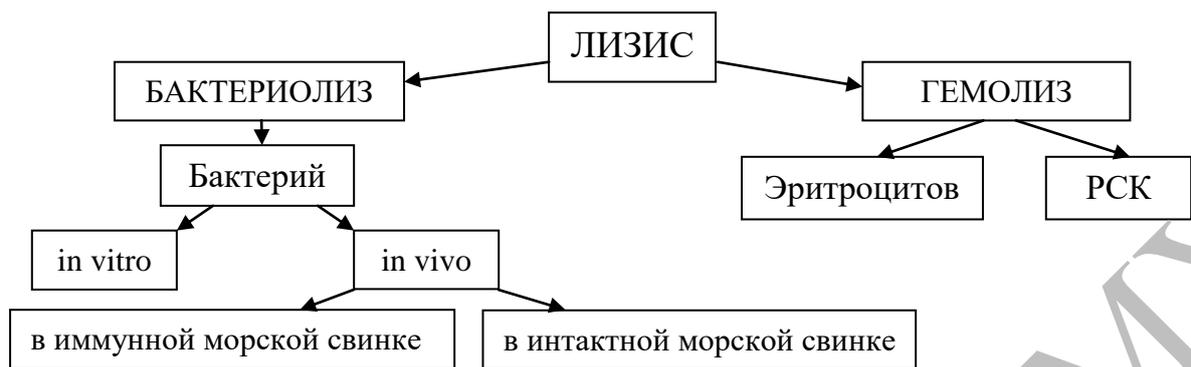


Рисунок 49 — Классификация реакций лизиса

Реакция бактериолиза

Реакция иммунного бактериолиза — реакция, в которой происходит лизис бактерий под действием иммунной сыворотки (содержит специфические антитела-бактериолизины) в присутствии комплемента.

В практике реакцией бактериолиза пользуются для: 1) определения вида неизвестного микроба при помощи специфической сыворотки; 2) определения в исследуемой сыворотке наличия бактериолизинов к заранее известному микробу.

Постановка реакции (in vitro). В стерильной пробирке делают смесь из взвеси культуры вибриона, инактивированной иммунной сыворотки и комплемента. В контрольную пробирку вместо иммунной сыворотки добавляют такой же объем нормальной сыворотки. Пробирки помещают на 2 ч в термостат при температуре 37 °С, после чего делают посев 0,1 мл на чашки с агаром и ставят посеvy на сутки в термостат. На следующий день в посеve из контрольной пробирки обнаруживается обильный рост культуры. В посеve же из пробирки, содержащей иммунную сыворотку, количество выросших колоний значительно меньше; возможно и полное отсутствие роста.

Реакция гемолиза

Реакция иммунного гемолиза является разновидностью реакции лизиса. В качестве АТ в этой реакции применяют эритроциты, которые лизируются АТ-гемолизинами в присутствии комплемента.

Компоненты реакции гемолиза:

- 1) эритроциты барана;
- 2) гемолитическая сыворотка кролика, полученная путем гипериммунизации кролика эритроцитами барана; содержит АТ – гемолизины;
- 3) комплемент (сыворотка морской свинки).

Реакцию гемолиза используют для определения титра комплемента и титра гемолитической сыворотки.

Реакция связывания комплемента

Реакция связывания комплемента (РСК) представляет собой реакцию, в которой участвует комплемент и две системы «антиген – антитело»:

- первая — специфическая;
- вторая — индикаторная (гемолитическая) система.

Таким образом, для проведения РСК необходимы 5 компонентов (таблица 21).

Таблица 21 — Компоненты РСК

| Компоненты РСК | Системы «антиген – антитело» |
|---|---------------------------------------|
| 1. Антиген | Специфическая система |
| 2. Антитела | |
| 3. Комплемент (используют сыворотку морской свинки) | Индикаторная (гемолитическая) система |
| 4. 3 % взвесь эритроцитов барана | |
| 5. Гемолитическая сыворотка кролика (получают путем гипериммунизации кролика эритроцитами барана; содержит антитела — гемолизины) | |

Принцип метода. Образование комплекса «антиген – антитело» (специфическая система) и фиксация комплемента не сопровождается видимыми изменениями. Для обнаружения связывания комплемента используют дополнительную индикаторную гемолитическую систему. Эта система состоит из эритроцитов барана и гемолитической сыворотки кролика. В присутствии комплемента происходит лизис эритроцитов (гемолиз) в гемолитической системе.

Если в специфической системе образовался комплекс «антиген – антитело», который связал комплемент, то не будет лизиса эритроцитов в индикаторной гемолитической системе (РСК положительна, гемолиза нет, выявлен АГ или АТ).

Если в специфической системе комплекс «антиген – антитело» не формируется (АГ и АТ не соответствуют друг другу, или в исследуемом образце нет искомого АГ или АТ), то комплемент остается свободным, взаимодействует с гемолитической системой и вызывает гемолиз эритроцитов барана (РСК отрицательна, есть гемолиз, не выявлен АГ или АТ).

РСК используется как для серологической идентификации неизвестного АГ, так и для серодиагностики инфекционных заболеваний (определение неизвестного АТ в сыворотке больного).

Основной опыт РСК представлен в таблице 22.

Таблица 22 — Основной опыт реакции связывания комплемента

| Ингредиенты, мл | Пробирки | | |
|-----------------------------|---------------------------|---|---|
| | 1 (сыворотка пациента) | 2 (контроль положительной сыворотки) | 3 (контроль отрицательной сыворотки) |
| Испытуемая сыворотка | 0,2 | — | — |
| Положительная сыворотка | — | 0,2 | — |
| Отрицательная сыворотка | — | — | 0,2 |
| Антиген | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| Изотонический раствор | — | — | — |
| Комплемент (в рабочей дозе) | 0,2 | 0,2 | 0,2 |

Окончание таблицы 22

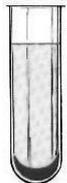
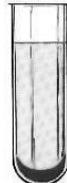
| Ингредиенты, мл | Пробирки | | |
|---|--|--|--|
| | 1 (сыворотка пациента) | 2 (контроль положительной сыворотки) | 3 (контроль отрицательной сыворотки) |
| Инкубация в термостате 20–30 мин | | | |
| Гемолитическая система | 0,4 | 0,4 | 0,4 |
| Инкубация в термостате 20–30 мин (до гемолиза в контроле) | | | |
| Результат |  Гемолиз «←» |  Гемолиз «←» |  Гемолиз «+» |
| Вывод | РСК положительна, так как исследуемая сыворотка пациента содержит АТ против возбудителя заболевания; следовательно, обследуемый пациент болен соответствующим заболеванием | | |

Схема РСК для серодиагностики с сывороткой больного представлена на рисунке 50.

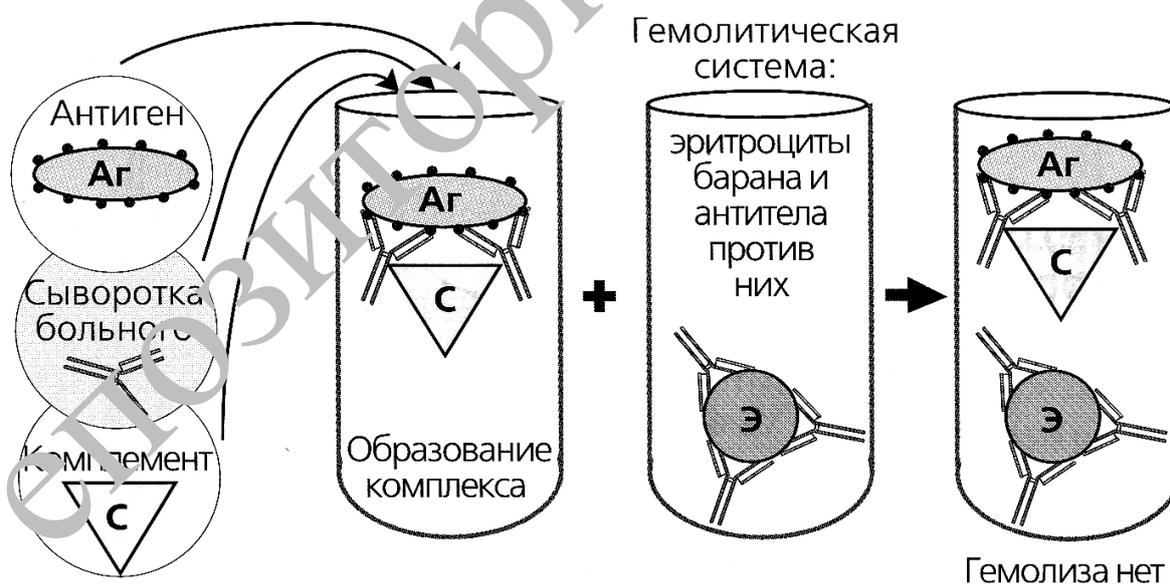


Рисунок 50 — Схема реакции связывания комплемента для серодиагностики с сывороткой больного: гемолиза нет, РСК положительна, выявлены антитела, пациент болен соответствующим инфекционным заболеванием

Схема РСК для серодиагностики с сывороткой здорового представлена на рисунке 51.

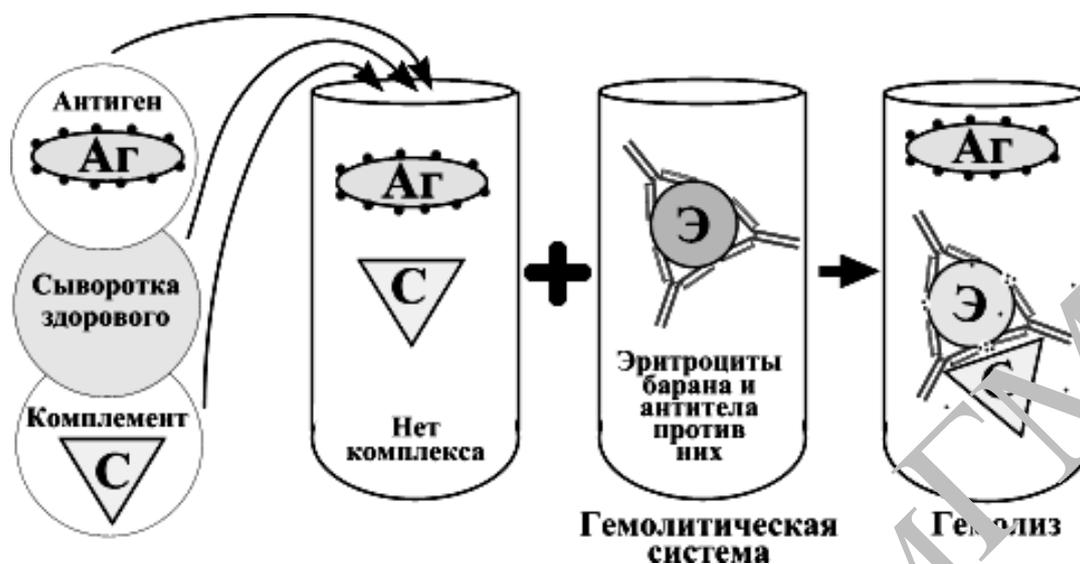


Рисунок 51 — Схема реакции связывания комплемента для серодиагностики с сывороткой здорового:

гемолиз есть, РСК отрицательна, антитела не выявлены, пациент не болен соответствующим инфекционным заболеванием (т. е. здоров)

Для получения достоверного результата необходимо, чтобы все компоненты были взяты в оптимальных количествах (*рабочих дозах*). С этой целью как комплемент, так и гемолитическую сыворотку предварительно (перед постановкой РСК) титруют для последующего расчета их рабочих доз.

Для титрования комплемента и гемолитической сыворотки применяют реакцию иммунного гемолиза.

Титрование комплемента. Перед проведением опыта раствор комплемента (1:10) разливают в ряд пробирок от 0,05 до 0,5 мл и добавляют в каждую физиологический раствор, доводя объем жидкости до 1,5 мл. Пробирки помещают в термостат при температуре 37 °С на 45 мин, затем добавляя в них гемолитическую систему и выдерживают в термостате в течение 30 мин, после чего определяют титр комплемента.

Титр комплемента — наибольшее разведение комплемента, который вызывает полный гемолиз эритроцитов в присутствии гемолитической сыворотки. Для постановки основного опыта РСК используют рабочую дозу комплемента, которая на 20–25 % выше титра.

Титрование гемолитической сыворотки. Сыворотку титруют путем соединения 0,5 мл этой сыворотки (в разведениях 1:400, 1:800, 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 учитывают через 1 час инкубации при температуре 37 °С.

Титром гемолитической сыворотки считают максимальное ее разведение, вызывающее полный гемолиз эритроцитов в присутствии комплемента. Рабочая доза гемолитической сыворотки в 3–4 раза выше титра.

Разновидности других реакций с участием комплемента

Реакция Вассермана. Является модифицированной реакцией РСК. Данная реакция ранее широко применялась в серодиагностике сифилиса. По технике постановки она идентична обычной РСК. Особенности: реакцию ставят со специфическим и неспецифическим антигенами. В качестве специфического АГ используют тканевые трепонемы (например, из яйца зараженного кролика), в качестве неспецифического АГ — кардиолипино-вый АГ (экстракт сердца быка).

Реакция иммобилизации. Принцип реакции заключается в том, что при взаимодействии сыворотки пациента (содержит специфические АТ против возбудителя) с подвижными микроорганизмами (например, трепонемы) в присутствии комплемента происходит иммобилизация (обездвиживание) данных микробов. Иммобилизующие АТ выявляют, например, при сифилисе.

Реакция иммунного прилипания (РИП). Принцип реакции заключается в том, что при взаимодействии сыворотки пациента (содержит специфические АТ против возбудителя) с микроорганизмами (например, трепонемы) в присутствии эритроцитов человека и комплемента происходит прилипание данных микробов к поверхности эритроцитов. Данную реакцию также можно применить для определения АТ в сыворотке больного сифилисом.

ИММУННЫЕ РЕАКЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕЧЕННЫХ АНТИТЕЛ И АНТИГЕНОВ

К иммунным реакциям с использованием меченых АТ и АГ относят (таблица 23):

- 1) реакцию иммунофлюоресценции (РИФ);
- 2) иммуноферментный анализ (ИФА);
- 3) радиоиммунный метод (РИА).

Таблица 23 – Общая характеристика реакций с использованием меченых антигенов или антител

| Наименование метода | Метка | Выявление меток |
|-----------------------------|--------------|---|
| Реакция иммунофлюоресценции | Флюорохромы | Наблюдают свечение в люминесцентном микроскопе |
| Иммуноферментный анализ | Ферменты | Изменение окраски определяют спектрофотометрически (с помощью иммуноферментного анализатора) – по оптической плотности окрашенного раствора |
| Радиоиммунный метод | Радиоизотопы | Определяют радиоактивность образовавшегося иммунного комплекса в соответствующем счетчике радиации |

Реакция иммунофлюоресценции

Прямой метод иммунофлюоресценции (метод Кунса) основан на взаимодействии АТ, меченых флюорохромом, с АГ. В качестве флюорохрома используют флюоресцеинизотиоционат (ФИТЦ). Он дает зеленое свечение в ультрафиолетовых лучах.

Достоинства РИФ: простота, достаточная чувствительность и специфичность, часто используется как метод экспресс-диагностики инфекционных заболеваний. *Недостатки РИФ:* метод не является количественным.

Предложено два метода РИФ: прямой и непрямой.

Применение РИФ для определения неизвестного микробного АГ в исследуемом материале (экспресс-диагностика), рисунок 52.

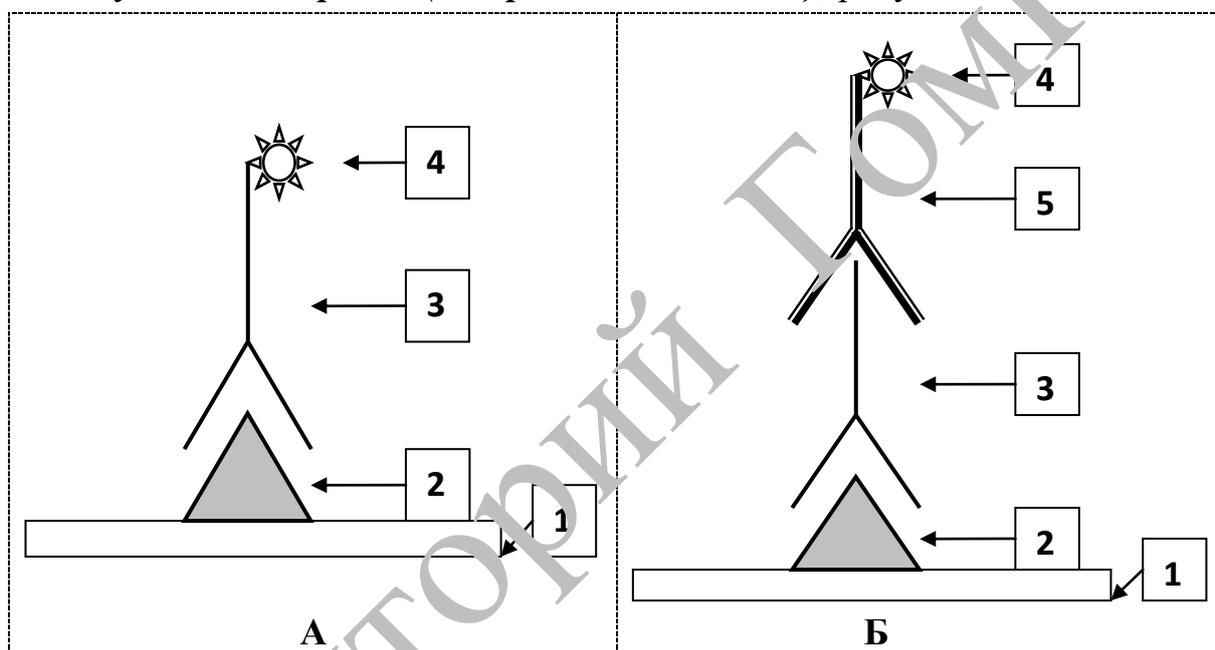


Рисунок 52 — Схемы постановки реакции иммунофлюоресценции для определения неизвестного микробного антигена:

А — прямой метод, Б — непрямой метод;

Примечание. Компоненты РИФ: 1 — стекло, 2 — искомый АГ (исследуемый материал от пациента), 3 — диагностическая антимикробная кроличья сыворотка, 4 — метка — флюорохром (напр., ФИТЦ), 5 — АГС — антиглобулиновая (антикроличья) сыворотка

Прямой метод одноэтапный: на фиксированный мазок клеток с неизвестным АГ наносят диагностическую сыворотку (получена путем гипериммунизации кролика соответствующим АГ — антимикробная кроличья сыворотка), с АТ, мечеными флюорохромом (например, ФИТЦ), инкубируют, отмывают. При положительном результате (наличии АГ), наблюдают свечение в люминесцентном микроскопе. *Недостатком прямого метода является то, что для выявления разных видов АГ микро-*

организмов необходимо окрашивать флюорохромом иммунную сыворотку против каждого вида микроба, т. е. против каждого изучаемого АГ.

Непрямой метод заключается в том, что вначале неизвестный АГ обрабатывают обычной диагностической сывороткой (антимикробной кроличьей сывороткой), которую получают путем гипериммунизации кролика соответствующими АГ. Затем АТ, не связавшиеся АГ микробов, отмывают. Для обнаружения образовавшегося комплекса «антиген – антитело» используют АГС против иммуноглобулинов кролика (антикроличью сыворотку), меченую флюорохромом. Такую сыворотку получают путем иммунизации барана (или другого животного) иммуноглобулинами кролика. В результате образуется комплекс: микроб (АГ) + антимикробные кроличьи антитела (АТ) + антикроличьи антитела (АГС), меченые флюорохромом. Этот комплекс наблюдают в люминесцентном микроскопе, как и при прямом методе. Одним из достоинств непрямого метода по сравнению с прямым является то, что непрямой метод дает возможность обнаруживать различные комплексы «антиген – антитело» с помощью одной меченой антиглобулиновой сыворотки; специфичные сыворотки (содержат АТ против АГ) не будут мечеными.

Применение РИФ для выявления неизвестных АТ в сыворотке крови пациента (серодиагностика)

Для выявления АТ в сыворотке крови пациента используют **непрямой метод РИФ**. Для этого на стекло наносят взвесь эталонного микроорганизма, после фиксации его на стекле и промывания наносят капли сыворотки крови пациента в определенных разведениях. После промывки наслаивают люминесцирующую сыворотку (сыворотку, меченую флюорохромом, например, ФИТЦ) против глобулиновой фракции сывороточных белков крови человека, т. е. антиглобулиновую сыворотку. Образующийся комплекс «антиген – антитело» выявляют при люминесцентной микроскопии: при освещении ультрафиолетовыми (сине-фиолетовыми) лучами он дает яркое зеленое свечение, что свидетельствует о наличии АТ в сыворотке крови пациента.

Иммуноферментный анализ

ИФА применяют для диагностики вирусных, бактериальных и паразитарных заболеваний, в частности для диагностики ВИЧ-инфекции, вирусных гепатитов и других инфекций, а также для определения гормонов, ферментов, лекарственных препаратов и других биологически активных веществ. В настоящее время ИФА-диагностика является наиболее часто используемым иммунологическим методом в городских и районных больницах, поликлиниках, роддомах, учреждениях санэпиднадзора и других медицинских учреждениях.

ИФА — метод количественного определения АГ или АГ, в котором используются *АГ, меченые ферментом*. В качестве фермента часто используются пероксидаза хрена, β -галактозидаза или щелочная фосфатаза. При добавлении к ферменту раствора его субстрата например, перекиси водорода) и хромогена, последний изменяет окраску. *Хромогены* — вещества, содержащие (согласно теории цветности О. Витта) хромофоры, т.е. группы атомов, ответственных за окраску соединений. В зависимости от формы (окисленная/восстановленная) хромоген может быть бесцветным или окрашенным. В ИФА в качестве хромогена применяются в основном ортофенилендиамин, тетраметилбензидин. Интенсивность окраски прямо пропорциональна количеству связавшихся молекул антигена и антител. *Изменение окраски определяют спектрофотометрически* — по оптической плотности окрашенного раствора.

Существует множество вариантов постановки ИФА, из которых наиболее широко применяется *твердофазный иммуноферментный анализ* (т-ИФА, или ELISA, enzyme linked immunoadsorbent assay, метод определения с помощью иммуносорбентов, связанных с ферментами). В качестве твердой фазы чаще всего используют полистироловые или поливиниловые планшеты, на которых адсорбированы АГ или АГ.

В зависимости от методики выделяют разновидности ИФА: метод двойного связывания, неконкурентный и конкурентный ИФА. Если на первой стадии в системе присутствует только определяемый реагент — АГ или АГ, то метод является *неконкурентным*. Если на первой стадии анализа в системе одновременно присутствуют анализируемое соединение и его аналог (меченое ферментом анализируемое соединение или анализируемое соединение, иммобилизованное на твердой фазе), конкурирующие за имеющиеся центры специфического связывания, то метод является *конкурентным*.

Конкурентный ИФА

Конкурентный ИФА для определения АГ: искомый АГ и меченый ферментом АГ конкурируют друг с другом за АГ, сорбированные на твердой фазе (рисунок 53).

Конкурентный ИФА для определения АГ: искомые АГ и меченые ферментом АГ конкурируют друг с другом за АГ, сорбированные на твердой фазе.

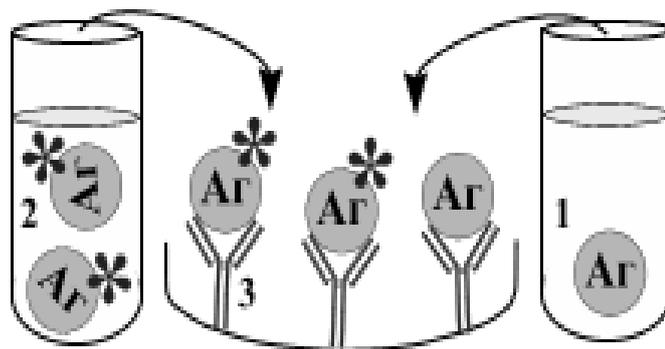
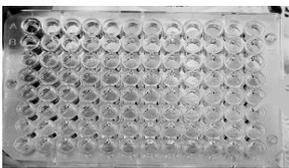


Рисунок 53 — Схема конкурентного ИФА для определения антигенов: 1 — искомый АГ; 2 — меченый ферментом АГ; 3 — АГ

Твердофазный ИФА, метод двойного связывания

Определение антигенов (экспресс-диагностика)

Для обнаружения АГ применяется модификация метода ИФА, представленная на рисунке 54. На поверхности планшета (твердой фазе) сорбируются АТ к искомому АГ. Образующаяся в ходе анализа цепочка выглядит так: сорбированные АТ – АГ – известные АТ к искомому АГ, меченые ферментом (*конъюгат*). То есть, если в исследуемом образце присутствует искомый АГ, то образуется иммунный комплекс. Фермент способен расщеплять вносимый туда субстрат, выделяется атомарный кислород, который окисляет хромоген с образованием окрашенного продукта. Это возможно только при наличии полной цепочки. Если в исследуемом образце искомый АГ отсутствует, то цепочка не образуется, и окрашивания не происходит.

| | |
|--|---|
| | <p>Специфические антитела (2) сорбированы на поверхности лунок (1) планшета</p>  <p>Планшет</p> |
| | <p>В лунку добавляется исследуемый материал, и, если в нем есть антигены (3), соответствующие данным антителам (2), то во время инкубации происходит взаимоузнавание, в результате которого образуется комплекс антиген/антитело (2/3)</p> |
| | <p>После отмытки лунок в них добавляют специфические для искомого антигена антитела (4), меченые ферментом (напр., пероксидазой), т.е. конъюгат. Во время инкубации конъюгат фиксируется на связавшихся с фиксированными антителами антигенах</p> |
| | <p>После отмытки не связавшегося конъюгата в лунку добавляется субстрат — перекись водорода (H₂O₂) с бесцветным хромогеном (5), при ферментативном разложении субстрата выделяется атомарный кислород, который окисляет хромоген и превращает его в окрашенный продукт (6)</p> |



Количество окрашенного продукта измеряется на фотометре при определенной длине волны

Рисунок 54 — Схема ИФА для определения антигенов с поэтапным пояснением **Определение антител (серодиагностика)**

Реакция ИФА для определения антител представлена на рисунке 54.





Количество окрашенного продукта измеряется на фотометре при определенной длине волны. Таким образом, количество цветного продукта прямо пропорционально количеству фермента в лунке, а значит и количеству конъюгата в «сэндвиче». Количество конъюгата прямо пропорционально тому количеству комплекса антиген/антитело, которое получается на первой стадии ИФА. Следовательно, интенсивность цветной реакции точно коррелирует с наличием специфического АТ в анализируемой сыворотке

Рисунок 55 — Схема ИФА для определения антител с поэтапным пояснением
Иммуноблотинг

Иммуноблотинг *позволяет выявлять отдельные АТ к различным белкам микроорганизмов.*

Принцип метода. АГ возбудителя разделяют с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, затем переносят их на полоску из нитроцеллюлозы. При этом различные АГ фиксируются отдельно в различных участках полоски. Затем на эту полоску наносят сыворотку больного и дальнейшие исследования проводят по схеме обычного ИФА. *Положительные реакции выглядят в виде ИФА-пятен (англ. blot — пятно), каждое из которых соответствует дискретной паре «антиген – антитело», рисунок 56.*

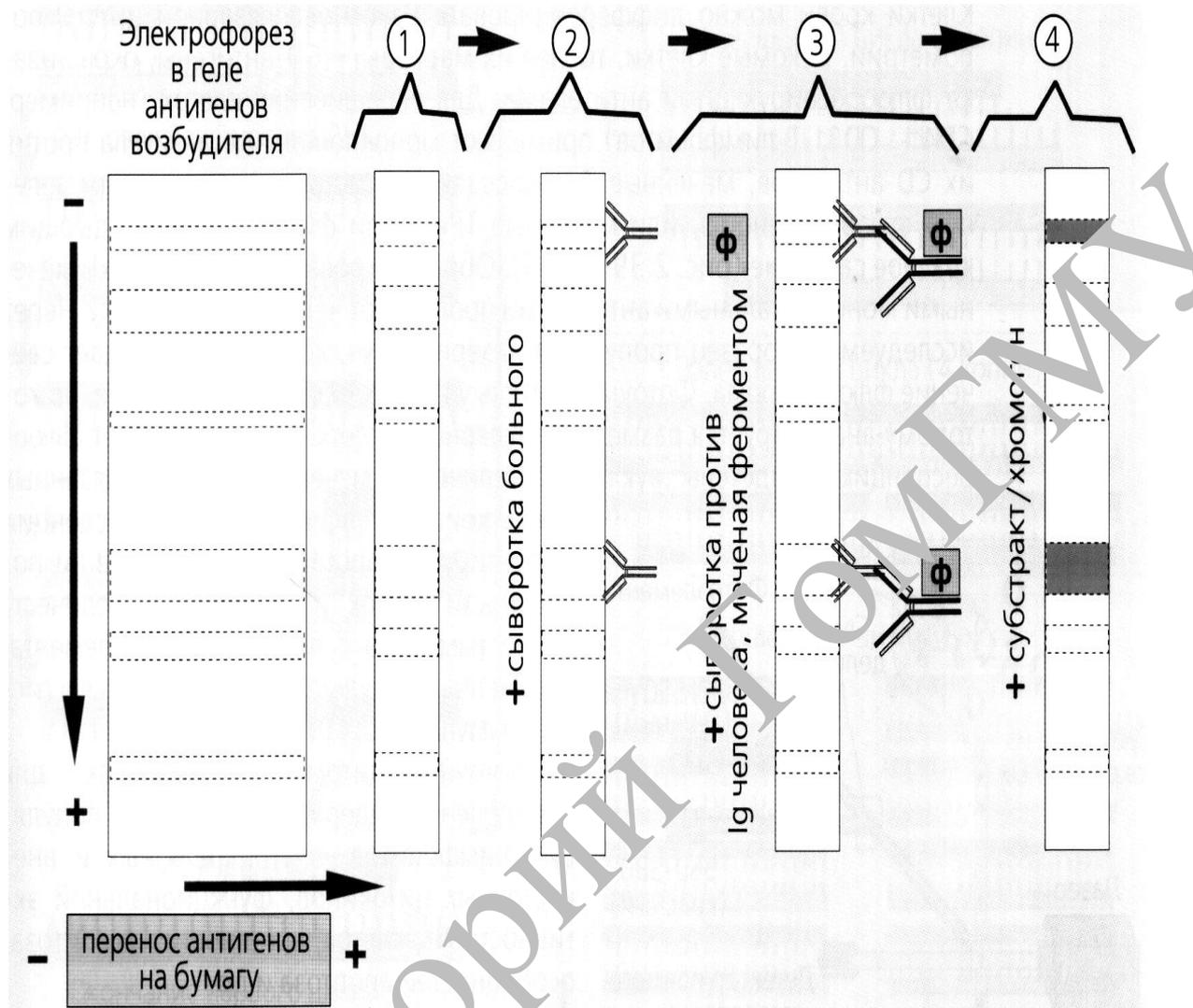


Рисунок 56 — Схема иммуноблотинга

Радиоиммунный анализ

Радиоиммунный анализ — метод определения АТ или АГ с применением АГ или АТ, меченых радиоактивным изотопом (^{125}J , ^{14}C , ^3H , ^{51}Cr и др.). После связывания АТ и АГ отделяют образовавшийся радиоактивный иммунный комплекс и определяют его радиоактивность в соответствующем счетчике (бета- или гамма-излучение): интенсивность излучения прямо пропорциональна количеству связавшихся молекул АГ и АТ.

Твердофазный РИА

Твердофазный РИА аналогичен твердофазному иммуноферментному анализу, только вместо метки ферментом используется метка радиоактивным изотопом (рисунок 57).

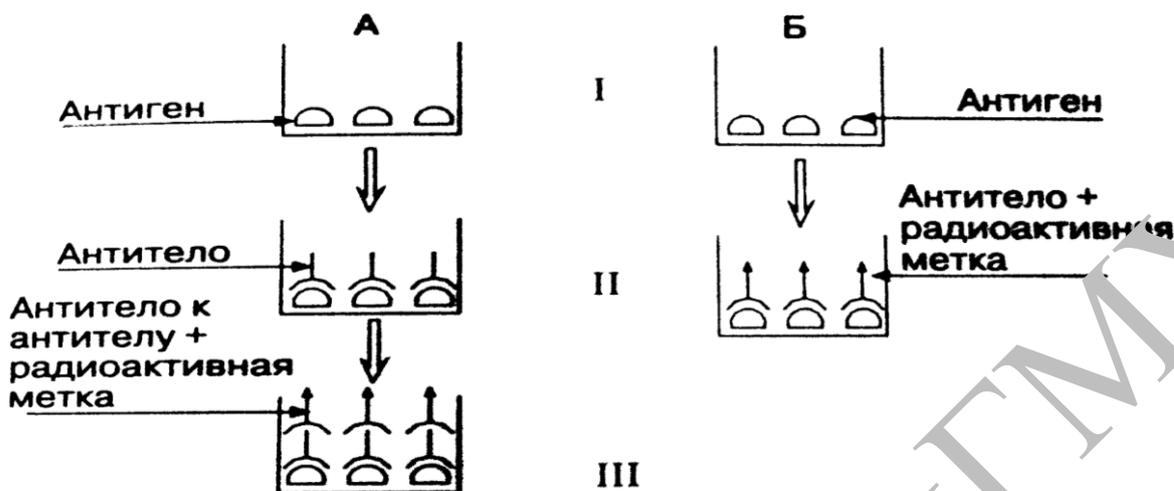


Рисунок 57 — Схема твердофазного радиоиммунного анализа:
 А — выявление антител; Б — выявление антигенов; I–III этапы

Конкурентный РИА

При конкурентном методе РИА на поверхности полистироловых лунок сорбируются АТ. Затем к этим иммобилизованным АТ добавляется исследуемый материал, содержащий специфический к ним АГ. После образования иммунного комплекса добавляется АГ, меченый ^{125}J , обладающий идентичной специфичностью к иммобилизованным в лунках АТ. Внесенный меченый АГ будет реагировать лишь с той частью активных центров АТ, которые остались незаблокированными АГ микроорганизма из исследуемого материала. По сравнению с контролем расход меченого АГ будет тем меньше, чем больше заблокировано АТ. Его количество определяют радиометрией жидкой (отмытой) части радиоактивного АГ.

ИММУНОГИСТОХИМИЯ, ИММУНОЦИТОХИМИЯ

Иммуногистохимия (ИГХ) — комплекс методов, позволяющих выявлять (визуализировать) определенные АГ в составе естественного клеточного или тканевого микроокружения в норме и при патологии. ИГХ основана на твердофазном ИФА, который проводится *in situ*, т. е. на гистологических срезах (**иммуногистохимия**) или мазках, цитопрепаратах (**иммуноцитохимия**). Образующийся нерастворимый окрашенный продукт локализуется в месте экспрессии АГ и учитывается с помощью световой микроскопии.

Постановка ИГХ предусматривает следующие этапы:

- 1) забор материала;
- 2) приготовление гистологических (цитологических) препаратов;
- 3) фиксация, подготовка АГ (зависит от природы антигена и антител);

4) собственно окрашивание (твердофазный ИФА: прямой, непрямой, непрямой с усилением сигнала);

5) учет: микроскопия, фотографирование, выдача заключения.

Иммуногистохимия позволяет существенно улучшить специфичность и чувствительность патоморфологического метода исследования, что весьма актуально для диагностики опухолей (метастазов), их тканевого происхождения, степени дифференцировки и т. д. Помимо онкологии ИГХ находит применение для диагностики аутоиммунной патологии, некоторых инфекционных заболеваний, фенотипирования клеток крови и костного мозга, для научных целей.

ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Иммунохроматографический анализ является одним из современных и востребованных методов лабораторной диагностики, с помощью которого определяют наличие определенных концентраций веществ в биологических материалах (моча, цельная кровь, сыворотка или плазма крови, слюна, фекалии и др.).

Это метод анализа *основан на принципе тонкослойной хроматографии и включающий реакцию между АГ и соответствующим ему АТ.*

ИХА можно отнести к группе реакций с мечеными АТ. В качестве метки используют красящие вещества (частицы окрашенного латекса или наночастицы коллоидного золота) или ферментные метки. Иммунохроматографический анализ *проводится с помощью специальных индикаторных полосок, панелей, пластинок или тест-кассет.*

Принцип действия иммунохроматографического теста (например, с **применением полосок**) состоит в том, что при погружении теста в физиологическую жидкость она начинает мигрировать вдоль полоски по принципу тонкослойной хроматографии (рисунок 58). Вместе с жидкостью движутся и нанесенные на нижнюю часть тест-полоски специфические АТ, меченые красителем. Если в этой жидкости присутствует исследуемый АГ (инфекционный или онкологический маркер, гормон), то происходит его связывание с АТ. При этом происходит накопление АТ с красителем вокруг АТ, жестко иммобилизованных в тест-зоне ИХА-полоски, что проявляется в виде яркой темной полосы. Несвязавшиеся АТ с красителем мигрируют далее вдоль полоски и неизбежно взаимодействуют с вторичными АТ в контрольной зоне, где и наблюдается вторая темная полоса. Взаимодействие (и темная полоса) в контрольной зоне должны проявляться всегда (если анализ проведен правильно), независимо от присутствия АГ в физиологической жидкости.

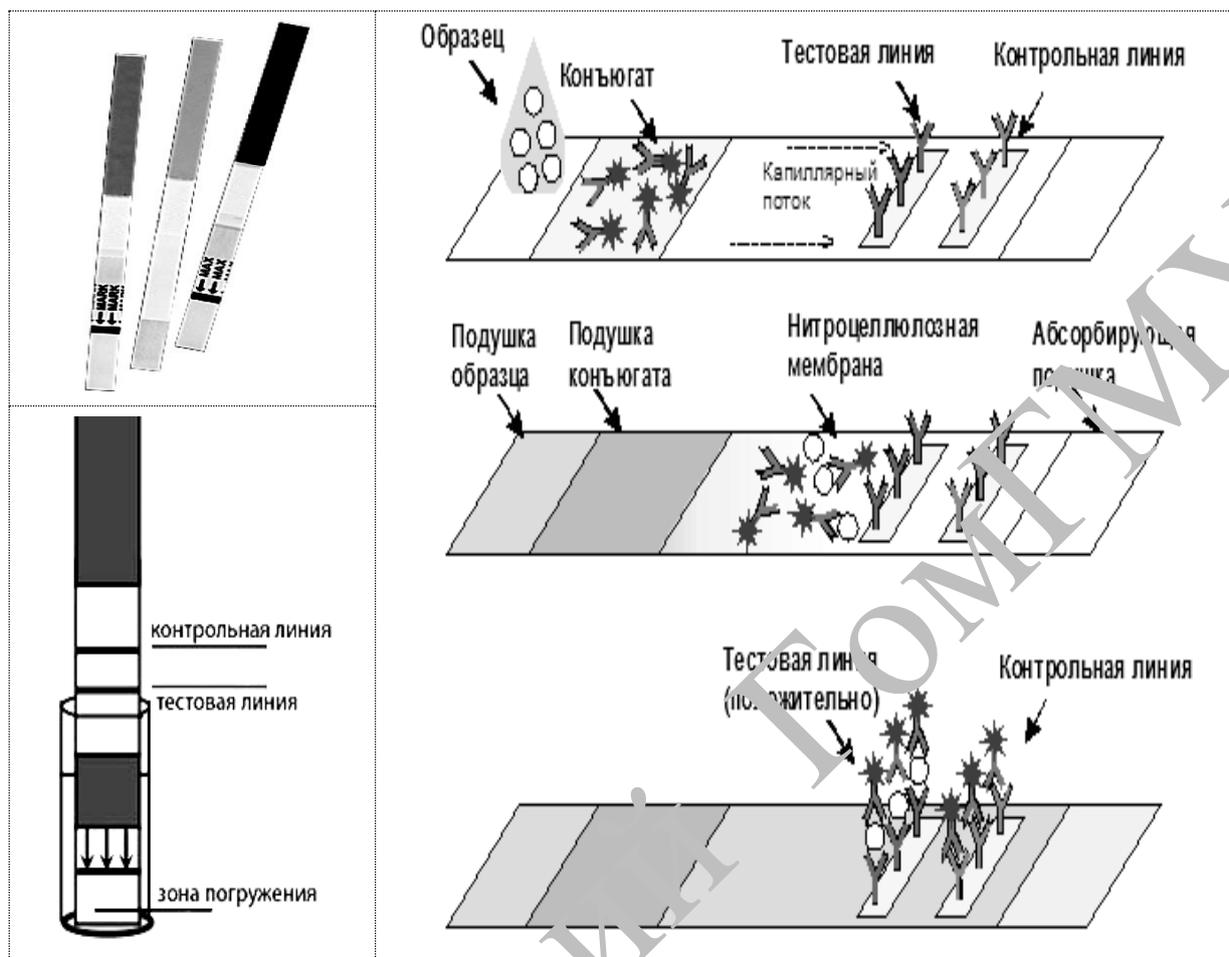


Рисунок 58 — Принцип метода иммунохроматографического теста (на примере тест-полоски)

Результаты определяются визуально (рисунок 59) или компьютерной обработкой отсканированного изображения.



Рисунок 59 — Учет результатов ИХА-теста (на примере тест-полоски)

В экспресс-тестах используются следующие АТ:

1. Подвижные моноклональные АТ к исследуемому АГ или АТ, конъюгированные («сшитые») с коллоидным золотом — красителем, который можно легко идентифицировать даже в самых малых концентрациях.

Эти АТ нанесены вблизи участка погружения тест-полоски в физиологическую жидкость.

2. Поликлональные АТ к исследуемому АГ или АТ, жестко иммобилизованные в тест-зоне полоски.

3. Вторичные антитела к моноклональным АТ, жестко иммобилизованные в контрольной зоне тест-полоски.

Иммунохроматографический тест может представлять собой пластиковую пластинку, примеры которых представлены на рисунке 60.



Рисунок 60 — Примеры пластиковых пластинок для ИХА

Пластиковая пластинка содержит окошко для внесения материала (зона внесения пробы), окошко для учета результата (тест-зона) и одно или несколько окон для внутреннего контроля/контролей.

Принцип метода. Подготовленный исследуемый материал в небольшом количестве (5–7 капель) вносится в стартовое окно тест-системы (зона внесения пробы). Здесь происходит взаимодействие АГ с АТ, адсорбированными на частицах, и начинается движение образовавшихся комплексов за счет капиллярности носителя. Дойдя до АТ, расположенных на носителе в окне учета результата, эти комплексы связываются, при этом частицы латекса или коллоидного золота проявляются в виде линии голубого (латекс) или коричневого цвета. Поскольку частицы, нагруженные, АТ берутся в избытке, часть их движется дальше и связывается в окне (окнах) внутреннего контроля реакции. Полоса в этом окне свидетельствует о правильной работе тест-системы. Таким образом, в случае *положительного результата* образуются *две полосы: в тестовой и контрольной зоне*. При *отрицательном результате* (отсутствие искомого АГ) меченые АТ, не задерживаясь в тестовой зоне, сразу мигрируют в контрольную зону, где связываются с иммобилизованными АТ образуя *только одну полосу в зоне С* (рисунок 61).

Внесение материала

Учет результата через несколько минут



Рисунок 61 — Схема выполнения ИХА-теста с применением пластиковой пластины и учет результатов

В реакции ИХА используют.

- первые АТ к искомому АГ, иммобилизованные в виде полосы на хроматографическом носителе в окне для учета результата (выше окна для внесения материала);
- вторые АТ к тому же АГ, адсорбированные на микрочастицах золота или латекса (размещаются в окне для внесения материала).

Внутренний контроль/контроли включают:

- выявляемый АГ, нанесенный после окна для учета результата (положительный контроль, контроль протекания всех этапов основной реакции);
- антивидовые АТ против вторых (меченых) АТ, закрепленные в виде полосы на носителе (отрицательный контроль, контроль переноса ингредиентов по носителю, адекватность внесения материала);
- неспецифические первые АТ того же происхождения (контроль специфичности связывания вторых АТ).

В настоящее время разработаны тест-системы ИХА для выявления стрептококков группы А в мазках из зева, возбудителей туберкулеза в мокроте, хламидий в соскобах из уретры и шейки матки, токсина *C. difficile* в испражнениях, вируса Эпштейн — Барр в крови, вирусов гриппа А и В и РС-вируса в соскобах и смывах из носоглотки, для диагностики инфекционного мононуклеоза, определения маркеров повреждения миокарда (инфаркт миокарда), нарушения обмена кальция (остеопороз), для уста-

новления овуляции и беременности и другие.

Иммунохроматографический анализ может использоваться как для экспресс-индикации АГ в пробе, так и для идентификации выделенных чистых культур микроорганизмов.

Таким образом, ***ИХА тест-системы обладают несомненными достоинствами:***

- высокой специфичностью;
- скоростью получения результата;
- доступны, легко интерпретируются;
- не требуют медицинской или лабораторной квалификации;
- могут применяться пациентами самостоятельно в любых условиях.

Однако по чувствительности ИХА тест-системы уступают другим методам иммуноанализа, что позволяет *применять их лишь в качестве ориентировочного теста.*

ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ АЛЛЕРГОЛОГИЧЕСКОГО МЕТОДА ИССЛЕДОВАНИЯ

Практически каждый врач сталкивается с аллергическими заболеваниями у пациентов, со случаями непереносимости лекарственных препаратов и пищевых продуктов, необычными реакциями на химические вещества бытового или профессионального окружения. В большинстве случаев не представляется возможным направить пациента на консультацию к аллергологу, и весь комплекс не только терапевтических, но и диагностических вопросов приходится решать лечащему врачу.

Аллергологический метод исследования используется для выявления в организме антител или сенсibilизированных Т-лимфоцитов к аллергену.

Задачи метода:

- 1) диагностика аллергических ГНТ;
- 2) диагностика хронических инфекционных заболеваний, в патогенезе которых имеет место сенсibilизация к микробным АГ (ГЗТ);
- 3) разработка специфической десенсibilизирующей терапии реакций ГТ, медиаторного типа.

Этапы аллергологического метода

I этап. Сбор аллергологического анамнеза с целью:

- 1) установления наследственной предрасположенности к возникновению аллергического заболевания;
- 2) выявления связи между факторами окружающей среды и развитием заболевания; установления связи с сезонностью проявления аллергического заболевания;

3) выявления факторов, отягощающих личный аллергологический анамнез (перенесенные острые инфекционные заболевания; наличие ряда хронических воспалительных заболеваний; выявление пищевой и ингаляционной аллергии, контактных дерматитов, инсектной аллергии);

4) получения сведений о реакциях на введение каких-либо антибактериальных препаратов, сведений о непереносимости других лекарственных препаратов;

5) получения сведений о профилактических прививках, введении гетерологичных сывороток, и реакциях на них; б) предположительного определения группы аллергенов или единичных аллергенов, которые могли бы обусловить возникновение данной болезни;

7) установления эффекта элиминации аллергена: связи между контактом с аллергеном и изменением состояния пациента.

II этап. В зависимости от типа аллергической реакции используются различные пробы, тесты и лабораторные методы (таблица 24).

Таблица 24 — Принципы диагностики аллергических заболеваний в зависимости от типа аллергической реакции

| Тип аллергической реакции | Основные методы |
|---|--|
| I тип <i>Анафилактический, реактивный, IgE-опосредованный, медиаторный, атопический (ГНТ)</i> | 1. Кожно-аллергические пробы с аллергенами: а) аппликационные (в кожные); б) скарификационные (проба уколом или прик-тест); в) внутрикожные. Оценка результатов проводится в течение первого часа (через 20 мин) после нанесения на кожу аллергена (ГНТ) 2. Провокационные тесты (конъюнктивальный, назальный, ингаляционный и другие). 3. Элиминационные тесты (например, диета). 4. Лабораторные методы: а) ИФА для определения количества общих IgE; б) ИФА, радиоаллергосорбентный тест (RAST) для определения аллерген-специфических IgE к различным видам аллергенов; в) реакция дегрануляции тучных клеток (тест Шелли) |
| II тип <i>Цитотоксический (ГНТ)</i> | Лабораторные методы: РИФ, РИА, проба Кумбса при аутоиммунной гемолитической анемии |
| III тип <i>Иммунокомплексный (ГНТ)</i> | Лабораторные методы: а) выявление циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови методом осаждения полиэтиленгликолем; б) определение фиксированных иммунных комплексов методом непрямой РИФ |
| IV тип <i>Аллергические реакции клеточного типа или аллергические реакции замедленного типа (ГЗТ)</i> | Кожно-аллергические пробы (отличаются временем и критериями оценки при учете реакции: максимум их развития наблюдается через 48–72 ч). Например, внутрикожная проба Манту (туберкулиновый тест). Лабораторные методы: а) реакция подавления миграции макрофагов; б) реакция бластной трансформации лимфоцитов и другие |

Кожно-аллергические пробы

Кожно-аллергические пробы — это метод выявления специфической сенсибилизации организма путем введения через кожу аллергена и оценка величины и характера развившегося при этом отека или воспалительной реакции.

Варианты кожных проб:

- а) аппликационные (накожные);
- б) скарификационные (проба уколом или прик-тест);
- в) внутрикожные.

Кожно-аллергические пробы для диагностики ГНТ (рисунок 62)

Для кожных тестов используют растворы аллергенов: трав, пыльцы, эпидермиса животных, яда насекомых, пищи, лекарств.

Аппликационные пробы — раствором аллергена смачивают марлевый тампон и накладывают его на неповрежденный участок кожи (внутренней поверхности предплечья или спины). Затем этот участок закрепляют лейкопластырем.

Скарификационные пробы — на кожу предплечья наносят капли аллергенов, через них одноразовым, отдельным для каждого аллергена скарификатором делают небольшие царапины (без повреждения кровеносных сосудов).

Прик-тесты (проба уколом) — вариант скарификационной пробы: на кожу предплечья наносят капли аллергенов, через них одноразовыми иглами делают легкие уколы только эпидермиса (на один миллиметр в глубину). Тест считается положительным, если в месте введения возникает гиперемия и образуется пузырек (волдырь). Тест считается отрицательным, если остается только точка от укола.

Внутрикожные пробы — разведенный аллерген вводят внутрикожно в кожу предплечья в объеме 0,1 мл. Эти пробы более чувствительны, однако возможны осложнения в виде органных и общих аллергических реакций.

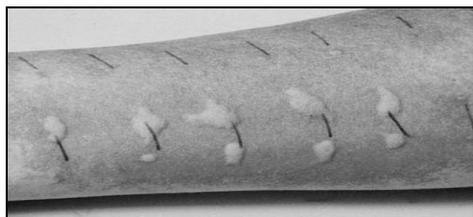


Рисунок 62 — Примеры постановки и визуализация результатов кожных проб для диагностики гиперчувствительности немедленного типа

Тест считается положительным, если через 20 минут после контакта с аллергеном в месте введения возникает гиперемия и образуется везикула (волдырь); могут появиться признаки общей реакции (головокружение, тошнота). Тест считается отрицательным, если остается только точка от укола.

Положительные результаты кожного тестирования свидетельствуют только о наличии сенсибилизации к аллергену и не являются доказательством его причинной значимости в возникновении заболевания. Аллерген, кожная проба на который положительна, можно считать причиной заболевания только в том случае, если это совпадает с клиническими проявлениями и данными анамнеза. В то же время своевременное выявление сенсибилизации к аллергенам играет решающую роль при назначении профилактических мероприятий.

Кожно-аллергические пробы для диагностики ГЗ предполагают внутрикожное введение аллергена. Предполагаемый аллерген вводят внутрикожно в объеме 0,1 мл. Результат учитывают через 24–72 ч после введения аллергена по диаметру папулы (инфильтрата). Кожные пробы нашли применение в диагностике таких заболеваний, как туберкулез (проба Манту с туберкулином), бруцеллез (проба Бюрне с бруцеллином) и других. Постановка и учет внутрикожной пробы Манту (туберкулиновый тест) представлены на рисунке 63.

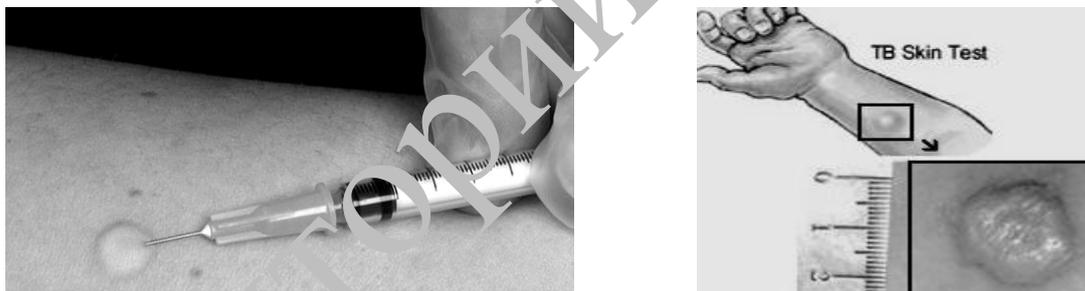


Рисунок 63 — Постановка и учет внутрикожной пробы Манту

Провокационные тесты

Провокационный тест — способ этиологической диагностики аллергических реакций, основанный на воспроизведении этой реакции введением аллергена в шоковый орган. По виду шокового органа (т. е. того органа, поражение которого является ведущим в картине заболевания) выделяют следующие *типы провокационных тестов*: конъюнктивальный (при аллергическом конъюнктивите или поллинозе), назальный (при аллергических ринитах), ингаляционный (при бронхиальной астме), холодовой (при холодовой крапивнице) и другие. Если в ответ на введение предполагаемого аллергена развивается аллергическая реакция, то аллерген может считаться причинно значимым.

Элиминационные тесты

Элиминационный тест — способ этиологической диагностики аллергической реакции, основанный на исчезновении или ослаблении этой

реакции после прекращения контакта пациента с аллергеном. Он обычно используется в диагностике пищевой и (реже) лекарственной аллергии и сочетается после наступления ремиссии с применением провокационного теста с данным аллергеном. Элиминационные тесты в диагностике причины пищевой аллергии весьма различны — от диет с исключением какого-то одного продукта до полного голодания.

Лабораторные методы

Лабораторные методы диагностики *in vitro* предпочтительны по безопасности и возможности использования в любой период заболевания. Они имеют основное значение в случаях, когда нельзя применять кожно-аллергические пробы и провокационные тесты.

При использовании лабораторных методов следует помнить о некоторых методологических положениях.

Во-первых, все иммунологические методы выявляют только состояние сенсibilизации. Они не могут служить доказательством того, что именно на данный аллерген разовьется аллергическая реакция, потому что для реализации аллергической реакции недостаточно лишь наличия сенсibilизации и аллергена, нужен еще ряд дополнительных условий.

Во-вторых, учитывая различия в иммунологических механизмах разных типов аллергических реакций и то, что многие методы дают информацию только о том или ином иммунном механизме, для диагностических целей необходимо применить несколько методов, позволяющих оценить возможное участие в них 4 типов сенсibilизации (см. таблицу 24).

При интерпретации результатов лабораторных методов следует помнить, что в случае отрицательных тестов возможность развития аллергической реакции не исключается.

Определение общего и специфического IgE (для диагностики ГНТ I типа)

Исследование общего IgE осуществляется с помощью ИФА и бумажного радиомунносorbентного теста (метод PRIST).

Определение аллерген-специфических IgE проводят с помощью ИФА и радиоаллергосorbентного теста (метод RAST). Для определения специфического IgE предлагаются коммерческие тест-системы для большого перечня пыльцевых, бытовых, пищевых, лекарственных и профессиональных аллергенов. Определить объем лабораторного обследования и составить перечень возможных причинно значимых аллергенов может врач-аллерголог (иммунолог), основываясь на данных тщательно собранного анамнеза.

Радиоаллергосorbентный тест (RAST)

Постановка теста. Аллерген сорбируют на пористом носителе (бумага, полимерные мембраны, гранулы, губки). Далее добавляют сыворотку пациента (с IgE), инкубируют 3 ч, отмывают и добавляют АГС (против IgE),

меченую радиоактивным изотопом. После отмывки несвязавшихся реагентов радиоактивность учитывают на счетчике. Схема радиоаллергосорбентного теста представлена на рисунке 64.

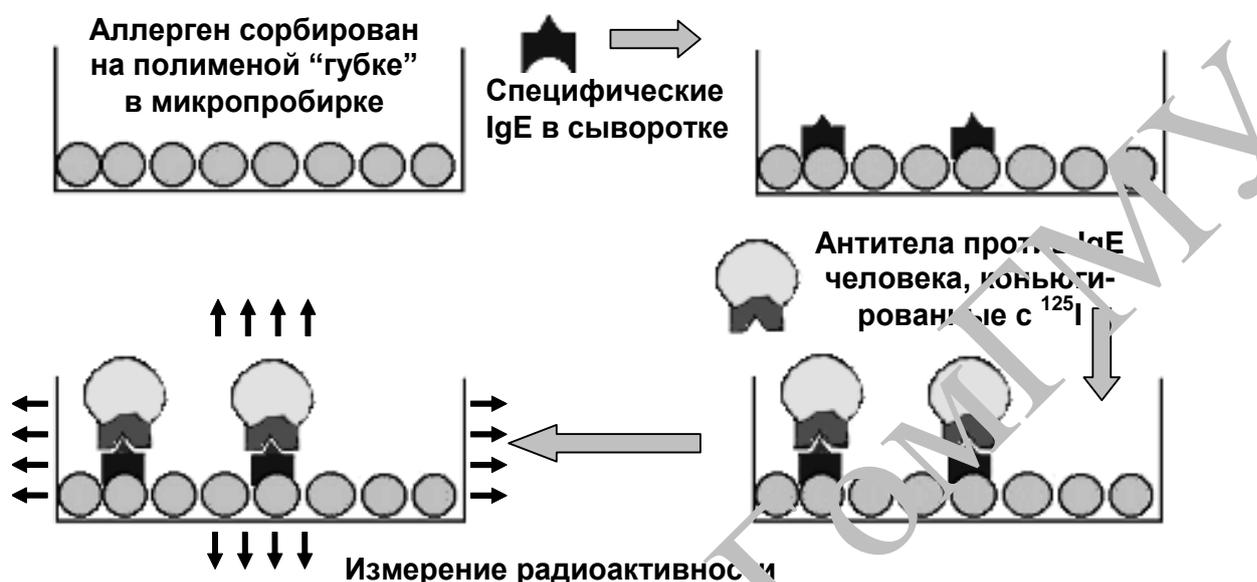


Рисунок 64 — Схема радиоаллергосорбентного теста

III этап аллергологического метода

Заключение. Заключение о типе процесса и его причине дается на основе обобщения результатов аллергологического анамнеза и указанных методов исследования.

МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ИММУННОГО СТАТУСА ЧЕЛОВЕКА. ИММУНОГРАММА

Разработкой и применением методов оценки иммунного статуса организма человека занимается *клиническая иммунология*.

Иммунный статус — структурное и функциональное состояние иммунной системы индивидуума, определяемое комплексом клинических и лабораторных иммунологических показателей. Иммунный статус характеризуется способностью организма данного индивидуума к иммунному ответу на определенный антиген в данный момент времени.

Исследование параметров иммунного статуса имеет важное значение для выявления нарушений иммунного ответа, разрешения вопросов патогенеза заболевания, постановки или уточнения иммунологического диагноза, а также проведения иммунотерапии, иммунопрофилактики и иммунореабилитации.

Оценка иммунного статуса включает:

1) *данные клинического обследования:*

- жалобы пациента;

- анамнез (частота инфекционных заболеваний, характер их течения, наличие очагов хронической инфекции, реакции на вакцинацию или введение лекарственных средств, наличие аллергических, аутоиммунных, опухолевых заболеваний и др.);

- клиническое состояние;

- общий анализ крови (общее число лимфоцитов и фагоцитов)

2) *состояние факторов неспецифической резистентности:*

- функциональная активность фагоцитов;

- оценка системы комплемента;

- содержание интерферона и лизоцима (при необходимости);

3) *показатели гуморального иммунитета:*

- содержание Ig различных классов в сыворотке крови (радиальная иммунодиффузия по Манчини);

- титр специфических антител (серологические реакции);

- катаболизм Ig (радионуклидный метод);

- количество В-лимфоцитов в периферической крови (кластерный анализ, т. е. выявление специфических CD-молекул с помощью моноклональных антител);

- бласттрансформация В-лимфоцитов (ответ на стимуляцию В-клеток митогенами);

4) *показатели клеточного иммунитета:*

- число Т-лимфоцитов; количество субпопуляций Т-лимфоцитов;

- бласттрансформация Т-лимфоцитов;

- уровень гормонов тимуса и цитокинов, секретируемых Т-лимфоцитами (ИФА с моноклональными антителами);

5) *результаты дополнительных тестов:*

- бактерицидность сыворотки крови;

- количество С₃ и С₄ компонентов комплемента;

- содержание С-реактивного белка в сыворотке крови;

- содержание в сыворотке крови ревматоидного фактора и других аутоантител;

- другие показатели.

Уровни оценки иммунного статуса

Оценка иммунного статуса предполагает двухэтапное (или двухуровневое) обследование.

Тесты первого уровня (ориентировочные) просты, экономичны, не требуют сложного лабораторного оборудования, отражают неспецифические закономерности реакций иммунной системы, *позволяют выявлять достаточно грубые дефекты иммунной системы* и судить о типичных иммунопатологических процессах.

Перечень тестов первого уровня с основными показателями представлен в таблице 25.

Таблица 25 — Тесты первого уровня

| Тест | Показатель | Содержание |
|--|------------------------|---|
| Число лейкоцитов; лейкоформула | Общее число лейкоцитов | 4,5–9,5 тыс/мкл |
| | Нейтрофилы | 50–77 % |
| | Лимфоциты | 18–38 % |
| | Моноциты | 2–10 % |
| | Базофилы | 0,5–1,0 % |
| | Эозинофилы | 1–5 % |
| Т- и В-лимфоциты | Т-лимфоциты | 55–75 % |
| | Т-лимфоциты абс. | 1000–2000 в 1 мкл |
| | В-лимфоциты | 10–15 % |
| | В-лимфоциты абс. | 100–300 в 1 мкл |
| Уровень Ig в сыворотке крови | Ig M | 0,5–2,0 г/л |
| | Ig G | 10,0–20,0 г/л |
| | Ig A | 1,25–5,0 г/л |
| Фагоцитарная активность лейкоцитов крови (показатели фагоцитоза) | Фагоцитарный индекс | Для кандиды 1–2,5 Для стафилококка 4–9 |
| | Фагоцитарное число | Для кандиды 40–90 Для стафилококка 40–80 |

Тесты второго уровня (аналитические) — это более детальное и углубленное исследование параметров иммунной системы, *позволяют уточнить характер дефекта*, выявленного тестами первого уровня. Данный уровень иммунологических исследований требует развертывания специальной лаборатории, предполагает высокую квалификацию врача-лаборанта и наличие материальной базы. Аналитические тесты второго уровня назначаются избирательно в зависимости от клинических симптомов конкретного пациента.

К тестам второго уровня относят:

1. Определение субпопуляций Т-лимфоцитов (Т-хелперы, Т-супрессоры, Т-киллеры).
2. Оценка пролиферативной активности Т- и В-лимфоцитов (реакция бласттрансформации лимфоцитов — РБТЛ).
3. Определение спонтанной миграции лейкоцитов и тест торможения миграции лейкоцитов.
4. Определение лимфоцитов, несущих поверхностные иммуноглобулины различных классов (В-лимфоцитов).
5. Определение медиаторов иммунной системы (цитокинов).
6. Оценка субклассов иммуноглобулинов.
7. Кожные тесты гиперчувствительности замедленного типа.

Методы определения показателей иммунного статуса

Количественная оценка лимфоцитов

Общее (абсолютное) и относительное **число лимфоцитов** определяют по данным клинического анализа крови.

Содержание Т- и В-лимфоцитов подсчитывают в люминесцентном микроскопе в **реакции иммунофлюоресценции**, используя меченые моноклональные флюоресцирующие сыворотки (АТ) к специфическим поверхностным антигенным маркерам, обозначаемым символами CD (*cluster differentiation*). Таких антигенных маркеров известно несколько десятков, но отдельные из них характерны для того или иного типа клеток:

- рецептор CD3 — всех Т-лимфоцитов;
- рецепторы CD19, 21, 22, 72 — В-лимфоцитов;
- рецепторы CD4 — Т-хелперов;
- рецепторы CD8 — цитотоксических Т-лимфоцитов;
- рецепторы CD16 — NK-клеток (натуральные киллеры).

Современными методами оценки содержания и дифференцировки Т-лимфоцитов, их субпопуляций, и других иммунокомпетентных клеток являются методы, также основанные на использовании моноклональных антител к CD-маркерам — **проточная цитометрия** (рис. 65).

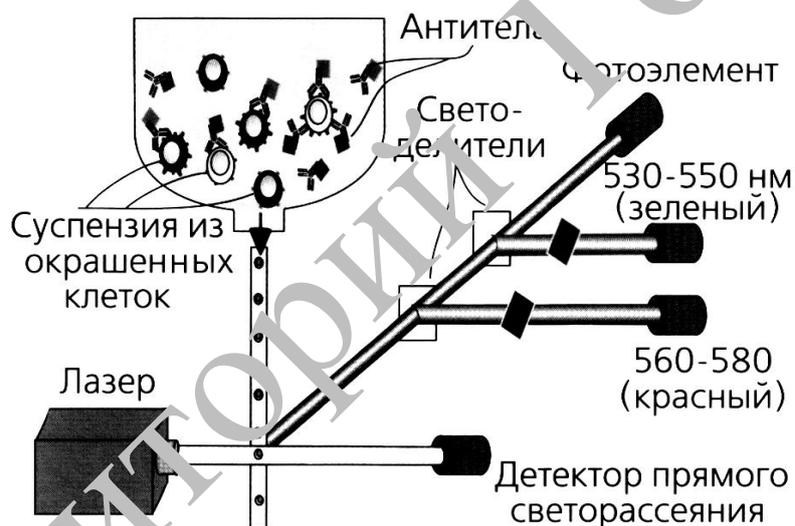


Рис. 65 — Принцип проточной цитометрии

Принцип метода. Искомые клетки, точнее их маркеры – CD-антигены, окрашивают флюоресцирующими антителами. Для окрашивания клеток (например, CD3 – Т-лимфоцитов, CD4 – Т-хелперных лимфоцитов, CD8 – цитотоксических Т-лимфоцитов, CD19, 21, 22, 72 – В-лимфоцитов) применяют моноклональные антитела против их CD-антигенов, меченые флюоресцеинизотиоцианатом, дающим зеленую флюоресценцию, или меченые фикоэритрином, дающим красное свечение. Образец крови после обработки мечеными моноклональными антителами пропускают через тонкую трубку. Через исследуемый образец пропускают лазерный луч, который возбуждает свечение флюорохрома. Фотоумножитель улавливает светорассеивание, по которому анализируется размер, гранулярность клетки, и регистрирует флюоресценцию, свидетельствующую о

количестве меченых антител, связанных с клеткой. Интенсивность флюоресценции коррелирует с плотностью антигенов на поверхности клеток и может быть количественно измерена с помощью фотоэлемента.

Проточную цитометрию применяют для определения содержания основных популяций лимфоцитов, внутриклеточных и внеклеточных цитокинов, функциональной активности НК-клеток, активности фагоцитоза, особенностей апоптоза.

Для определения Т- и В-лимфоцитов более доступным и простым, но менее точным и устаревшим является метод розеткообразования.

Он основан на том, что В-лимфоциты могут адсорбировать на своей поверхности эритроциты мышей, а Т-лимфоциты — эритроциты барана.

Лимфоцит с прилипшими к нему эритроцитами — это и есть розетка, или розеткообразующая клетка (РОК); их подсчитывают в окрашенных по Романовскому-Гимзе мазках из смеси лимфоцитов и соответствующих эритроцитов (рисунок 66). Какое количество розеток, следовательно, такое и общее количество лимфоцитов.

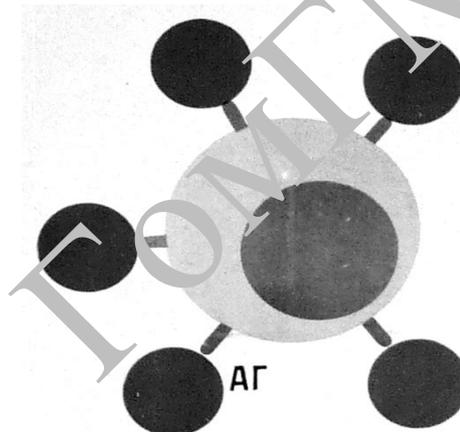


Рисунок 66 —
Розеткообразующая клетка

Исследование функционального состояния лимфоцитов

Определяют способность лимфоцитов размножаться (оценка способности к пролиферации) в ответ на введение митогенов (веществ, стимулирующих размножение) в *реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ)* с фитогемагглютинином (ФГА) — митогеном для Т-клеток. Снижение пролиферативного ответа на ФГА свидетельствует о наличии иммунодефицита, однако причины его могут быть различными. Повышение пролиферативного ответа на ФГА может свидетельствовать о наличии инфекции или какой-либо аутоиммунной патологии.

Оценка функционального состояния фагоцитов

Для оценки фагоцитарной активности нейтрофилов крови определяют фагоцитарное число (процент активных фагоцитов) и фагоцитарный индекс (среднее количество микробных клеток, поглощенных одним лейкоцитом).

Для оценки кислородозависимой микробоцидной способности нейтрофилов используют *НСТ-тест* (НСТ — краситель нитросиний тетразолий). Поглощение фагоцитами микробов сопровождается повышением потребления кислорода этими клетками и образованием перекиси водорода и свободных радикалов кислорода (те и другие можно объединить под названием — активные формы кислорода). Суть реакции состоит в том, что НСТ в присутствии активных форм кислорода окрашивается в синий цвет, а в отсутствии таковых остается бесцветным.

Концентрацию (уровень) иммуноглобулинов разных классов G, M, A и E в сыворотке крови определяют в *реакции преципитации в геле (радиальная иммунодиффузия по Манчини)* с антиглобулиновыми сыворотками к IgG, IgM, IgA, IgE.

Определение концентрации отдельных цитокинов — главных регуляторных молекул, определяющих тип иммунного ответа, проводят помощью *иммуноферментного и радиоиммунного* методов.

Оценка системы комплемента. Определяют гемолитическую активность комплемента в реакции гемолиза с использованием гемолитической системы (состоит из эритроцитов барана и гемолитической сыворотки). Также оценивают количество компонентов комплемента и выявляют продукты активации.

Иммунограмма

Иммунограмма — результаты анализа иммунного статуса организма каждого конкретного пациента, которые вносятся в специальный бланк, содержащий также данные нормальных параметров иммунного статуса лиц соответствующего возраста.

На основании сравнения иммунограммы индивидуума (пациента) с данными нормы с учетом правил интерпретации полученных показателей специалист по клинической иммунологии (иммунолог) делает заключение о наличии отклонений и необходимости иммунотерапии.

Пример бланка иммунограммы представлен на рисунке 67.

Основные правила интерпретации иммунограммы:

1. Комплексный анализ иммунограммы более информативен, чем оценка каждого показателя отдельно.
2. Необходимо учитывать как относительные, так и абсолютные значения каждого показателя иммунограммы.
3. Анализ показателей можно проводить только с учетом клинической картины заболевания.
4. Реальную информацию в иммунограмме несут сильные сдвиги показателей; слабые сдвиги позволяют повысить уверенность в правильности сделанного заключения.
5. Анализ иммунограммы в динамике всегда более информативен как в диагностическом, так и в прогностическом отношении.
6. Отсутствие сдвигов в иммунограмме при наличии клинических симптомов свидетельствует о включении приспособительных механизмов, стрессовых реакций.
7. Выявленные сдвиги в иммунограмме без клинических симптомов целесообразно учесть и включить пациента в группу риска по развитию иммунодефицита.
8. Для диагностической и прогностической оценки иммунограммы следует учитывать возрастные, половые и индивидуальные нормы данного пациента.
9. Первостепенную значимость в иммунограмме имеют соотношения субпопуляций клеток и спонтанных и стимулированных тестов, нежели абсолютные значения каждого показателя.

Лаборатория иммунологии

Карта иммунологического обследования

Ф.И.О. больного _____
 Возраст _____ Пол _____ Дата обследования _____
 Диагноз _____

| | Норма * | |
|---|--|--|
| Количество лейкоцитов _____ $\times 10^9$ /л | (4,5 - 8,0) $\times 10^9$ /л | |
| Базофилы _____ % _____ $\times 10^6$ /л | (0-1) % (20-100) $\times 10^6$ /л | |
| Эозинофилы _____ % _____ $\times 10^6$ /л | (2-5) % (100-300) $\times 10^6$ /л | |
| Палочкоядерные нейтрофилы _____ % _____ $\times 10^6$ /л | (2-4)% (100-300) $\times 10^6$ /л | |
| Сегментоядерные нейтрофилы _____ % _____ $\times 10^6$ /л | (45-60)% (2200-4200) $\times 10^6$ /л | |
| Лимфоциты _____ % _____ $\times 10^6$ /л | (25-45) % (1200-2800) $\times 10^6$ /л | |
| Моноциты _____ % _____ $\times 10^6$ /л | (4-8) % (200-600) $\times 10^6$ /л | |

Фенотипический состав лимфоцитов периферической крови:

| | |
|---|---------------------------------------|
| Зрелые Т-лимфоциты (CD3 ⁺) _____ % _____ $\times 10^6$ /л | (45-70) % (540-1960) $\times 10^6$ /л |
| Хелперы-индукторы (CD4 ⁺) _____ % _____ $\times 10^6$ /л | (33-50) % (396-1400) $\times 10^6$ /л |
| Супрессоры-киллеры (CD8 ⁺) _____ % _____ $\times 10^6$ /л | (15-39) % (192-1092) $\times 10^6$ /л |
| CD4 ⁺ / CD8 ⁺ _____ | 1,5-2,0 |
| Натуральные киллеры (CD56 ⁺ ,16 ⁺) _____ % _____ $\times 10^6$ /л | (5-25) % (60-700) $\times 10^6$ /л |
| В-лимфоциты (CD19 ⁺ ,20 ⁺ ,22 ⁺) _____ % _____ $\times 10^6$ /л | (6-23) % (72-644) $\times 10^6$ /л |
| Активированные Т/В лимфоциты (CD25 ⁺) _____ % _____ $\times 10^6$ /л | (8-18)% (84-504) $\times 10^6$ /л |
| Активированные Т/В лимфоциты (CD95 ⁺ Fas) _____ % _____ $\times 10^6$ /л | (3-18) % (36-504) $\times 10^6$ /л |

Функциональная активность нейтрофилов периферической крови в НСТ-тесте:

| | |
|---|--------|
| Спонтанный вариант: _____ % положительных клеток | 10-15% |
| Стимулированный вариант (ЛПС, зимолан) _____ % положительных клеток | 20-80% |
| Фагоцитарная активность _____ % | 75-80% |

Активность системы complemento по СН 50 _____ гем.ед. (40 - 80) гем.ед.

Сывороточные иммуноглобулины:

| | |
|---------------|-----------------|
| IgM _____ г/л | (0,8 -2,5) г/л |
| IgG _____ г/л | (8,0-16,0) г/л |
| IgA _____ г/л | (0,7 - 3,0) г/л |

Циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК) _____ усл.ед. (40-100) усл.ед.

Замечание: _____

Подпись врача – лаборанта _____

Рисунок 67 — Иммунограмма (пример бланка)

МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА

Под **коллективным иммунитетом** понимают невосприимчивость общества к тем или иным инфекционным болезням. Она создается с помощью мероприятий специфической профилактики (например, вакцинация) и других мер, применяемых органами здравоохранения, а также благодаря мероприятиям по повышению материального и культурного уровня жизни населения (улучшение условий жизни, питания и др.).

Иммунная прослойка населения — доля населения (в процентах), обладающая невосприимчивостью к конкретному инфекционному заболеванию (включая привитых и переболевших). Она определяется с помощью различных иммунологических реакций. Если число восприимчивых лиц невелико и они оказываются в окружении невосприимчивых, то болезнь не получает распространение.

Поствакцинальный иммунитет — иммунитет, который развивается после введения вакцины.

Для оценки состояния искусственного поствакцинального иммунитета используются следующие методы:

- постановка серологических реакций с сыворотками вакцинированных;
- кожные иммунологические пробы,
- кожно-аллергические пробы.

Оценка состояния иммунитета у населения производится в основном к инфекциям, управляемым средствами специфической профилактики — дифтерия, столбняк, коклюш, корь, краснуха, эпидемический паротит и др. Против этих инфекций имеются эффективные вакцины. Кроме того выборочно осуществляют контроль эффективности иммунопрофилактики и состояния коллективного иммунитета к гриппу, полиомиелиту, туберкулезу, туляремии, бруцеллезу и другим инфекциям.

Серологический контроль за состоянием и длительностью сохранения поствакцинального иммунитета необходимо осуществлять систематически методом выборочного серологического обследования различных групп населения. **Обследованию подлежат** привитые дети и подростки от 3-х до 17 лет и взрослые старше 20 лет. Серологический контроль следует проводить, начиная с групп детей 3-х лет не ранее, чем через 6 месяцев после последней прививки. Для обследования следует выбрать 4 коллектива одной возрастной группы, не менее 25 человек в каждом коллективе. Серологический мониторинг *проводят путем серологического исследования сывороток крови привитых людей.* Чаще всего применяют **серологические реакции** — РНГА с эритроцитарными антигенными диагностикумами, ИФА для выявления специфических АТ и определении их концентрации. Кроме этих реакций также применяют и другие методы. Для выявления

иммунитета к коклюшу ставится РА; постоянно контролируется и состояние иммунитета к вирусам гриппа с помощью РТГА. Проводится также выборочный контроль иммунитета к полиомиелиту у детей с помощью реакции нейтрализации вируса имеющимися в сыворотке АТ на культуре клеток.

Для контроля иммунитета к дифтерии в детских коллективах *ранее применялась кожная иммунологическая проба Шика* — внутрикожное введение минимальной дозы разведенного дифтерийного токсина (при наличии в крови достаточного титра АТ (антитоксинов) введенный токсин нейтрализуется и кожная реакция отсутствует). *В настоящее время*, кроме применения, например, РНГА, можно определять АТ к дифтерийному токсину в сыворотке крови человека в *реакции нейтрализации* в культуре клеток.

Постановка *кожно-аллергической пробы* с туберкулезом (проба Манту) позволяет выявить наличие нестерильного иммунитета к туберкулезу. Осуществляется также контроль эффективности вакцинопрофилактики туляремии путем постановки кожно-аллергической пробы с тулярином. При отрицательной пробе — иммунитет отсутствует.

Проведение иммунологического контроля эффективности вакцинопрофилактики позволяет провести **эпидемиологическую оценку уровня протективного иммунитета** (т. е. оценить фактическую защищенность к данной инфекции) и качество прививочной работы. Данные о серонегативных лицах, не имеющих защитного титра АТ, передаются в поликлинику для разработки индивидуальных схем иммунизации. *Уровень протективного иммунитета* не ниже минимального в каждой возрастной группе в популяции *детей* в целом должен составлять 90 %. При уменьшении этого показателя необходимо проводить коррекцию вакцинопрофилактики. *Уровень протективного иммунитета* не ниже минимального у *взрослых лиц* должен составлять 75 %. Если в результате вакцинации достигнуто значительное снижение заболеваемости, но при этом коэффициент иммунологической эффективности оказался невысоким (менее 90 % у детей и 75 % у взрослых), то это свидетельствует о неустойчивости достигнутого эпидемиологического благополучия и возможном повышении заболеваемости, в первую очередь, в слабо защищенных группах.

Биологический (экспериментальный) метод

Биологический метод исследования — совокупность способов искусственного воспроизведения клинической картины инфекционных болезней или их синдромов на лабораторных животных.

Этот метод преследует также ряд других целей:

1. Диагностика инфекционных болезней.
2. Выделение и идентификация чистой культуры возбудителя.
3. Определение патогенности и вирулентности микроорганизма.

4. Выделение и идентификация экзотоксинов микроорганизмов.
5. Получение иммунопрепаратов (иммунных сывороток).
6. Проверка безвредности и эффективности лечебных препаратов (в том числе химиотерапевтических препаратов, иммунопрепаратов).
7. Культивирование вирусов (т. к. вирусы являются облигатными внутриклеточными паразитами).

Этапы биологического метода:

1. Забор материала. Материал для исследования забирается в асептических условиях, в стерильную посуду, гомогенизируется и используется для заражения как можно быстрее.

2. Выбор лабораторного животного. Выбор вида, линии, возраста и пола животных диктуется целями исследований. В качестве лабораторных животных наиболее широко используют белых мышей, морских свинок, белых крыс, кроликов. Специальные исследования проводят на обезьянах, собаках, крупном и мелком рогатом скоте, лошадях, некоторых видах диких животных. *В опыт берутся здоровые животные, одного вида, пола, возраста, веса и содержащиеся в одинаковых условиях. Животных маркируют краской, либо закрепляя кольца на лапках или другими способами.*

3. Фиксация животных при проведении исследований. *Во время заражения животное должно быть неподвижным, его фиксируют с применением специальных приспособлений (станки, столики) или руками.*

Например, у белой мыши захватывают кожу спины на затылке большим и указательным пальцами левой руки, а остальными пальцами этой же руки удерживают задние конечности и хвост (рисунок 68). Эти же манипуляции можно выполнять раздельно двумя руками. Фиксированное животное располагают в нужном положении.

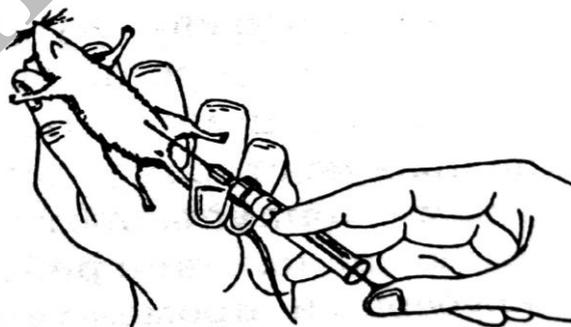


Рисунок 68 — Фиксация белой мыши при проведении исследований

4. Заражение лабораторных животных

Методы заражения лабораторных животных. Заражение животных проводят одним из способов (накожный, подкожный, внутрикожный, внутримышечный, внутривенный, внутрибрюшинный, интрацеребральный, пероральный, интраназальный и др.) в зависимости от тропизма микроба. Перед заражением шерсть на месте введения материала удаляют (выбривают). Материал вводят с соблюдением правил асептики (кожу подвергают антисептической обработке (йодной настойкой); используют только стерильные инструменты). При болезненных вмешательствах проводят анестезию.

Накожный способ заражения. Представляет собой втирание материала стерильной стеклянной палочкой в выбритый участок кожи или в скарифицированную кожу.

Подкожное заражение. Кожу животного захватывают в складку и в основание кожной складки вводят иглу шприца, далее медленно вводят нужное количество материала (0,5–2 мл) в зависимости от вида животного, затем отпускают складку.

Внутрикожное заражение. Материал в объеме 0,1–0,2 мл вводят в кожу тонкой острой иглой (туберкулиновым шприцем) скосом вверх под острым углом. Правильно введенная игла видна сквозь эпидермис и на месте инъекции образуется вздутие, похожее на «лимонную корочку».

Внутримышечное заражение. Материал вводится в мышечную ткань верхней части задней конечности животного. Острые иглы направляют почти перпендикулярно участку.

Внутривенное заражение. Инъекцию производят в хвостовую вену мышей или крыс, краевую вену уха кроликов, яремную вену морских свинок. Обрабатывают кожу над веной. Для лучшего наполнения вены ее пережимают ниже будущего введения или кожу нагревают теплой (55 °С) водой. Материал вводят медленно по направлению тока крови.

Внутрибрюшинное заражение. Животное располагают вниз головой или в наклонном положении, чтобы избежать поражения кишечника иглой (внутренние органы перемещаются ближе к диафрагме). Также во избежание повреждения внутренних органов пользуются иглой с притупленным концом. Инъекцию делают в нижней трети живота, сбоку от средней линии, держа иглу под острым углом, прокалывают брюшную стенку (при этом ощущается «провал» иглы в брюшную полость).

Интрацеребральное (внутричерепное) заражение. Мышей и крыс заражают как под общим наркозом, так и без него. Материал вводят шприцем с тонкой иглой на расстоянии 1–2 мм от точки пересечения средней линии черепа с линией, соединяющей наружные углы глаз. Кроликов и морских свинок заражают путем прокола тонкой кости в области надглазничной борозды. У крупных животных производят трепанацию черепа.

Пероральное заражение. Производят введение заразного материала животному в рот, или непосредственно в желудок через эластичный зонд. Объем жидкости, вводимой перорально, зависит от вида и возраста животного.

Интраназальное заражение (через нос). Производят закапывание материала в нос стерильной пипеткой или иглой, надетой на шприц. При этом способе заражения применяют легкий наркоз.

5. Наблюдение за животными. Регистрация признаков заболевания зараженного животного или его гибели.

6. Прижизненный забор материала от животного и проведение бактериологического и серологического исследования, постановка аллергической пробы.

7. Вскрытие трупа животного, изучение патологоанатомической и патоморфологической картины, протокольный **посев органов** павших или убитых животных (для выявления обсемененности и выделения чистой культуры), **приготовление мазков-отпечатков** из внутренних органов (рисунок 69).

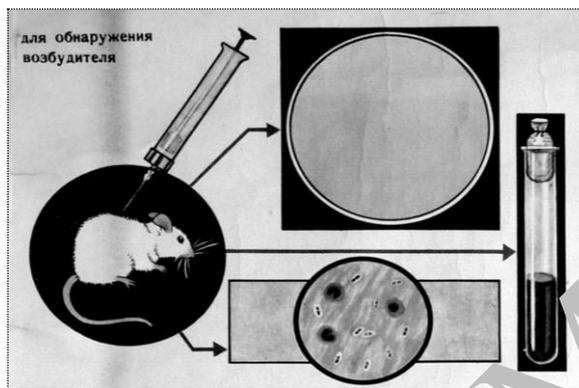


Рисунок 69 – Посев органов животных, приготовление мазков-отпечатков (схема)

При вскрытии трупа лабораторного животного необходимо соблюдать следующие условия:

1. Между смертью и вскрытием трупа животного должно проходить как можно меньше времени, так как кишечная флора даже при температуре холодильника проникает в ткани, кровь, органы через 20–27 часов.

2. Вскрытие трупа, взятие материала и его исследование производят в условиях, предохраняющих от загрязнения посторонними микроорганизмами.

3. Извлеченный материал до момента посева не должен соприкасаться с дезинфицирующими средствами.

4. Все наблюдения во время вскрытия, а также результаты исследования протоколируются в специальном журнале.

5. При вскрытии трупа и его исследовании необходимо предотвратить всякую возможность инфицирования лиц, производящих вскрытие.

Подготовка погибшего животного к вскрытию производится следующим образом: животное захватывают пинцетом, кладут брюшком вверх на специальную доску, помещенную в эмалированный лоток, и прикрепляют к доске за четыре лапки. Производят осмотр трупа и отмечают внешние патологические изменения, если таковые имеются. Всю шерсть животного смачивают дезинфектантом (спирт, 5 % карболовая кислота, 5 % хлорамин). Кожу разрезают по средней линии живота от симфиза до нижней челюсти, затем делают боковые разрезы к передним и задним лапам. Кожу отщипаро-выывают, отворачивают в стороны и прикалывают к пластине (рисунок 70).

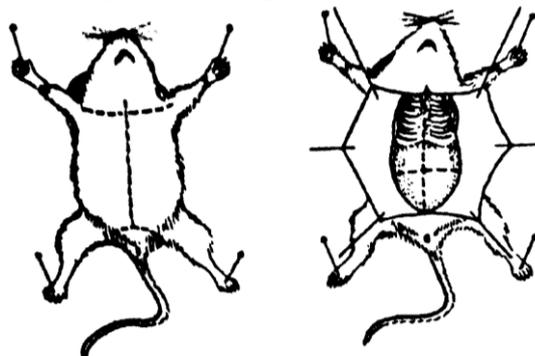


Рисунок 70 — Фиксация трупа животного для вскрытия

Отмечают изменения в подкожной клетчатке: расширение сосудов, отек, кровоизлияния и т. д.

Вскрытие начинают с грудной полости, вырезая и откидывая грудину кверху. Производят осмотр грудной полости, отмечают наличие или отсутствие экссудата в ней, из которого делают мазки и посев в питательную среду. Отмечают внешний вид легких и сердца. Кровь из сердца забирают проколом пастеровской пипеткой; с последующим посевом крови. Делают мазки-отпечатки из тканей легких и плевры. При необходимости забирают из органов грудной полости кусочки тканей. *Далее проводят вскрытие и исследование брюшной полости.* Приподняв пинцетом брюшную стенку, разрезают ее ножницами от диафрагмы до лобка и отводят в стороны образовавшиеся мышечные лоскуты. При наличии экссудата его засевают в питательную среду. Затем тщательно осматривают и исследуют органы брюшной полости (кишечник, печень, почки, селезенку и др.). Взятие материала из паренхиматозных органов проводят следующим образом: поверхность органа прижигают нагретым в пламени спиртовки скальпелем; прижженный участок органа прокалывают стерильной пастеровской пипеткой с оттянутым концом или стерильной гетлей; взятый материал засевают в жидкие и плотные питательные среды. Для приготовления мазков вырезают кусочек ткани органа и пинцетом готовят мазки-отпечатки.

После вскрытия труп животного и трупный материал обеззараживают, автоклавируя или сжигая. Посевы подписывают и помещают в термостат. Все инструменты, лоток, доску дезинфицируют и стерилизуют. Трупы животных, павших от особо опасных инфекций, вскрывают в специальных помещениях с соблюдением особых мер предосторожности.

8. Идентификация выделенной культуры микроорганизмов.

9. Заключение по результатам исследования.

Оценка метода

Метод высокоинформативен, может быть использован на ранних этапах болезни, но не всегда доступен, дорог, длителен, небезопасен.

В настоящее время в качестве диагностики инфекционных заболеваний биологический метод заменен на более современные, экономически выгодные методы лабораторной диагностики.

Молекулярно-генетический метод

Современный период развития микробиологии характеризуется исследованием микроорганизмов на генетическом уровне. В связи с этим в современной медицине все большее распространение получают молекулярно-генетические методы микробиологической диагностики, которые являются экспресс-методами диагностики (обнаружение и идентификация микроорганизмов непосредственно в биологическом материале пациента, без выделения чистой культуры). *В основе молекулярно-генетических методов лежит использование комплементарного связывания нуклеотидов.*

Известные в настоящее время реакции можно разделить на две большие группы.

К первой группе относятся методы прямого обнаружения специфической последовательности нуклеотидов (ДНК или РНК) при помощи коротких олигонуклеотидных одноцепочечных фрагментов, имеющих метку. Эти реакции получили следующие названия: **реакция гибридизации нуклеиновых кислот или метод ДНК-зондов, или метод молекулярной гибридизации.**

Вторая группа методов основана на амплификации — циклически повторяющейся репликации *in vitro* искомого фрагмента ДНК (РНК). Амплифицированный фрагмент затем выявляется путем электрофореза в геле или с использованием гибридизационного анализа. К этой группе методов относится **полимеразная цепная реакция (ПЦР)**. В настоящее время разработано много модификаций этой реакции, а также амплификационные тесты, принципиально отличающиеся от ПЦР, однако именно полимеразная цепная реакция наиболее широко используется для диагностики различных форм инфекционной патологии.

МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ (МЕТОД ДНК-ЗОНДОВ)

В основе метода лежит способность нуклеиновых кислот к гибридизации — образованию двухцепочечных структур за счет взаимодействия комплементарных нуклеотидов, в частности, реакция гибридизации специфических олигонуклеотидных зондов, меченых, например, радиоактивным изотопом (или флюорохромом) с образцом выделенной ДНК изучаемого микроорганизма.

ДНК-зонд — это одноцепочечный меченый (радиоактивным изотопом (^{32}P), флюорохромом и др.) фрагмент ДНК, несущий специфичный для данного вида бактерий ген. Эти фрагменты нуклеиновых кислот получают: а) при рестрикции (расщеплении молекулы на две цепочки) участка ДНК известных микроорганизмов; б) путем химического синтеза.

Варианты проведения молекулярной гибридизации (рисунок 71):

Метод гибридизации на твердой фазе. Принцип метода основан на гибридизации зонда на твердой поверхности, в качестве которой чаще всего используют полимерный мембранный фильтр, например, нейлоновую мембрану.

Реакция гибридизации состоит из следующих этапов:

1. Выделение ДНК из исследуемых микробов, денатурация и рестрикция (нарезка рестриктазами) молекулы ДНК (нужны одноцепочечные участки).

2. Фиксация образца нуклеиновой кислоты на полимерной мембране. При нанесении фрагментов изучаемой ДНК на мембрану в виде точек (округлая форма пятна) — *дот-гибридизация*, в виде полосок — *слот-*

гибридизация. Блот-гибридизация по Саузерну — саузерн-блот: небольшие фрагменты изучаемой ДНК предварительно разделяют по относительной молекулярной массе электрофорезом в полиакриламидном геле, затем ДНК переносят из геля на поверхность мембран.

3. Внесение ДНК-зонда. Если зонд комплементарен с ДНК исследуемых микробов, то произойдет связывание, т. е. гибридизация; несвязавшиеся зонды удаляют промыванием.

4. Детекция и учет результатов реакции, например, с помощью автордиографии (при использовании ДНК-зондов, меченных радиоактивным изотопом) или в люминесцентном микроскопе (в случае использования флуоресцентных ДНК-зондов), и др.



Рисунок 71 — Схема вариантов проведения реакции гибридизации нуклеиновых кислот

Метод гибридизации *in situ*. При этом манипуляции с ДНК проводят в интактных образцах ткани (тканевых срезах), фиксируемых на предметном стекле. После инкубации с ДНК-зондом на стекло наносят фотографическую эмульсию. В зонах радиоактивной эмиссии (т. е. там, где произошла гибридизация) на ней проявляются темные микроскопические гранулы. Гибридизация *in situ* является одним из наиболее эффективных методов картирования комплементарных ДНК-зонду последовательностей ДНК на хромосомах. Эта методика эффективна при исследовании распределения по геному повторяющихся последовательностей ДНК; определении не только хромосомной принадлежности, но и внутрихромосомной локализации уникальных генов в тех случаях, когда имеются соответствующие ДНК-зонды.

Метод гибридизации в растворе. При гибридизации в растворе искомая нуклеиновая кислота и зонд свободно взаимодействуют в водной реакционной смеси, что повышает скорость процесса гибридизации. Детекцию результатов гибридизации осуществляют путем нуклеазного гидролиза одноцепочечных ДНК и выделения оставшихся двухцепочечных гибридов, содержащих меченый зонд. Метод хорош тем, что требует минимальных объемов и количеств биологического и клинического образцов, поэтому может быть использован в диагностических целях. В то же время этот метод имеет один существенный недостаток — на его основе можно создать диагностические тест-системы для выявления специфических фрагментов небольших участков ДНК при условии достаточно высокой концентрации искомых фрагментов или участков в исследуемом образце. Это снижает порог чувствительности до уровня иммуноферментного анализа и даже ниже.

Метод гибридизации на биочипах (микроэрей гибридизация) — наиболее совершенный метод. Позволяет наносить и фиксировать до нескольких сотен тысяч ДНК-зондов на поверхность стеклянного биочипа, что дает возможность изучать одновременно множество генов, присутствующих в ДНК микроорганизма. Метод используют в диагностике заболеваний, идентификации генов и изучении их экспрессии, сравнительном анализе геномов и протеомов.

ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — процесс многократного копирования (амплификации) в условиях *in vitro* фрагментов генома, что приводит к быстрому накоплению определенной, интересующей исследователя специфической последовательности ДНК в достаточном количестве, необходимом для последующей детекции.

Исходные компоненты ПЦР представлены на рисунке 72.

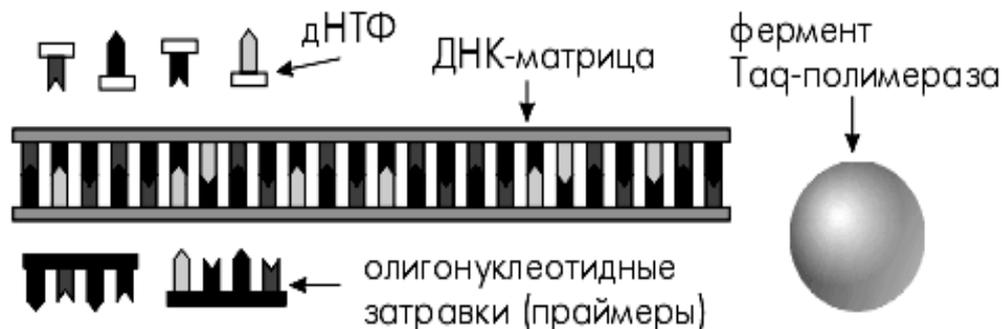


Рисунок 72 — Исходные компоненты полимеразной цепной реакции (реакция)

ДНК-матрица (анализируемый образец) — ДНК или ее часть, содержащая искомым специфический фрагмент; является мишенью для последующего многократного копирования.

Праймеры — синтетические олигонуклеотиды (последовательности из 20–30 нуклеотидов), комплементарные последовательностям ДНК на границах определяемого специфического фрагмента. Выбор специфического фрагмента и подбор праймеров играет важнейшую роль в специфичности проведения амплификации и определяет качество проводимого анализа.

Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) — смесь четырех видов нуклеотидов: дезоксиаденозинтрифосфат (дАТФ), дезоксигуанозинтрифосфат (дГТФ), дезоксицитидинтрифосфат (дЦТФ), дезокситимидинтрифосфат (дТТФ); являются материалом для синтеза новых комплементарных цепей ДНК.

Фермент Taq-полимераза — термостабильная ДНК-полимераза, катализирующая удлинение цепей праймеров путем последовательного присоединения нуклеотидных соединений к растущей цепи синтезируемой ДНК. Taq-полимеразу получают из термофильных микроорганизмов *Thermophilus aquaticus*.

Буферный раствор — реакционная среда, содержащая ионы Mg^{2+} , необходимые для поддержания активности фермента Taq-полимеразы.

Положительный контроль — образец ДНК выделяемой биологической системы.

Весь технологический процесс исследования с использованием полимеразной цепной реакции включает:

- 1) подготовка образца — выделение ДНК из пробы и ее очистка;
- 2) проведение самой полимеразной реакции, направленной на умножение (амплификацию) фрагментов ДНК возбудителя заболевания;
- 3) детекция амплифицированных фрагментов и оценка результатов.

Для проведения полимеразной реакции используется специальное устройство — **термоциклер (амплификатор)**, представляющий собой аппарат, в гнезда которого устанавливаются специальные пробирки, изготовленные из особого термopроводимого пластика, с реакционной смесью (рисунок 73).



Рисунок 73 — Примеры ПЦР-амплификаторов

Амплификатор позволяет автоматически, по определенной программе изменять температурный режим реакционной смеси. Параметры температурного режима играют исключительно важную роль для успешного проведения реакции.

Каждый цикл ПЦР включает три этапа (рисунок 74):

1 этап. Денатурация ДНК (расплетение двойной спирали ДНК на две отдельные цепи). Протекает при температуре 93–95 °С в течение 30–40 с.

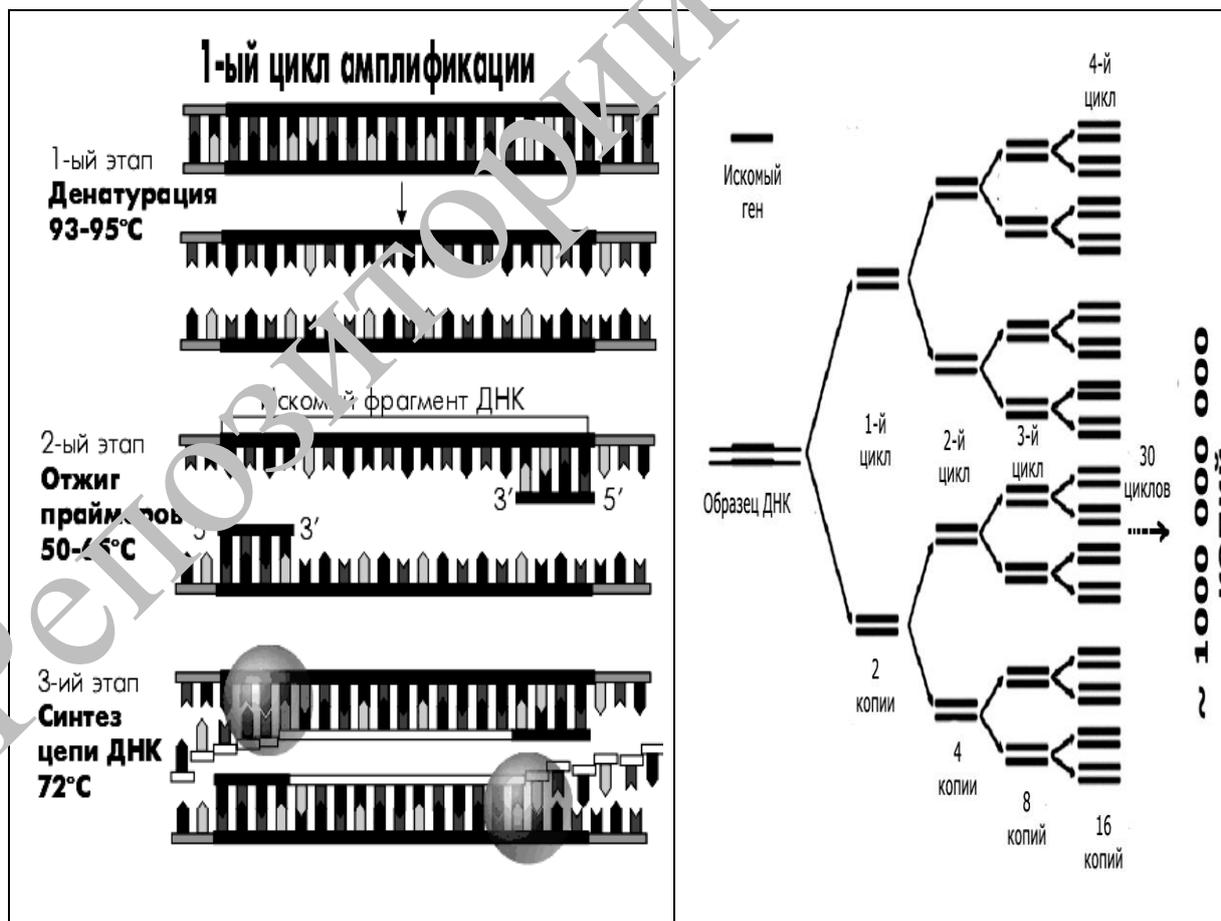


Рисунок 74 — Схема полимеразной цепной реакции

2 этап

Присоединение праймеров (отжиг). Присоединение праймеров происходит комплементарно к соответствующим последовательностям на противоположных цепях ДНК на границах специфического участка. Для каждой пары праймеров существует своя температура отжига, значения которой располагаются в интервале 50–65 °С. Время отжига — 20–60 с.

3 этап

Элонгация (достраивание цепей ДНК). Процесс катализируется ферментом термостабильной ДНК-полимеразой (Taq-полимеразой), которая прикрепляется к 3'-концу праймера; происходит комплементарное достраивание цепей ДНК в противоположных направлениях, начиная с участков присоединения праймеров. Материалом для синтеза новых цепей ДНК служат добавляемые в раствор дезоксирибонуклеотидтрифосфаты (дНТФ). Протекает при температуре 72 °С в течение 20–40 с.

Образовавшиеся в первом цикле амплификации две новые цепи ДНК служат матрицами для второго цикла амплификации. Накопление *ампликонов* (специфических продуктов амплификации, ограниченных по длине праймерами) в растворе происходит по формуле 2^n , где n — число циклов амплификации. Для получения достаточного количества копий искомого фрагмента ДНК *амплификация включает 20–40 циклов*. Именно ампликоны являются непосредственным предметом детекции.

Детекцию продуктов амплификации, т. е. выявление амплифицированных фрагментов проводят с помощью электрофореза в агарозном геле или гибридизационно-ферментативным методом, с последующей оценкой результатов.

Описанный выше метод проведения полимеразной цепной реакции является «классической» ПЦР.

При интерпретации результатов ПЦР следует помнить, что могут быть получены как ложноположительные, так и ложноотрицательные результаты.

• **Ложноположительные результаты** могут наблюдаться в результате контаминации продуктами амплификации (ампликонами), поскольку в процессе работы ампликоны накапливаются в больших количествах и очень легко переносятся с аэрозолями и через приборы. Следовательно, для исключения перекрестного загрязнения исследуемых проб выделение нуклеиновых кислот должно проводиться с соблюдением ряда условий (например, разделение ПЦР-лаборатории на зоны (отдельные комнаты); обязательное использование чистых перчаток, одноразовых пробирок и наконечников к автоматическим пипеткам, проведение предварительной ультрафиолетовой обработки помещения и рабочих поверхностей столов и приборов и др.); также необходим постоянный внутрилабораторный контроль за качеством получаемых результатов.

• **Ложноотрицательные результаты** могут наблюдаться в результате снижения чувствительности ПЦР при ингибировании реакции компонентами биологических образцов (например, при исследовании образцов цельной крови ингибирование ПЦР может происходить за счет гемоглобина, лактоферрина, плазмы).

Основными достоинствами полимеразной цепной реакции являются ее универсальность, высокая чувствительность и специфичность. ПЦР может быть использована для обнаружения любого инфекционного агента, если для него имеется соответствующий праймер. Особое значение показано использование ПЦР в тех случаях, когда трудно выделить чистую культуру возбудителя из-за сложности метода культивирования, или некультивируемые микробы, персистирующие формы микроорганизмов при латентных и хронических инфекциях, или в исследуемом образце концентрации возбудителя очень низкие (легионеллезы, хламидиозы, микоплазмозы, начальный период ВИЧ-инфекции и др.) Тест-системы с праймерами для использования ПЦР с целью обнаружения различных возбудителей разработаны и внедряются в практику.

Варианты и модификации ПЦР

Классическая ПЦР (specific PCR) — амплификация участков ДНК размером до 5000 п.о. с использованием одной пары праймеров. Описана в вышеизложенном материале.

Мультиплексная (мультипраймерная) ПЦР (multiplex PCR). Методика позволяет проводить ПЦР с двумя-четырьмя и более не перекрещивающимися праймерами нескольких возбудителей. Мультиплексная ПЦР позволяет определить в одной пробе нуклеиновые кислоты сразу нескольких возбудителей, что особенно актуально, т.к. часто при диагностике обнаруживаются смешанные формы инфицирования. Такой подход уже используется в диагностической практике.

Гнездовая ПЦР — обладает большей чувствительностью и специфичностью; позволяет определять нуклеиновые кислоты, присутствующие в очень низкой концентрации. Проводится последовательно с двумя разными парами праймеров (вначале с парой внешних праймеров, затем с парой внутренних праймеров). ДНК продукты, образуемые в первой ПЦР после использования первой пары праймеров, переносят в другую пробирку, где они взаимодействуют со второй (внутренней) парой праймеров.

Обратно-транскрипционная ПЦР — ОТ-ПЦР (RT-PCR — reverse transcription — polymerase chain reaction). Методика позволяет осуществлять ПЦР с РНК-содержащими возбудителями, считывая информацию с РНК и создавая комплементарную ей ДНК. Выполнение данного процесса возможно при использовании специальных ферментов, обладающих обратнотранскрипционными свойствами (RT), и дезоксинуклеотидтрифосфатов. При

помощи фермента обратной транскриптазы или ревертазы (RT) и одного цикла амплификации по специальной программе осуществляется обратная транскрипция РНК: одна нить РНК превращается в двойную комплементарную ДНК, а дальше ДНК может быть амплифицирована «классической» ПЦР.

ПЦР в режиме реального времени — Реал-тайм ПЦР (Real-Time PCR)

Реал-тайм ПЦР — это семейство методик количественного ПЦР со следующими чертами:

- 1) определение образования продукта реакции после каждого цикла амплификации;
- 2) построение по этим данным кинетической кривой ПЦР;
- 3) определение относительной концентрации субстрата на основании анализа этой кривой.

Для детекции ПЦР-продукта используются флюоресцентные красители, обеспечивающие флюоресценцию, прямо пропорциональную количеству ПЦР-продукта. Используется для определения точечных мутаций, количественного содержания ДНК в пробе, а также для определения уровня экспрессии генов. Этот тип ПЦР находит все большее распространение, так как выявление ампликонов осуществляется по флюоресценции зондов либо красителя *SybrGreen* и не требует проведения электрофореза (сокращается время и трудоемкость анализа).

Лонг-ПЦР (Long-PCR) — модификация ПЦР, разработанная для амплификации и последующего исследования протяженных участков ДНК. Принцип метода заключается в увеличении времени полимеризации и подбора новых разновидностей Taq-ДНК-полимеразы, обладающих эндонуклеазной (редактирующей) активностью, т.е. способных вырезать ошибочные (некомплементарные) нуклеотиды.

RAPD-анализ (анализ полиморфизма случайно амплифицированной ДНК). Использует короткие праймеры, способные связываться с разными участками ДНК, в результате чего образуются многочисленные фрагменты разной длины, по количеству и размерам которых судят о групповой или видовой принадлежности микроорганизма.

ПЦР *in situ*. Метод сравнительно недавно предложен для практики; позволяет проводить ПЦР на срезе или в мазке. Метод хорошо себя зарекомендовал и используется в онкологии, хотя спектр его применения не ограничивается онкологическими заболеваниями. В данном методе отсутствует пробоподготовка, при этом используется та же ПЦР-смесь, что и в «классическом» методе, однако сама реакция проходит на поверхности среза. Для проведения данной методики требуется специальный амплификатор. Детекцию результатов проводят с использованием ферментативно-гибридизационного метода с визуальной оценкой полученных результатов в обычном световом микроскопе.

Широкодиапазонная ПЦР. Используется для определения присутствия микроорганизмов, в том числе неизвестных и некультивируемых, в клиническом материале от больного. Для этого применяют универсальные праймеры, которые взаимодействуют с высоко консервативными участками ДНК, встречающимися у многих микроорганизмов (гены 16S рРНК).

СЕКВЕНИРОВАНИЕ

Секвенирование — определение нуклеотидной последовательности ДНК. Принцип секвенирования заключается в том, чтобы получить серию комплементарных молекул ДНК, различающихся по длине на одно основание.

Анализ полученной информации, заключенной в секвенированном фрагменте ДНК, позволяет решить следующие задачи:

- расшифровка генома с определением количества генов, их протяженности, локализации, функций;
- определение мутаций в генах для выявления резистентных микроорганизмов и изучения молекулярных механизмов устойчивости;
- выявление присутствия транспозонов, IS-элементов;
- идентификация неизвестных микроорганизмов путем сравнения нуклеотидной структуры некоторых их генов с соответствующими последовательностями известных видов;
- выявление направлений эволюции микроорганизмов (построение дендрограмм, позволяющих оценивать сходство микроорганизмов, степень родства и их происхождение).

Основные методы секвенирования:

- химический — метод Максама — Гильберта, где используют химическое расщепление ДНК по одному основанию;
- ферментативное секвенирование (дидезоксисеквенирование) — метод Сэнджера, где синтезируют нужную цепь ДНК, специфически останавливая синтез на заданном основании.

Чаще при секвенировании используют *метод Сэнджера*, т. к. он более надежен и прост в исполнении.

Этапы:

1. ДНК денатурируют, чтобы получить однонитевые молекулы.
2. Добавляют секвенирующий праймер — искусственно синтезируемую олигонуклеотидную последовательность, комплементарную определенному участку исходной молекулы ДНК.
3. На изучаемой ДНК, выступающей в качестве матрицы, при помощи ДНК-полимеразы синтезируется комплементарная цепочка, в которую в любой момент с начала синтеза может быть встроен, вместо обычного дезокси-нуклеотидтрифосфата (дАТФ, дЦТФ, дГТФ, дТТФ), соответствующий терминатор — специфический дидезоксинуклеотидтрифосфат (ддАТФ, ддЦТФ, ддГТФ, ддТТФ), меченый флюорохромом. После встраивания тер-

минатора ДНК-полимераза неспособна присоединить следующий нуклеотид и синтез ДНК прекращается, цепь ДНК обрывается.

4. Дальнейшее проведение электрофореза в денатурирующем полиакриламидном геле позволяет разделять фрагменты, различающиеся размером в один нуклеотид.

5. Так как терминаторы мечены флюорохромом, то фрагменты флюоресцируют, что регистрируется прибором — аквосеквенатором, который выдает результаты в графическом и текстовом формате.

НАПРАВЛЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ В ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

Диагностика инфекционных заболеваний. Маркером возбудителя является его геном, а именно видоспецифические генетические участки, по которым определяют присутствие определенного вида микроорганизма в клиническом материале (идентифицируют микроорганизмы), т.е. проводят генодиагностику заболевания. Ведущую роль ПЦР играет в диагностике хронических инфекционных состояний, обусловленных персистенцией микроорганизмов (например, урогенитальный хламидиоз). ПЦР — незаменимый инструмент при идентификации внутриклеточных и мембранных паразитов, таких как вирусы, риккетсии, хламидии, микоплазмы; также широко используют для идентификации длительно культивируемых бактерий (например, микобактерий туберкулеза).

Определение резистентности микроорганизмов к антибиотикам, и генов, детерминирующих антибиотикорезистентность. ПЦР позволяет проводить определение антибиотикорезистентности у медленно растущих и труднокультивируемых бактерий. В последнее время молекулярно-генетические методы широко используются для выявления маркеров резистентности — генов резистентности, либо мутаций в генах. Например, определение устойчивости к β-лактамам энтеробактерий проводят по наличию в их геноме *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}* или *bla_{TEM}*-генов, детерминирующих синтез β-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) соответствующих классов.

Эпидемиология и инфекционный контроль. С помощью молекулярно-генетических методов определяют различия микроорганизмов одного вида (типизируют микроорганизмы), выделенных от разных больных, в разных стационарах, в разных географических регионах. Это позволяет определять источники возбудителя, пути его распространения в стационаре, стране, мире и разрабатывать меры, контролирующие распространение эпидемических клонов.

Также **использование молекулярно-генетических методов возможно и в других сферах:** для расшифровки структуры и функции геномов, выявления направлений эволюции микроорганизмов, в биотехнологии и вакцинологии, определении генетически модифицированных пищевых продуктов, детекции инфекционных агентов в окружающей среде.

РАЗДЕЛ 4

МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

С целью лабораторной диагностики вирусных инфекций используют методы экспресс-диагностики, вирусологический и серологический (таблица 26).

Таблица 26 — Методы лабораторной диагностики вирусных инфекций

| Методы | Принцип |
|---------------------------|---|
| 1. Экспресс-диагностика | Основана на прямом и быстром обнаружении возбудителя или его компонентов (вирусных АГ, включений, генома) непосредственно в клиническом материале, взятом от пациента |
| 2. Вирусологический метод | Основан на культивировании вирусов на чувствительных тест-системах (курином эмбрионе, культуре клеток, лабораторных животных) с последующей идентификацией выделенного вируса |
| 3. Серодиагностика | Определение прироста (динамики) АТ к вирусу (за определенный период заболевания) в парных сыворотках больного |

Выбор метода зависит от биологических свойств вируса, периода заболевания, а также технической оснащенности лаборатории.

Экспресс-диагностика

Для экспресс-диагностики используют следующие методы:

ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ И ИММУННАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

Применяется для обнаружения вирионов в патологическом материале.

Электронная микроскопия. С помощью этого метода можно обнаружить собственно вирус. Однако ЭМ не позволяет идентифицировать вирусы, так как у многих из них нет морфологических различий внутри семейства. Одним из вариантов ЭМ, используемым в диагностических целях, является **иммунная электронная микроскопия (ИЭМ)**. ИЭМ — *электронная микроскопия вирусов, обработанных соответствующими специфическими антителами*. В результате взаимодействия антител с вирусами образуются комплексы, которые после негативного контрастирования легче обнаруживаются. ИЭМ несколько более чувствительна, чем ЭМ; позволяет идентифицировать различные виды вирусов, выявленные электронной микроскопией (например, различные виды герпесвирусов), что невозможно сделать, основываясь на морфологических особенностях.

Электронная микроскопия предполагает использование электронного микроскопа (рисунок 75), в котором для освещения объектов вместо светового пучка используются электронные лучи (поток электронов), что позволяет увеличить чувствительность метода на несколько порядков.

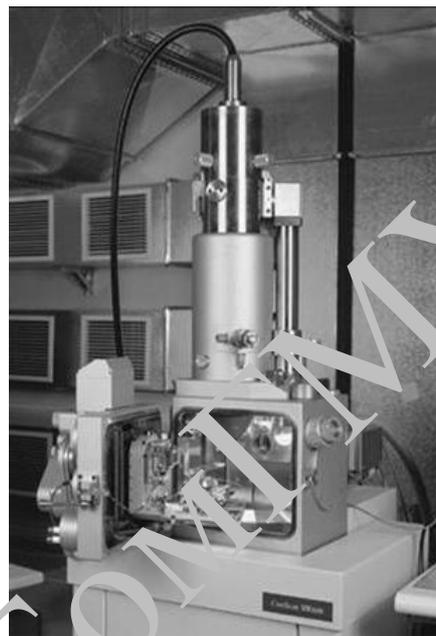
Принцип электронной микроскопии

В качестве источника электронных лучей применяют электронную пушку, основой которой служит вольфрамовая нить, нагретая электрическим током. Прохождение электронных лучей в вакууме через электромагнитные поля, создаваемые электромагнитными линзами, концентрирует и направляет электронный поток. Это обеспечивает резкое повышение разрешающей способности электронного микроскопа до 0,2 нм и увеличение до 10^9 .

Электронноскопические препараты. Их готовят из очищенных и концентрированных вирусосодержащих взвесей или ультратонких срезов тканей, зараженных вирусами. Ультратонкие срезы получают из исследуемого материала (кусочки инфицированной вирусами ткани), который фиксируют в специальном фиксаторе, обезвоживают, заливают в эпоксидные смолы, режут стеклянными или алмазными ножами на ультратомах. Вирусные объекты наносят на специальные пленки-подложки, помещенные на опорные сеточки. Пленки-подложки должны быть очень тонкими (не более 30 нм толщины), прозрачными и прочными. Хорошо себя зарекомендовали коллоидно-угольные пленки. Их наносят на поддерживающие сеточки из меди с многочисленными отверстиями. *Далее препараты обрабатывают различными способами, которые приведены ниже.*

Методы напыления металлами (теневой обработки). Применяют для получения контрастных препаратов. Пары тяжелых металлов (золота, платины, урана и др.), образующиеся в специальном приборе в условиях вакуума и высокой температуры, направляют под острым углом на вирусосодержащий препарат. Вирусы оказываются покрытыми тонким слоем металла, за исключением стороны, закрытой объектом, что создает эффект отбрасываемой тени. Метод напыления *создает объемность изображения, позволяет хорошо изучить форму и величину вирионов, строение их поверхности.* Но внутренняя структура вируса недоступна для наблюдения.

Метод негативного контрастирования. Наиболее часто применяемый метод получения контрастных препаратов, позволяющих *выявлять как строение поверхности вирионов, так и их внутреннюю структуру.* Принцип этого



**Рисунок 75 —
Электронный микроскоп**

метода основан на том, что при обработке препарата солями тяжелых металлов создается более плотный слой, не пропускающий электроны, на котором хорошо видны более электроннопрозрачные исследуемые объекты. **Метод позитивного контрастирования**, при котором соли тяжелых металлов, соединяясь с веществами, входящими в состав вирионов, как бы «окрашивают» их, в результате чего на светлом фоне видны более темные вирусные структуры.

Метод ультратонких срезов в сочетании с негативным контрастированием. Является наилучшим для изучения тонкого строения вирионов и изучения этапов взаимодействия вирусов с клеткой, но в то же время он наиболее сложен. Исследуемые кусочки инфицированной ткани или другого вируссодержащего материала фиксируют в специальном фиксаторе (например, осмиевом). Обезживают путем последовательного помещения в спирты возрастающей крепости. Заливают образцы специальной пластмассой, после полимеризации которой образуются твердые прозрачные блоки. Из блоков готовят ультратонкие срезы толщиной 10–20 нм на специальном микротоме. Полученные срезы контрастируют, помещая, например, в раствор фосфорно-вольфрамовой кислоты. Приготовленные препараты изучают в просвечивающем электронном микроскопе, разрешающая способность которого достигает 0,2–0,3 нм. Изображение препарата наблюдают на флуоресцирующем экране электронного микроскопа и фотографируют специальные фотопластинки, с которых получают отпечатки.

Сканирующая электронная микроскопия. Осуществляется с помощью сканирующего (растрового) электронного микроскопа, в котором тонкий пучок электронов быстро перемещается по исследуемому объекту, то есть сканирует его поверхность. В результате возникает излучение вторичных электронов, которое, проходя через катодно-лучевую трубку, преобразуется в объемное изображение объекта на флуоресцирующем экране (процесс сходен с формированием телевизионного изображения).

Сканирующая микроскопия позволяет получать трехмерные изображения вирионов (предварительно препарат напыляют металлами), различать детали строения их поверхности, но не выявляет их внутреннюю структуру. Разрешающая способность сканирующего микроскопа равна 7–20 нм. На рисунке 76 в качестве примера представлен вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) в сканирующем электронном микроскопе.

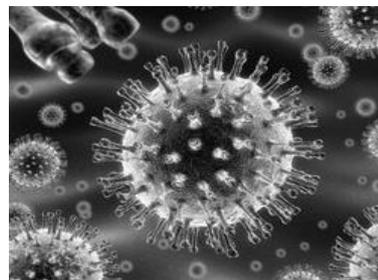


Рисунок 76 —
ВИЧ в сканирующем ЭМ

СВЕТОВАЯ МИКРОСКОПИЯ (ВИРУСОСКОПИЯ)

В световом микроскопе можно увидеть *крупные вирусы*, размеры которых находятся в пределах разрешающей способности микроскопа — не ме-

нее 0,2 мкм, а также внутриклеточные включения в пораженных вирусом тканях. Крупные вирусы, например, поксвирусы, и включения обнаруживаются с помощью специальных методов окраски в фазовом контрасте, в темном поле зрения; применяют люминесцентную микроскопию. Как правило, эти исследования дают лишь предварительные результаты, не избавляя от использования других методов лабораторной диагностики вирусных инфекций. Крупные вирусы выявляют путем окраски по Морозову (серебрением).

Для выявления внутриклеточных включений готовят гистологические срезы из пораженных тканей, препараты-мазки или отпечатки. Обычно препараты окрашивают по Романовскому — Гимзе, иногда другими методами. Наибольшее практическое значение имеет обнаружение включений Бабеша-Негри в нервных клетках головного мозга при бешенстве (рисунок 77). Для этой цели препараты окрашивают по Туревичу, Муромцеву и др.

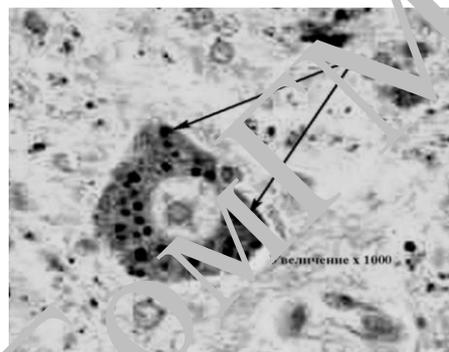


Рисунок 77 — Тельца Бабеша — Негри в срезе гиппокампа при бешенстве (обозначены стрелками)

Люминесцентная микроскопия. Один из высокочувствительных методов световой микроскопии, находит довольно широкое применение в вирусологии. Препараты, приготовленные из материалов, содержащих крупные вирусы, внутриклеточные включения, окрашивают растворами флюорохромных красителей. Используют флюоресцеин, аурамин, акридиновый оранжевый и другие. При люминесцентной микроскопии в УФ-свете окрашенные акридиновым оранжевым скопления РНК-геномных вирусов и образуемые ими включения видны как светящиеся красные гранулы на фоне бледно-зеленой цитоплазмы клеток; ДНК-геномные вирусы дают изумрудно-зеленое свечение.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИРУСНОГО АНТИГЕНА

Иммунологические реакции применяют для определения вирусного АГ в исследуемом материале с помощью известных диагностических противовирусных сывороток.

Реакция иммунофлюоресценции

Прямой вариант РИФ. Ее сущность состоит в обработке препаратов-отпечатков из патологического материала иммунной сывороткой, содержащей специфические АТ к определенному вирусу и меченой флюорохромом. Если вирусный АГ и меченая сыворотка, содержащая специфические к данному вирусу АТ, соответствуют друг другу, то происходит обра-

зование комплекса «антиген – антитело», и он обнаруживается с помощью люминесцентного микроскопа по специфическому свечению.

Непрямой вариант РИФ. На исследуемый материал наносится специфическая сыворотка (например, кроличья), АТ которой связываются с вирусным антигеном, находящимся в материале. Затем наслаивается меченая флюорохромом (антикроличья), содержащая АТ против гамма-глобулинов кролика. Преимущество непрямого варианта РИФ состоит в потребности лишь одного вида меченых АТ.

Успешное применение РИФ для прямой детекции вируса в клиническом материале возможно лишь в случае содержания в нем достаточно большого числа инфицированных клеток и незначительной контаминации микроорганизмами, которые могут давать неспецифическое свечение.

Иммуноферментный анализ. Принцип метода состоит в обнаружении АГ специфическими АТ, мечеными ферментами (пероксидазой хрена, или щелочной фосфатазой). Фермент проявляют различными субстратами, дающими с ним характерное окрашивание, которое определяют фотометрическим методом. ИФА может применяться как в прямом, так и непрямом варианте. Поскольку с помощью ИФА можно измерять растворимые АГ, то не требуется наличия интактных клеток в образце и таким образом могут использоваться различные виды клинического материала. Другое важное преимущество метода ИФА — возможность количественного определения АГ, что позволяет применять его для оценки клинического течения болезни и эффективности химиотерапии.

Радиоиммунный анализ. Метод основан на использовании меченых радиоизотопом АТ. При взаимодействии вирусного АГ со специфическим АТ образуется меченый иммунный комплекс антиген-антитело. Результат определяют с помощью гамма-счетчиков.

Реакция не прямой (пассивной) гемагглютинации — РНГА (РПГА)

Вирусный АГ выявляют с помощью эритроцитарного антительного диагностикума, который представляет собой эритроциты с адсорбированными на них АТ. В положительном случае эритроциты с адсорбированными на них АТ взаимодействуют с вирусным АГ, в результате эритроциты склеиваются и выпадают на дно ячейки планшета в виде фестончатого осадка – «зонтик». При отрицательной реакции эритроциты оседают в виде «пуговики».

Реакция торможения гемагглютинации. Ее принцип состоит в том, что специфические противовирусные АТ (известная иммунная сыворотка), взаимодействуя с вирусным АГ, нейтрализуют его, в результате чего вирус теряет свойство агглютинировать (склеивать) эритроциты, т. е. происходит торможение гемагглютинации (положительный результат реакции на планшете в виде «пуговики»), рисунок 78. При отрицательной реакции гемагглютинация не тормозится, эритроциты склеиваются и выпадают на дно ячейки планшета в виде фестончатого осадка – «зонтик».

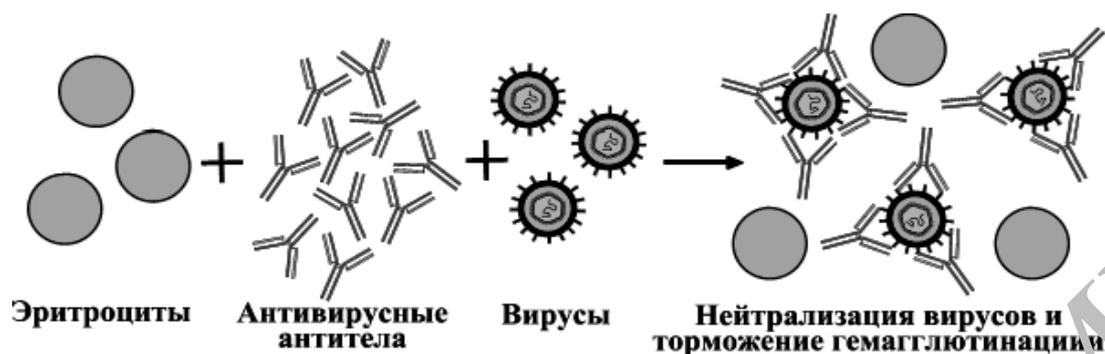


Рисунок 78 — Схема реакции торможения гемагглютинации

Высокая специфичность РТГА позволяет с помощью известных иммунных сывороток определять вид, тип вирусов. РТГА применяют для диагностики многих вирусных болезней, возбудители которых (вирусы гриппа, кори, краснухи, клещевого энцефалита и др.) могут агглютинировать эритроциты различных животных и птиц.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Применяют для обнаружения генома вируса. К таким методам относятся молекулярная гибридизация и ПЦР, которые благодаря своей специфичности и чувствительности в последние годы получили широкое распространение.

Молекулярная гибридизация нуклеиновых кислот. Метод основан на гибридизации комплементарных нитей ДНК или РНК с образованием двунитевых структур и на выявлении их с помощью специальных ДНК-или РНК-зондов, меченых, например, радиоактивным изотопом или флуоресцентной меткой. Этот метод применяют в первую очередь для определения в клиническом материале персистирующих вирусов, при латентной вирусной инфекции, для выявления вирусов, которые не удается культивировать в культуре клеток.

Полимеразная цепная реакция. Суть метода заключается в многократном копировании (амплификации) фрагментов генома возбудителя, что приводит к быстрому накоплению определенной вирусспецифической последовательности ДНК в достаточном количестве, необходимом для последующей детекции. Метод высокоспецифичен и очень чувствителен. Он позволяет обнаружить несколько копий вирусной ДНК в исследуемом материале. С помощью ПЦР возможно определение не только нуклеотидной последовательности ДНК, но также РНК и, следовательно, выявление РНК-вирусов (для этого применяют ПЦР с предварительным этапом обратной транскрипции (RT-PCR)). В последние годы ПЦР находит все более широкое применение для диагностики и мониторинга вирусных инфекций (вирусы гепатитов, герпеса, папилломы и др.). Метод особенно ценен для диагностики латентных вирусных инфекций и ВИЧ-инфекции.

Методы экспресс-диагностики наиболее распространенных вирусных инфекций приведены в таблице 27.

Таблица 27 — Методы экспресс-диагностики распространенных вирусных инфекций

| Вирусы | Инфекция | Материал для исследования | Сроки забора материала | Методы экспресс-диагностики |
|---------------------------------------|--|--|--|--|
| Гриппа | Грипп | Отделяемое носоглотки | Первые 3–5 дней болезни | РИФ, ИФА, РИА, ЭМ, ПЦР |
| Парагриппа, РС-вирус | ОРВИ | Отделяемое носоглотки | Первые 3–5 дней болезни | РИФ, ИФА, МГ, ПЦР |
| Аденовирусы | Аденовирусная инфекция | Отделяемое носоглотки, конъюнктивы, кровь, фекалии | Первые 7 дней болезни | РИФ, ИФА, РИА, ЭМ, МГ, ПЦР |
| Риновирусы | ОРВИ | Отделяемое носоглотки | Первые 5–7 дней болезни | РИФ, ПЦР |
| Простого герпеса | Herpes simplex | Содержимое везикулы | В теч. первых 1–2 дней после появления сыпи | РИФ, ИФА, ИЭМ, МГ, ПЦР |
| Ветряной оспы и опоясывающего герпеса | Ветряная оспа, опоясывающий герпес | Содержимое везикулы | В течение первых 7 дней после появления сыпи | РИФ, ИФА, ИЭМ, МГ, ПЦР |
| Цитомегалии | Цитомегаловирусная инфекция | Моча, кровь | В течение всего периода заболевания | ЭМ, микроскопия окрашенных мазков-отпечатков, РИФ, выявление IgM, ИФА, МГ, ПЦР |
| Энтеровирусы | Серозный менингит, СРВИ, ОК-В, полиомиелит | Фекалии, кровь, отделяемое носоглотки | Весь период заболевания | РИФ, РИА, МГ, ПЦР |
| Ротавирусы | Острый гастроэнтерит | Фекалии | Первые 3–5 дней болезни | ЭМ, ИЭМ, ИФА, РИА, МГ, ПЦР |
| Гепатита А | Гепатит А | Фекалии, кровь | Первые 7–10 дней болезни | ИЭМ, ИФА, РИА, выявление IgM |
| Гепатита В | Гепатит В | Кровь, биопсийный материал | Весь период заболевания | ИФА, РИА, МГ, ПЦР |
| Гепатита С | Гепатит С | Кровь, биопсийный материал | Весь период заболевания | ИФА, МГ, ПЦР |
| ВИЧ | ВИЧ-инфекция | Кровь | Весь период заболевания | ИФА, ИБ, ПЦР |

Примечание. ИБ — иммуноблотинг; ОРВИ — острые респираторные вирусные инфекции; ОКВИ — остр. кишечные вир. инфекции.

В большинстве случаев концентрация вируса в клиническом материале недостаточна для прямого обнаружения вируса или АГ и тогда приходится прибегать к вирусологическому методу.

Вирусологический метод

Вирусологический метод основан на выделении и культивировании вирусов на чувствительных тест-объектах (курином эмбрионе, культуре клеток, лабораторных животных) с последующей идентификацией выделенного вируса.

Культивируют вирусы только на чувствительных **живых** клетках, т. е. вирусы — облигатные внутриклеточные паразиты, не способные размножаться ни в одной из бесклеточных сред.

Вирусологический метод должен проводиться *в специализированной вирусологической лаборатории*. Это трудоемкий процесс, требующий продолжительного времени.

Показания к культивированию и выделению вируса могут быть следующими:

1. Определение циркулирующего среди населения типа и варианта вируса при обследовании спорадических случаев инфекции, вспышек и эпидемий (например, для идентификации «дикого» и вакцинного штамма вируса полиомиелита, сероварианта вируса гриппа и т. д.).

2. Случаи, когда диагноз важен для точных эпидемиологических мероприятий, например, лабораторное подтверждение диагнозов гриппа, полиомиелита, арбовирусных энцефалитов является сигналом для проведения иммунизации населения или мероприятий по борьбе с переносчиками инфекций.

3. Инфекции, вызванные новыми типами вирусов, например, возбудителями ранее неизвестных вирусных заболеваний или новыми серовариантами вируса гриппа.

4. Необходимость подтверждения предварительного микробиологического диагноза, установленного, например, по данным электронно-микроскопического исследования.

5. Случаи, когда с помощью иммунологического метода не удается отличить один вирус от другого или при сходстве клинических проявлений заболевания.

6. Индикация вирусов в объектах окружающей среды.

Следует учесть, что выделение вируса не всегда является доказательством этиологии инфекции, поскольку возможны персистирование вирусов в организме человека или возникновение смешанной инфекции, вызванной двумя вирусами.

Для культивирования вирусов используются следующие чувствительные живые объекты:

- куриные эмбрионы;
- культуры клеток;
- лабораторные животные.

ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ ВИРУСОЛОГИЧЕСКОГО МЕТОДА

1. Забор исследуемого материала.
2. Выбор по принципу цитотропизма чувствительной тест-системы, определение ее жизнеспособности.
3. Заражение выбранной тест-системы.
4. Индикация вируса на основании обнаружения соответствующих феноменов в чувствительных системах, нуклеиновой кислоты вируса, АГ.
5. Идентификация и титрование вируса проводится на основании:
 - определения АГ вируса с помощью известных диагностических сывороток, используя иммунологические реакции (РН, РТГА, РИФ, ИФА, РПГА, РСК и др.);
 - различных вариантов цитопатического действия вируса;
 - патогистологического исследования органов и тканей.

Схема вирусологического метода представлена на рисунке 79.



Рисунок 79 — Схема вирусологического метода диагностики

Примечание. Титрование и идентификация вируса проводится с использованием одного и того же феномена.

ВЫДЕЛЕНИЕ ВИРУСОВ В КУРИНЫХ ЭМБРИОНАХ И МЕТОДЫ ИХ ИНДИКАЦИИ

Для заражения отбирают 7–12 дневные куриные эмбрионы. Перед заражением определяют жизнеспособность эмбриона — при овоскопии живые эмбрионы подвижны (видна подвижная тень), с выраженными кровеносными сосудами.

Заражают куриные эмбрионы в асептических условиях, стерильными инструментами, предварительно обработав скорлупу над воздушным пространством йодом и спиртом. Может быть *открытый* (исследуемый материал вводят, вскрывая скорлупу) или *закрытый* (без вскрытия скорлупы) способы заражения эмбрионов.

Методы заражения куриных эмбрионов могут быть различны: нанесение вируса на хорионаллантоисную оболочку, в амниотическую и аллантоисную полости, в желточный мешок и др. Выбор метода заражения зависит от биологических свойств изучаемого вируса.

Схема строения куриного эмбриона и способы его заражения представлены на рисунке 80.

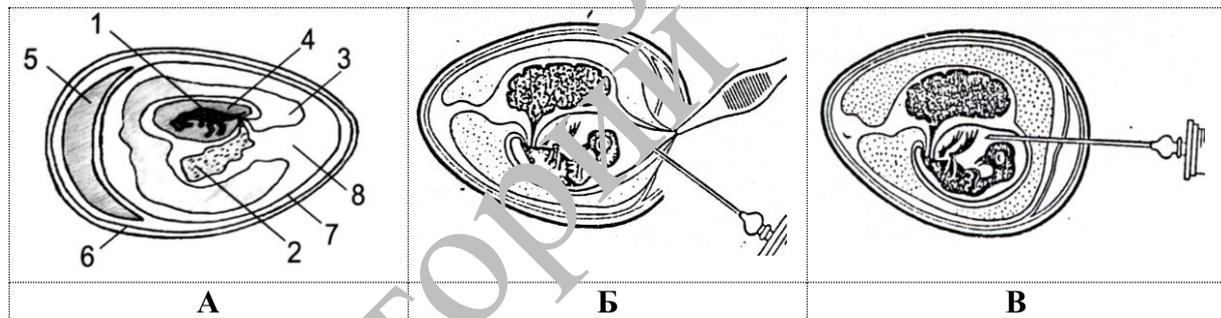


Рисунок 80 — Схема строения куриного эмбриона и способы его заражения:

А — структурные элементы куриного эмбриона:

- 1 — зародыш; 2 — желточный мешок; 3 — аллантоисная полость;
4 — амниотическая полость; 5 — воздушный мешок; 6 — внутренняя выстилка скорлупы;
7 — хорион аллантоисная оболочка; 8 — внеэмбриональная полость;

Б — заражение куриного эмбриона в амнион открытым способом;

В — заражение куриного эмбриона в амнион закрытым способом

Индикация вируса в курином эмбрионе производится по следующим феноменам:

- отставание в развитии, гибель эмбриона;
- изменение оболочек эмбриона (например, «бляшки» на хорионаллантоисной оболочке);
- положительная реакция гемагглютинации с аллантоисной или амниотической жидкостью.

Реакция гемагглютинации. РГА основана на способности некоторых вирусов за счет гемагглютининов склеивать (агглютинировать) эритроциты определенных видов животных или птиц (рисунок 81).

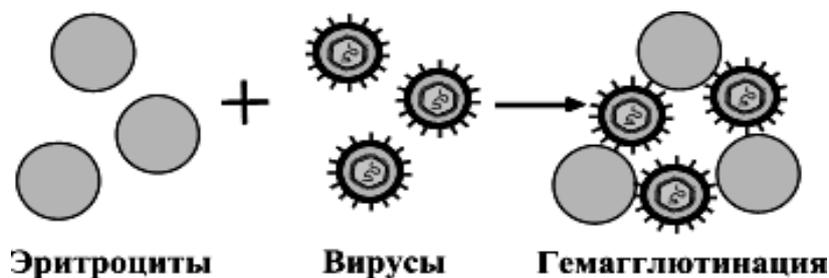


Рисунок 81 — Схема реакции гемагглютинации

При помощи РГА можно определить наличие гемагглютинирующего вируса в исследуемом материале (индикация вируса), а также его титр. *Титром вируса* называют его наибольшее разведение, при котором еще наблюдается агглютинация эритроцитов. При *положительной реакции* (наличии вируса) происходит гемагглютинация, т.е. эритроциты склеиваются и выпадают на дно ячейки планшета в виде фестончатого осадка — «зонтик». При *отрицательной реакции* (отсутствии вируса) эритроциты не склеиваются — результат на планшете в виде «пуговки», рисунок 82.

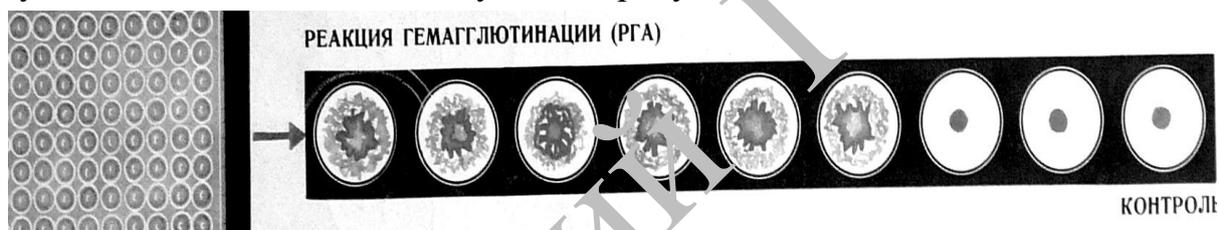


Рисунок 82 — Постановка и счет реакции гемагглютинации

ВЫДЕЛЕНИЕ ВИРУСОВ В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК И МЕТОДЫ ИХ ИНДИКАЦИИ

Культуры клеток имеют первостепенное значение в вирусологии. Они широко применяются при диагностике вирусных инфекций, в производстве вакцин, незаменимы при проведении научных исследований в области вирусологии. Клеточные культуры являются наиболее универсальным способом выделения и культивирования вирусов, так как к подавляющему большинству вирусов удается подобрать высокочувствительные культуры, на которых данный вирус способен размножаться. Большим удобством в работе является наличие видимого цитопатического действия вирусов на клетки, благодаря которому легко обнаруживать присутствие вируса непосредственно в зараженной клеточной культуре.

Культуры клеток создают наиболее стандартные условия для культивирования вирусов по сравнению с другими методами, так как состоят из однородных клеток, находящихся в сходных условиях, и не содержат антител и неспецифических ингибиторов. Из недостатков следует отметить трудоемкость приготовления клеточных культур, а также нередкую зараженность тканей, из которых готовят первичные культуры клеток, латентными вирусами, а также контаминацию этих клеток микоплазмами, бактериями, грибами.

По происхождению культуры клеток подразделяются на эмбриональные, опухолевые и из взрослых организмов; **по морфогенезу** — на фибробластные, эпителиальные и др.

Наибольшее распространение в вирусологии имеют **однослойные культуры клеток**, которые можно разделить на *первичные* (первично трипсинизированные), *перевиваемые* и *полуперевиваемые* (диплоидные), характеристика которых представлена в таблице 28.

Таблица 28 — Культуры клеток

| Культуры клеток | Характеристика |
|------------------------------|---|
| Первичные культуры клеток | Это клетки различного типа (почек обезьян, почек эмбриона человека, амниона человека, куриных эмбрионов). Их получают из тканей после механического измельчения, обработки протеолитическими ферментами и стандартизации количества клеток. Срок жизни таких культур ограничен ≤ 10 пересевами. Лишь отдельные группы клеток первичных культур могут сохранить способность к росту и размножению. При многократных пересевах они дают начало перевиваемым культурам клеток |
| Перевиваемые культуры клеток | <i>Перевиваемые клеточные линии</i> характеризуются потенциальным бессмертием и гетероплоидным набором хромосом. Наиболее часто применяются такие линии перевиваемых клеток, как Vero — из почек зеленой марышки, RH — из почки человека; ВНК-21 — из почек одно-дневных сирийских хомяков; ПМС — из почки морской свинки; из опухолевых клеток злокачественных новообразований (HeLa — из карциномы шейки матки, Нер-2 — из карциномы гортани) и др. <i>Полуперевиваемые культуры клеток (диплоидные)</i> — клетки одного типа, способные <i>in vitro</i> поддерживать максимум 50 пассажей, сохраняя при этом свою исходную морфологию и диплоидный набор хромосом. Применяют для выделения и культивирования вирусов. Но поистине незаменимыми они оказались в производстве вирусных вакцин |

Для успешного получения клеточных культур и последующего размножения в них вирусов культивируемые клетки должны постоянно находиться в сбалансированной физиологической среде, содержащей все необходимые компоненты для их жизнедеятельности и размножения. Для этой цели используют *солевые растворы и вирусологические питательные среды*.

Питательные среды и солевые растворы для клеточных культур

Солевые растворы имеют состав солей, качественно и количественно приближающийся к составу жидкостей животного организма. Основные назначения этих солей — создание буферности и изотоничности среды и обеспечение наиболее важными неорганическими ионами. Солевые растворы обеспечивают переживание клеток вне организма; они служат для промывания тканей и клеток в процессе приготовления клеточных культур; являются основой для приготовления вирусологических питательных сред. Наиболее употребительными солевыми растворами являются растворы

Хенкса и Эрла.

Питательные среды

Питательные среды необходимы для обеспечения жизнедеятельности культивируемых клеток. **По назначению** они делятся на ростовые (или среды для размножения) и поддерживающие. В *ростовых питательных средах* должно содержаться больше питательных веществ, обеспечивающих активное размножение клеток и формирование монослоя. Их используют до заражения культуры клеток вирусами. *Поддерживающие среды* применяют после заражения культуры клеток вирусами, они содержат меньше питательных компонентов и обеспечивают переживание клеток в уже сформированном монослое в период размножения в них вирусов.

Питательные среды для клеточных культур в большинстве случаев готовят на основе сбалансированного солевого раствора (например, раствора Хенкса). Неотъемлемый компонент большинства ростовых сред — сыворотка крови животных (телячья, бычья, лошадиная), без наличия 5–20 % которой размножение клеток и формирование монослоя не происходит. В состав поддерживающих сред сыворотка не входит. С целью предотвращения возможного роста микроорганизмов в питательные среды вносят антибиотики.

Различают следующие питательные среды:

1. Естественные питательные среды (применяют редко) — готовят на основе солевых растворов Хенкса и Эрла, к которым добавляют сыворотку, амниотическую жидкость, эмбриональный экстракт.

2. Ферментативные гидролизаты белковых веществ (чаще применяют ферментативный гидролизат лактальбумина, который получают из молока).

3. Синтетические питательные среды (широкое применение). Их готовят из определенного набора химических веществ, они имеют постоянный и точно известный состав. *Чаще всего применяют среду 199 (Паркера)*, содержащую 61 компонент, и *среду Чгла*, в состав которой входит около 30 компонентов.

Выделение вирусов

Для заражения используются чувствительные к данному вирусу культуры клеток с хорошо развитым *сплошным монослоем*, находящиеся в пробирках, плоских флаконах-матрацах, или лунках планшета (рисунок 83).



Рисунок 83 — Флаконы, планшеты для культур клеток

Перед заражением клеток ростовую питательную среду удаляют и в каждую лунку планшета или флакон вносят по 0,1–0,2 мл взвеси испытуемого материала, предварительно обработанного антибиотиками. После 30–60 мин контакта вируса с клетками удаляют избыток материала, вносят во флакон поддерживающую среду и оставляют в термостате до выявления признаков репродукции вирусов. При заражении вирусами клеточных культур можно получать различные видимые проявления действия вируса (*феномены индикации вируса в культуре клеток*).

Феномены, позволяющие выявить вирус в культуре клеток

1. Цитопатическое действие (цпф-эффект) — (ЦПД или ЦПЭ) — изменения клеток под влиянием размножающегося в них вируса. Предполагается, что основной причиной ЦПД является нарушение метаболизма клетки.

ЦПД может быть следующих основных типов (рисунок 84):

а) кругло- или мелкоклеточная дегенерация; полная или частичная дегенерация клеток монослоя. При резкой дегенерации клеточный монослой гибнет: клетки отслаиваются от стекла и свободно плавают в культуральной жидкости в виде бесструктурных зерен, лизируются.

б) симпластообразование – под действием вирусов клетки сливаются между собой с образованием гигантских многоядерных клеток — симпластов (или синтициев);

в) образование внутриядерных или цитоплазматических включений;

г) пролиферативный тип изменений — возникает в результате трансформации клеток при заражении клеточной культуры онкогенными вирусами, под действием которых клетки начинают безудержно делиться и располагаются не монослоем, а растут беспорядочно в несколько слоев.

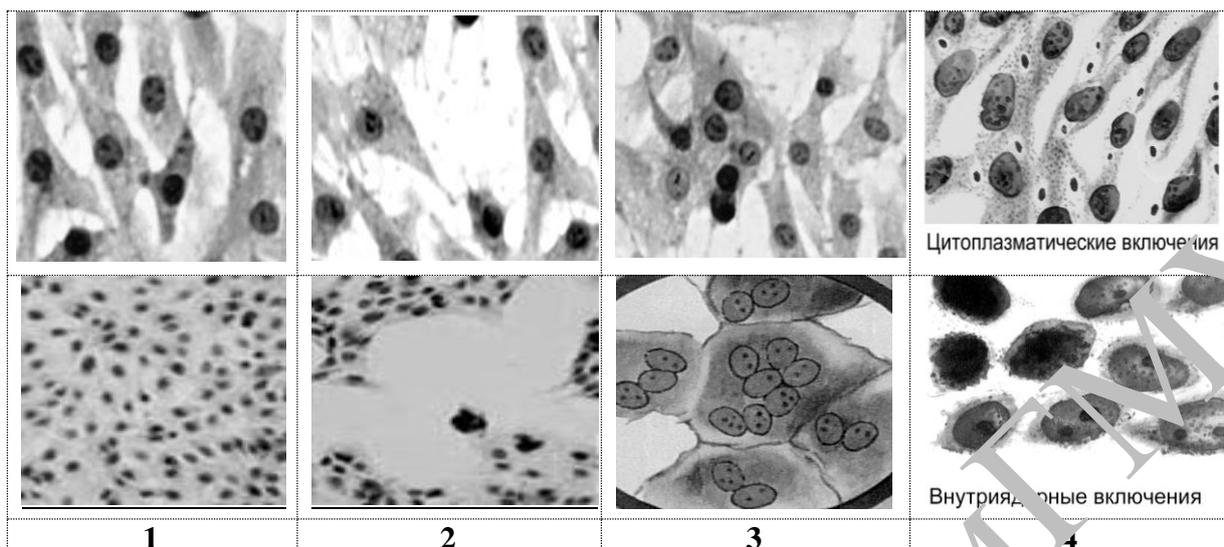


Рисунок 84 — Монослой культуры клеток до заражения и варианты ЦПД вируса:

- 1 — сплошной монослой клеток до заражения вирусом (нормальные клетки);
- 2 — дегенерация клеток монослоя; 3 — симпластообразование; 4 — включения

Цитопатическое действие различных вирусов на клеточные культуры (даже если брать различные типы культур) обладает определенной специфичностью. Родственные вирусы обычно дают цитопатическую реакцию сходного типа, эффект действия отдаленных по свойствам вирусов часто различен, поэтому *по типу ЦПД нередко можно судить о семействе или роде, к которым относится исследуемый вирус.* Так, для энтеровирусов (вирусы полиомиелита, Коксаки, ЕСНО) характерен ЦПД в виде однородной мелкозернистой деструкции клеток, клетки приобретают округленную форму, располагаются довольно равномерно. Для цитопатического действия аденовирусов типичным является преобразование клеточного слоя в скопления мелких, округлых клеток, расположенных в виде гроздьев винограда. Парагриппозные вирусы, респираторно-синциальный, вирусы кори и паротита дают цитопатический эффект в виде образования симпластов. При репродукции герпесвирусов клетки округлой формы диффузно располагаются по всему монослою.

2. Феномен гемадсорбции (РГадс)

Принцип метода

Контакт клеток с эритроцитами приводит к адсорбции эритроцитов на поверхности клеток, пораженных *вирусом с гемагглютинирующими свойствами.* Эффект можно увидеть при малом увеличении микроскопа (рисунок 85).

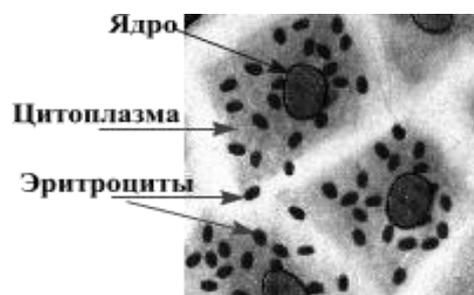


Рисунок 85 — Положительный результат реакции гемадсорбции

При положительной гемадсорбции скопления эритроцитов на клетках могут быть весьма характерными. Вирус гриппа дает гемадсорбцию остров-

кового типа; парагриппозные вирусы — диффузного; для поксвирусов характерным является расположение эритроцитов вокруг клеток в виде венчика или ожерелья. РГАде наиболее часто применяется для раннего обнаружения парагриппозных вирусов в носоглоточных смывах больных.

3. Феномен интерференции

Принцип метода: феномен интерференции используется для обнаружения вирусов, не дающих отчетливого ЦПД в культуре клеток. Исследуемую культуру повторно заражают вирусом, регулярно вызывающим ЦПД. Индикаторным является ВВС — вирус везикулярного стоматита. При наличии в исследуемом материале нецитопатогенного вируса ЦПД у индикаторного ВВС также будет отсутствовать (клетка «занята» исследуемым вирусом).

4. Образование бляшек — феномен Дюльбекко

Принцип метода

Монослой клеток после заражения вирусом заливают слоем полужидкого агара, в состав которого входит питательная среда и краситель нейтральный красный.

В тех зонах монослоя, где происходит размножение цитопатического вируса, группы разрушенных клеток не закисляют среду, выглядят на розовом фоне прозрачными пятнами, которые называют бляшками (рисунок 86).

Одним из первых были получены бляшки вирусов полиомиелита в однослойной культуре клеток (Дюльбекко, 1962)

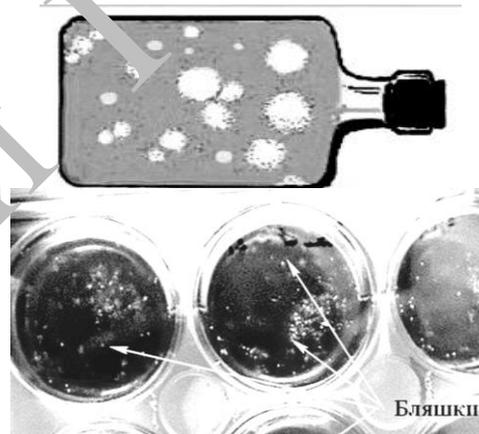


Рисунок 86 — Образование бляшек

Способности к образованию бляшек в настоящее время обнаружена, кроме вирусов полиомиелита, и у многих других вирусов: ЕСНО, энцефалита, гриппа, кори и ряда других.

При изучении морфологии бляшек установлено, что разные вирусы, как правило, образуют бляшки, отличающиеся по величине, форме, характеру краев, по срокам появления и другим свойствам, что может быть использовано для предварительной идентификации вируса.

5. Цветная проба

Метод «цветной пробы» также является методом оценки размножения вирусов в культуре ткани. При размножении в питательной среде с индикатором незараженной культуры клеток (т. е. при отсутствии вируса) вследствие образования кислых продуктов метаболизма среда изменяет свой цвет (первоначальный красный цвет изменяется на желтый). При репродукции вируса нормальный метаболизм клеток нарушается, кислые продукты не образуются, среда сохраняет исходный (красный) цвет.

ВЫДЕЛЕНИЕ ВИРУСОВ НА ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Используют преимущественно новорожденных белых мышей, хомяков, морских свинок, крысят. *Восприимчивые к изучаемым вирусам животные называются экспериментальной моделью.* В качестве модели отбирают животных, обладающих видовой чувствительностью и высокой восприимчивостью к определенным вирусам. Взятые в опыт животные должны быть одного вида, определенного возраста и содержаться в одинаковых условиях.

Необходимым условием успешного выделения вирусов является использование животных, свободных от латентных (скрытых) инфекций вирусной, бактериальной или протозойной этиологии, которые нередко встречаются у многих видов лабораторных животных. К таким заболеваниям относятся вирусные пневмонии, вирусный энцефаломиелит белых мышей, протозойный энцефалит многих млекопитающих и птиц и др.

Для вирусологической работы чаще всего используют так называемые «чистые линии» экспериментальных животных. Они обладают однотипной наследственностью, имеют минимальное число латентных инфекций, обладают высокой восприимчивостью к вирусам.

Заражение животных проводится *по принципу цитотропизма вируса:* пневмотропные вирусы вводятся интраназально, нейротропные — интрацеребрально, дерматотропные — на кожу.

Индикация вируса на лабораторных животных основана на проявлении признаков заболевания у животных, их гибели, патоморфологических изменениях в тканях и органах, а также на положительной реакции гемагглютинации с экстрактами из органов.

На лабораторных животных проводят титрование вирусов, ставят реакцию нейтрализации; животных используют для получения вирусных вакцин, диагностических, противовирусных сывороток.

ОБЩАЯ СХЕМА ИДЕНТИФИКАЦИИ ВЫДЕЛЕННОГО ВИРУСА

Выделение, титрование и идентификация вируса проводятся с использованием одного и того же феномена.

I этап. Титрование выделенного вируса; выбор рабочей дозы

Титр вируса — максимальное разведение вирусосодержащего материала, в котором еще наблюдается ожидаемый эффект (ЦПД, РГА, гибель животного и др.).

II этап. Идентификация выделенного вируса

Существенное значение для идентификации вирусов (до рода, вида, серотипа) имеет изучение их *антигенного строения*, которое проводится в *РН вирусов* с соответствующими диагностическими сыворотками.

РН проводят путем введения смеси *антиген* (выделенный вирус в рабочей дозе) — *антитело* (диагностическая противовирусная сыворотка) в чувствительные тест-объекты (культуры клеток, куриные эмбрионы, в организм лабораторных животных). Сущность этой реакции состоит в том, что после обработки гомологичными АТ вирус утрачивает свою биологическую активность (нейтрализуется) и клетка хозяина развивается так же, как и неинфицированная вирусом.

III этап. Учет результатов

При отсутствии у тест-объектов повреждающего действия вирусов говорят о нейтрализующем действии иммунной сыворотки и, следовательно, о специфичности взаимодействия комплекса «антиген-антитело». Об этом судят, например, применяя культуры клеток, по отсутствию цитопатического действия вируса (рисунок 87), подавлению бляшкообразования, реакции торможения гемадсорбции (РТГадс.), результатам РТГА, РСК, отсутствию изменений при заражении куриных эмбрионов, выживаемости чувствительных животных (рисунок 88).

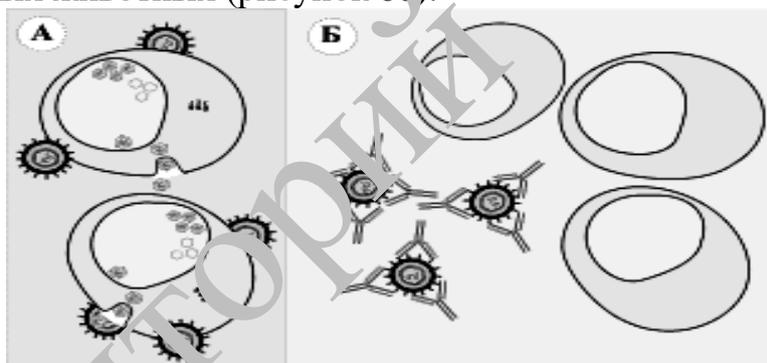


Рисунок 87 — Схематическая реакция нейтрализации вирусов в культуре клеток:

А — цитопатическое действие в результате размножения вирусов;

Б — ЦПД отсутствует в результате нейтрализации вирусов антителами

Вид (тип) вируса определяется по нейтрализации специфического эффекта вируса соответствующей иммунной сывороткой.

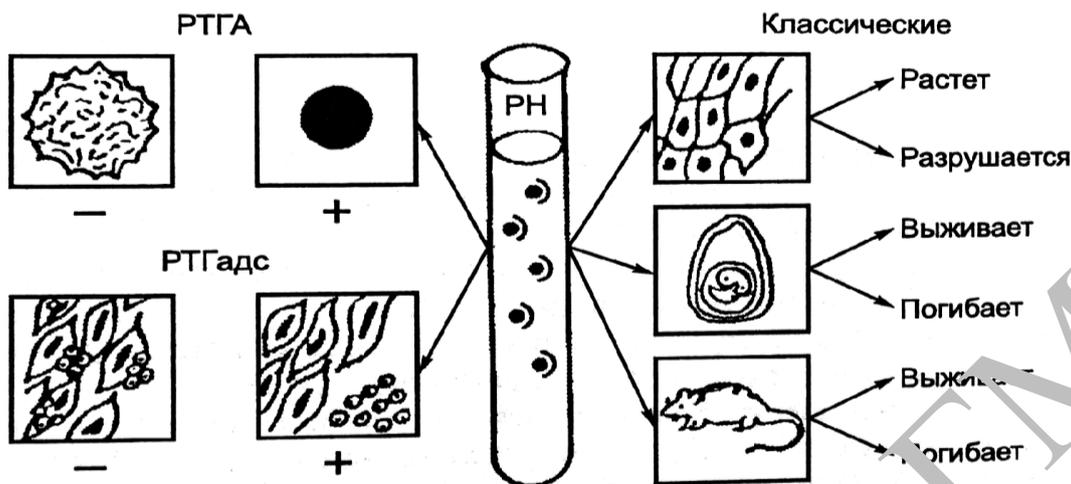


Рисунок 88 — Реакция нейтрализации для идентификации вирусов:
«+» — положительная, «-» — отрицательная

Серологический метод

Серологическая диагностика основана на выявлении в сыворотке крови пациента специфических к антигенам вирионов антител.

В серодиагностике вирусных инфекций используют подход «парных сывороток», что позволяет определить нарастание титра (прирост АТ) за определенный период заболевания с помощью набора вирусных диагностикумов. **Парные сыворотки** — две сыворотки, взятые от одного больного в начале заболевания и через 1–3 недели. *Диагностически значимым считают нарастание титра АТ в 4 и более раз* в период развития острой фазы заболевания.

Известно, что большинство специфических АТ относятся к классам IgG и IgM, которые синтезируются в различное время инфекционного процесса. При этом **IgM антитела** относятся к ранним, и реакции, используемые для их определения (например, ИФА или непрямая РИФ), применяются для ранней диагностики (достаточно исследовать одну сыворотку). Обнаружение АТ класса IgM будет свидетельствовать об острой инфекции. **Антитела класса IgG** появляются на поздних стадиях заболевания, сохраняются в течение длительного времени и свидетельствуют о перенесенном заболевании.

ОСНОВНЫЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ В СЕРОДИАГНОСТИКЕ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Реакция нейтрализации. РН ставится с разными разведениями исследуемой сыворотки и постоянной дозой известного вируса для обнаружения неизвестных противовирусных АТ. Антитела иммунной сыворотки способны нейтрализовать повреждающее действие вирусов на чувствительные клетки и ткани, что связано с блокадой вирусов АТ, т. е. их нейтрализацией.

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА). Ее принцип состоит в том, что при контакте вируса с гомологичными АТ происходит связывание АТ с гемагглютинидами вируса, в результате чего вирус теряет свойство агглютинировать (склеивать) эритроциты. Для этого исследуемую сыворотку пациента в разных разведениях смешивают с одинаковыми дозами известного вируса и после контакта ко всем смесям добавляют суспензию эритроцитов. При максимальном разведении исследуемой сыворотки, когда еще подавляется гемагглютинация, и определяется титр АТ в этой сыворотке. Положительный результат реакции на планшете в виде «пуговики»; при отрицательной реакции гемагглютинация не тормозится, эритроциты склеиваются и выпадают на дно ячейки планшета в виде фестончатого осадка – «зонтик». РТГА выявляет АТ в сыворотке больного, синтезируемые против гемагглютининов вирусов (например, вируса гриппа).

Реакция непрямой гемагглютинации. Ее принцип состоит в том, что эритроциты, на которых предварительно адсорбированы вирусы, приобретают способность агглютинироваться в присутствии гомологичных АТ, содержащихся в исследуемой сыворотке крови пациента. РНГА позволяет обнаруживать и титровать АТ. *За титр АТ в сыворотке крови* принимают наибольшее ее разведение, которое вызывает агглютинацию эритроцитов.

Реакция иммунофлюоресценции. Для выявления АТ в сыворотке крови пациента используют *непрямой метод РИФ*. Для этого на стекло наносят взвесь эталонного микрорганализма, после фиксации его на стекле и промывания наносят капли сыворотки крови в определенных разведениях. После промывки наслаивают люминесцирующую сыворотку (сыворотку, меченую флюорохромом, например, ФИТЦ) против глобулиновой фракции сывороточных белков крови человека, т. е. АГС сыворотку. Образующийся комплекс «антиген – антитело» выявляют при люминесцентной микроскопии: при освещении ультрафиолетовыми (сине-фиолетовыми) лучами он дает ярко-зеленое свечение.

Радиоиммунный анализ — высокочувствительный метод, основанный на реакции «антиген – антитело» с применением АГ или АТ, меченных радионуклидом (^{125}J , ^{14}C , ^3H , ^{51}Cr и др.). После их взаимодействия отделяют образовавшийся радиоактивный иммунный комплекс и определяют его радиоактивность в соответствующем счетчике (бета- или гамма-излучение): интенсивность излучения прямо пропорциональна количеству связавшихся молекул АГ и АТ.

Иммуноферментный анализ более информативен, поскольку позволяет выявить IgM и IgG по отдельности, что позволяет делать определенные выводы о динамике инфекционного процесса или состоянии реконвалесценции. Для выявления АТ известный АГ сорбируют на твердом субстрате (например, пластиковых микропланшетах) и вносят различные раз-

ведения сыворотки пациента. После соответствующей инкубации несвязавшиеся АТ удаляют, вносят антисыворотку к Ig человека (АГС), меченую ферментом (например, пероксидазой). Далее повторяют процедуру инкубирования и отмывания несвязанных АТ и вносят какой-либо хромогенный субстрат (чувствительный к действию фермента). Субстрат расщепляется ферментом и изменяется цвет продукта реакции. Количество окрашенного продукта измеряется спектрофотометрическим способом.

Метод ИФА в модификации «захвата» иммуноглобулинов класса М

Принцип метода: на полистироловом планшете сорбируют вначале антитела к IgM (антииммуноглобулины М), затем добавляется исследуемая сыворотка. Если в ней есть IgM, они будут связываться с анти-IgM, затем добавляется специфический вирусный АГ. Система промывается, и к ней добавляются антивирусные АТ, меченые ферментом (пероксидазой). Если произошло взаимодействие всех четырех компонентов системы, возникает четырехслойный «сэндвич» (рисунок 89). Для обнаружения этого комплекса в луночки добавляют субстрат для фермента. Под влиянием фермента он разрушается и образуется окрашенный продукт. Интенсивность окраски можно измерить количественно с помощью спектрофотометра.

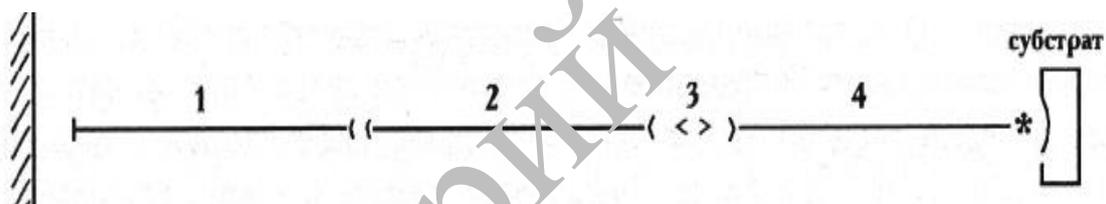


Рисунок 89 — Схема иммуноферментного анализа в модификации «захвата» IgM:

1 — антииммуноглобулины М; 2 — IgM (в сыворотке пациента);

3 — вирусный антиген, 4 — антивирусные антитела, меченые ферментом

Иммуноблоттинг

В отличие от обычного ИФА, иммуноблоттинг не только выявляет АТ по принципу «да-нет», но *позволяет дифференцировать отдельные АТ к различным белкам микроорганизмов.*

Принцип метода. АГ возбудителя разделяют с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, затем переносят их из геля на нитроцеллюлозную мембрану. При этом различные антигены фиксируются раздельно в различных участках полоски. Затем на эту полоску наносят сыворотку больного и дальнейшие исследования проводят по схеме обычного ИФА: отмывают от несвязавшихся антител больного и наносят сыворотку против иммуноглобулинов человека (антиглобулиновую сыворотку), меченую ферментом. Образовавшийся на полоске комплекс «антиген + антитело больного + антитело против Ig человека» выявляют добавлением хромогенного субстрата, изменяющего окраску под действием фермента. Положительные реакции выглядят в виде ИФА-пятен (англ. *blot* – пятно), каждое из которых соответствует дискретной паре «антиген – антитело».

Иммуноблоттинг используют как диагностический метод (подтверждающий тест), например, при ВИЧ-инфекции (рисунок 90).

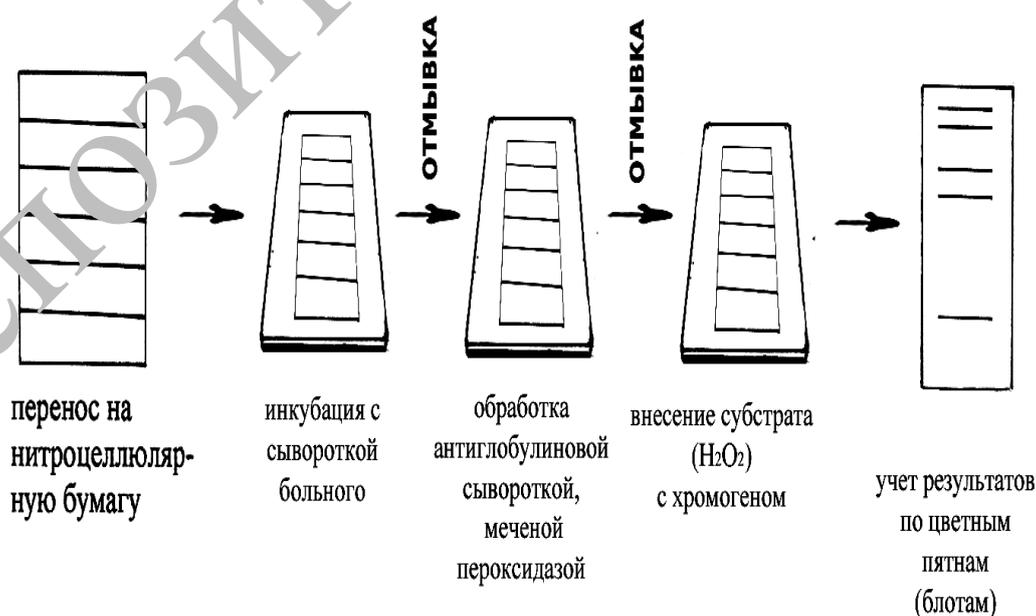
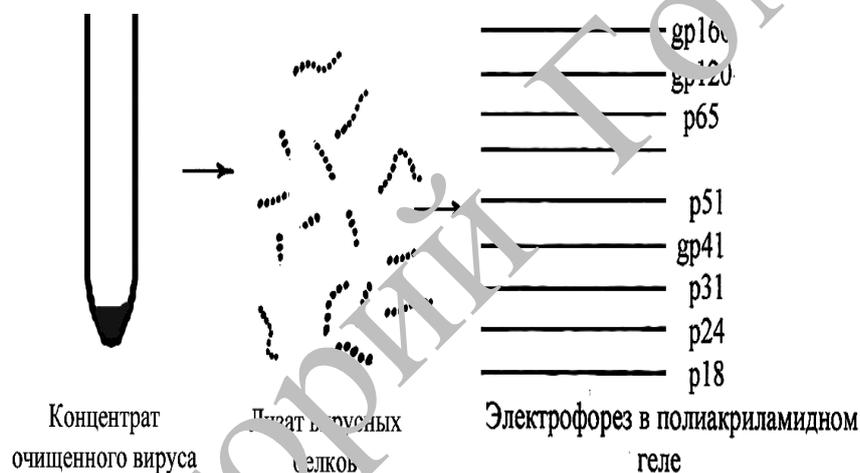


Рисунок 90 — Схема иммуноблоттинга при ВИЧ-инфекции

РАЗДЕЛ 5

МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ МИКОЗОВ

Широкое распространение грибковых заболеваний (*микозов*), разнообразные проявления, нередкое возникновение их вследствие нерациональной антибактериальной терапии (кандидозы), также на фоне врожденных иммунодефицитных состояний привлекают к себе внимание практических врачей разных специальностей. Следовательно, изложение необходимых сведений о методах микробиологических исследований, применяемых в диагностике микозов, является актуальным.

В настоящее время описано более 400 болезнетворных грибов — возбудителей зарегистрированных случаев микозов. Список болезнетворных грибов постоянно пополняется с описанием новых случаев.

По степени опасности для населения большинство болезнетворных грибов относится к IV группе патогенности (условно-патогенные), *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* и некоторые представители рода *Aspergillus* — к III группе, а возбудители ряда эндемических микозов (гистоплазмоза, бластомикоза, кокцидиомикоза) — ко II группе.

Классификация микозов

В зависимости от локализации поражения микозы подразделяются на следующие основные группы:

- поверхностные микозы (кератомикозы) — поражаются лишь волосы и роговой слой эпидермиса;
- дерматомикозы (эпидермомикозы) — поражаются эпидермис, волосы, ногти;
- подкожные, или субкутанные, микозы — поражается кожа, подкожная клетчатка, фасции, иногда — кости;
- системные, или глубокие, микозы — характеризуются поражением внутренних органов, частой диссеминацией с вовлечением в патологический процесс различных тканей;
- оппортунистические микозы, возбудителями которых являются условно-патогенные грибы.

Отдельно выделяют микотоксикозы — пищевые отравления человека и животных, вызываемые микотоксинами грибов, образующимися при их росте на пищевых продуктах и пищевом сырье.

Клиническая классификация микозов (представлена в таблице 29).

Таблица 29 — Клиническая классификация микозов

| Возбудители микозов | Названия грибов | Вызываемые болезни |
|--|--|-----------------------------|
| Возбудители поверхностных микозов (кератомикозов) | <i>Malassezia furfur</i> | Пестрый лишай |
| | <i>Exophiala werneckii</i> | Черный лишай |
| | <i>Piedraia hortae</i> | Черная пьедра |
| | <i>Trichosporon beigeli</i> | Белая пьедра |
| Возбудители дерматомикозов | <i>Антропофильные дерматофиты:</i> | |
| | <i>Epidermophyton floccosum</i> | Эпидермофития |
| | <i>Microsporum audouinii</i> , <i>Microsporum ferrugineum</i> | Микроспория |
| | <i>Trichophyton tonsurans</i> , <i>Trichophyton violaceum</i> | Трихофития |
| | <i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i> | Эпидермофития стоп, ногтей |
| | <i>Trichophyton rubrum</i> | Руброфития |
| | <i>Trichophyton schoenleinii</i> | Фавус |
| | <i>Зоофильные дерматофиты:</i> | |
| | <i>Microsporum canis</i> , <i>M. gypseum</i> | Микроспория |
| | <i>Trichophyton verrucosum</i> , <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>mentagrophytes</i> , <i>T. equinum</i> | Трихофития |
| | <i>Геофильные дерматофиты:</i> | |
| | <i>Microsporum Cookei</i> , <i>M. gypseum</i> , <i>M. nanum</i> | Микроспория |
| | Возбудители подкожных, или субкутанных, микозов | <i>Sporothrix schenckii</i> |
| <i>Fonsecaea compacta</i> , <i>Fonsecaea pedrosoi</i> | | Хромобластомикоз |
| <i>Exophiala</i> , <i>Phialophora</i> , <i>Wangiella</i> , <i>Bipolaris</i> | | Феогифомикоз |
| <i>Aureobasidium</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Curvularia</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Pseudallescheria boydii</i> , <i>Madurella mycetozoa</i> , <i>Phialophora cyanescens</i> и др. | | Мицетома |
| | | |
| Возбудители системных, или глубоких, микозов | <i>Histoplasma capsulatum</i> | Гистоплазмоз |
| | <i>Blastomyces dermatitidis</i> | Бластомикоз |
| | <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> | Паракокцидиоидомикоз |
| | <i>Coccidioides immitis</i> | Кокцидиоидомикоз |
| | <i>Cryptococcus neoformans</i> | Криптококкоз |
| Возбудители оппортунистических микозов | <i>Candida</i> spp. | Кандидоз |
| | <i>Mucor</i> spp., <i>Rhizopus</i> spp. | Зигомикоз |
| | <i>Aspergillus</i> spp. | Аспергиллез |
| | <i>Penicillium</i> spp. | Пенициллез |
| Возбудители микотоксикозов | <i>Fusarium</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp., <i>Penicillium</i> spp. и др. | Микотоксикоз |

Общая характеристика методов микробиологической диагностики микозов

Материал для исследования: свежие развившиеся поражения, где больше элементов гриба. Пораженные волосы берут пинцетом, элементы гладкой кожи, чешуйки — скальпелем. При поражении ногтей производят соскоб скальпелем или отрезают кусочек ногтя ножницами. Соскобы со слизистой оболочки выполняются шпателем. Все остальные материалы — как обычно (при бактериологическом исследовании).

Микроскопический метод исследования

Это один из основных методов выявления возбудителей микозов. Для проведения микроскопии готовят неокрашенные (нативные) препараты или окрашенные препараты.

Если исследуемый материал жидкий, то из него готовят неокрашенный мазок для микроскопии в просветляющих жидкостях: смесь спирта с глицерином. *Плотный исследуемый материал* предварительно *подвергают просветлению* (для визуализации структур возбудителя во фрагментах кожи и ее придатков (ногти, волосы) отделяемом очагов поражения) — обрабатывают 10–20 % раствором щелочи (чаще КОН). Чтобы сконцентрировать материал, его центрифугируют.

Нативные препараты: каплю исследуемого материала наносят на предметное стекло, добавляют раствор Люголя или спиртовой раствор глицерина, накрывают покровным стеклом и исследуют в фазово-контрастном или световом микроскопе.

Окрашенные препараты: готовят обычным способом мазки; фиксация только жидким фиксатором; окрашивают по Граму, Цилю — Нельсену, Романовскому — Гимзе или специальными методами.

При *микроскопии плесневых грибов* учитывают структуру мицелия, т. е. особенности строения гиф, их цвет, септированность, также особенности строения конидий и спор, и т. д. При *микроскопии дрожжевых грибов* выявляют клетки дрожжей, почкующиеся клетки.

Гистологическое исследование

Такое же, как в бактериологии (мазки-отпечатки, срезы), однако изучают не только морфологию гриба, но и реакцию ткани на возбудителя, глубину поражения. Может использоваться метод прямой иммунофлюоресценции с гистологическими препаратами.

Микологический метод

Включает все этапы культурального метода (**выделение чистой культуры грибов на искусственных питательных средах и идентификацию**).

Для удаления бактериальной флоры исследуемый материал предварительно обрабатывают антибиотиками широкого спектра действия.

Для культивирования грибов используют разные среды. Стандартной в микологии является *глюкозо-пептонная среда Сабуро*. В зависимости от вида гриба можно использовать картофельно-морковный агар, рисовый или кукурузный агар, среду Чапека — Докса, сусло-агар и другие среды. Для подавления роста грибов-контаминантов используют специальные среды, содержащие антибиотики и циклогексимид. Грибы культивируют в аэробных условиях при температуре 25–30 °С; грибы же, вызывающие заболевания человека, могут культивироваться при температуре 37° С.

Видимый рост колоний на плотных питательных средах обычно наблюдается через несколько дней. При определении рода и вида грибов учитывают скорость роста и созревания колонии, ее цвет, форму и тип поверхности, а также ряд дополнительных признаков. Колонии дрожжевых и некоторых плесневых грибов вырастают уже на вторые-третьи сутки, однако культуру возбудителей наиболее распространенных микозов обычно получают не ранее недели. Для дрожжевых грибов характерны гладкие колонии. При образовании спор поверхность колонии изменяется (мучнистая, порошковатая, бархатистая и др.). Цвет колоний зависит от пигментов и различается у разных видов болезнетворных грибов. При росте многоклеточных грибов на питательных средах различают *субстратный*, или погружной, *мицелий* (врастающий в субстрат) и *воздушный мицелий* (большая часть его находится над питательной средой). Примеры культур грибов с разными типами колоний представлены на рисунке 91.

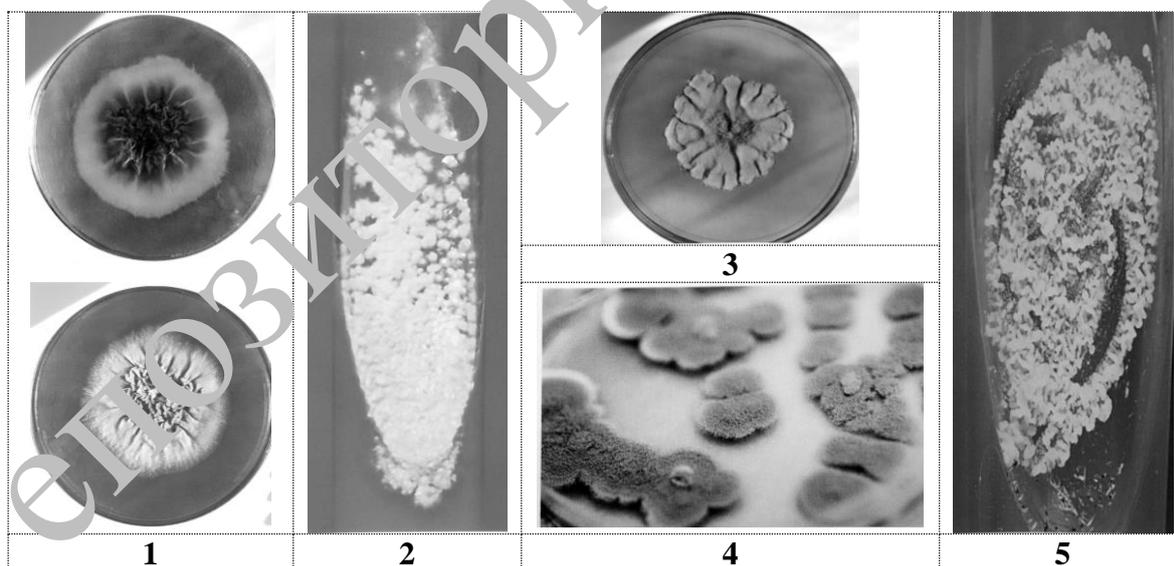


Рисунок 91 — Культуры грибов (примеры разных типов колоний):

- 1 — *Trichophyton rubrum* (пигмент различных оттенков в центре и на периферии колоний);
 2 — *Histoplasma capsulatum*; 3 — *Madurella grisea*;
 4 — *Penicillium*; 5 — *Paracoccidioides brasiliensis*

Идентификацию выделенной культуры возбудителя проводят по морфологическим, культуральным и биохимическим признакам. Для определения

биохимической активности некоторых грибов (например, *Candida spp.*) можно использовать панели биохимической дифференцировки (планшеты) с последующей идентификацией в автоматическом микробиологическом анализаторе.

Иммунологический метод (серологический и аллергологический)

Серологический метод. Проводят для выявления специфических АТ и АГ, но результаты могут быть сомнительными из-за перекрестного реагирования с АГ различных грибов. Серодиагностика оппортунистических микозов (например, кандидоза) малоэффективна в связи с распространенным присутствием грибов. При проведении серодиагностики микоза нарастание титра АТ в сыворотке крови пациента отражает прогрессирование инфекции. Применяют такие же иммунологические реакции, как в бактериологии (ИФА, РСК, реакция латекс-агглютинации, иммунопреципитации и др.).

Аллергологический метод. Проводят кожные пробы при некоторых микозах. Ранее были одним из популярных методов диагностики микозов, однако их неспецифичность ограничивает диагностическую ценность. В настоящее время их чаще используют для анализа иммунных популяций при эпидемиологических исследованиях.

Молекулярно-генетический метод

Данный метод позволяет провести идентификацию патогенных грибов на основе определения нуклеиновых кислот. Применяют *полимеразную цепную реакцию*, которая используется для диагностики главным образом системных микозов. Также используют метод ДНК-гибридизации.

Лабораторная диагностика микозов

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ПОВЕРХНОСТНЫХ МИКОЗОВ И ДЕРМАТОФИТИЙ

Широко распространенными поверхностными микозами являются *отрубевидный (пестрый, разноцветный) лишай (кератомикоз)* и *поверхностный кандидоз*. Кроме того, очень многие грибы могут быть возбудителями инфекций ногтей — *онихомикозов*. Среди всех групп микозов достаточно часто встречаются и дерматофитии.

Кератомикозы — грибковые заболевания, характеризующиеся поражением поверхностных отделов рогового слоя эпидермиса и поверхности волоса. В наших регионах среди кератомикозов распространен отрубевидный (пестрый, разноцветный) лишай (возбудитель — *Malassezia furfur*).

Дерматофитии (эпидермофития, микроспория, трихофития) — грибковые заболевания, возбудителями которых являются грибы дерматофиты из родов *Epidermophyton*, *Microsporum* и *Trichophyton*. Из 40 с лишним известных видов дерматофитов в наших условиях наиболее часто встречаются три — *Trichophyton rubrum* (ведущий возбудитель *онихомикоза*, дер-

матофитии кистей и стоп), *Trichophyton mentagrophytes var. interdigitale* (часто вызывает эпидермофитию стоп) и *Microsporum canis* (причина микроспории волосистой части головы). *Trichophyton schoenleinii* вызывает заболевание *фавус* (паршу), при котором поражается кожа, волосы и ногти.

Для лабораторной диагностики применяют следующие методы:

Микроскопический метод

Патологический материал: чешуйки кожи, волосы, фрагменты ногтевой пластинки, перед микроскопированием подвергают «просветлению», т. е. обработке 10–15 % раствором щелочи КОН. Это позволяет растворить роговые структуры и оставить в поле зрения только массы гриба.

Препараты окрашивают метиленовым синим, гематоксилин-эозином. Диагноз дерматофитии подтверждается, если в препарате видны нити мицелия или цепочки артроконидий. При отрубевидном (разноцветном) лишаяе, микроскопируя чешуйки кожи, обработанные щелочью, выявляются короткие изогнутые гифы и дрожжеподобные почкующиеся клетки; истинный мицелий отсутствует.

В лабораторной диагностике дерматофитии волосистой части головы учитывают также расположение элементов гриба относительно стержня волоса. Если споры расположены снаружи (характерно для видов *Microsporum*), такой тип поражения называется *эктотрикс*, а если внутри — то *эндотрикс* (характерно для видов *Trichophyton*). Поражение волос дерматофитами представлено на рисунке 92.

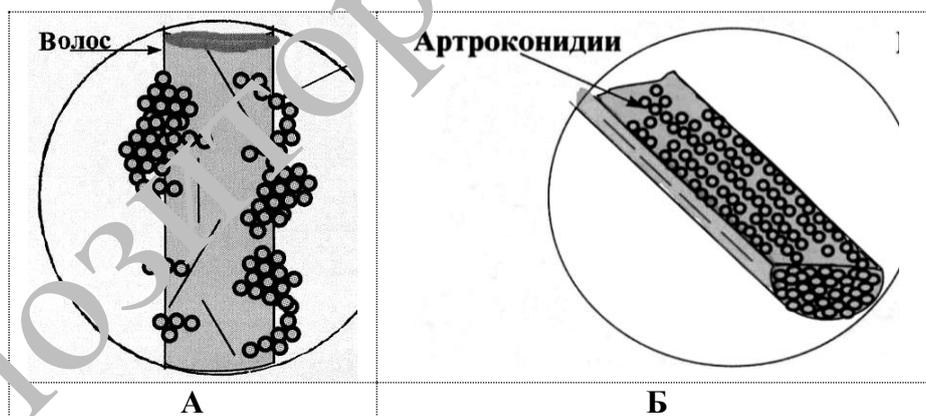


Рисунок 92 — Поражения волос дерматофитами по типу *эктотрикс* (А) и *эндотрикс* (Б)

Окончательная идентификация дерматофитов проводится по морфологическим особенностям.

Для быстрой диагностики некоторых микозов, например, микроспории и разноцветного лишая, используется также люминесцентная лампа Вуда, в лучах которой элементы гриба в очагах микроспории дают светло-зеленое свечение, а очаги разноцветного лишая дают желтое свечение.

Микологический метод. Делают посев на питательные среды — Сабуро, сусло-агар и др. На среде Сабуро колонии диаметром 10–30 мм вырастают за 7–14 дней. Для медленно растущих дерматофитов характерны колонии гладкие или кожистые, для прочих дерматофитов — пушистые и шерстистые, а при обильном образовании конидий — порошковатые (*T. mentagrophytes*). Как правило, дерматофиты образуют белые или светлые колонии. Часть дерматофитов (*T. rubrum*, *T. violaceum*, *T. mentanii*) имеет темно-красный или бордовый цвет колонии. Возбудитель разноцветного лишая *Malassezia furfur* через неделю после посева дает рост в виде белых сливкообразных колоний. При необходимости проводятся дополнительные тесты (уреазная активность, образование пигмента на специальных средах, потребность в питательных добавках и др.).

Серологический метод. Определяют АТ в сыворотке крови с помощью ИФА, РСК, РП, РНГА.

Аллергологическая диагностика. Иногда ставят кожно-аллергические пробы с аллергенами из грибов.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ПОДКОЖНЫХ МИКОЗОВ

Подкожными микозами называются грибковые инфекции, которые поражают дерму и более глубокие мягкие ткани, лежащие под кожей, а иногда — и костную ткань. Эти инфекции объединяет механизм инфицирования — так называемая *травматическая имплантация возбудителя*. К группе подкожных микозов относят хромомикоз (возбудители — *Fonsecaea compacta*, *Cladophialophora carrionii*, *Fonsecaea pedrosoi* и др.), споротрихоз (возбудитель — диморфный гриб *Sporothrix schenckii*), мицетому (чаще всего вызывает *Pseudallescheria boydii*) и феогифомикоз (вызывается разными грибами из родов *Eophiala*, *Fhialophora*, *Wangiella* и др.).

В лабораторной диагностике **споротрихоза** основным является культуральный метод. *S. schenckii* растет быстро, на кровяном агаре при 37 °С плесневая форма переходит в дрожжевую. В гистопатологических препаратах обнаруживают так называемые «астероидные» тельца. Разработаны также серологические способы диагностики заболевания (латекс-агглютинация, иммунодиффузия).

Характерным для **хромомикоза** является наличие в патологическом материале и гистопатологических препаратах так называемых склеротических телец (5–12 мкм в диаметре) — особой переходной формы гриба. Культура возбудителей вырастает медленно, колония созревает не ранее 2 недель. Идентификацию проводят по особенностям морфологии конидий.

Для лабораторной диагностики **мицетомы** исследуют гранулы из свищей или биопсийный материал, применяют микроскопию и культуральный метод.

В лабораторной диагностике **феогифомикоза** используется микроскопия и идентификация выделенной культуры возбудителей.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ГЛУБОКИХ МИКОЗОВ

К **глубоким микозам** относят инфекции, при которых возбудитель проникает во внутренние органы и ткани. *Системные* глубокие микозы развиваются в пределах одной системы органов (пищеварительной, дыхательной, мочевыделительной) — там, где находятся входные ворота инфекции. При *диссеминированных* глубоких микозах внутренние органы поражаются в результате гематогенного распространения возбудителя.

Все глубокие микозы **условно делятся на две большие группы**: *респираторные эндемические* (вызываются особой группой возбудителей) и *оппортунистические* (вызываются множеством условно-патогенных грибов).

Респираторные эндемические микозы — группа инфекций с аэрогенным механизмом заражения, обусловленных вдыханием конидий диморфных грибов, обитающих в почве определенных географических зон.

Возбудителями респираторных эндемических микозов являются *Histoplasma capsulatum* (вызывает гистоплазмоз), *Blastomyces dermatitidis* (бластомикоз), *Paracoccidioides brasiliensis* (паракокцидиоидоз), *Coccidioides immitis* (кокцидиоидоз).

Глубокие оппортунистические микозы — группа инфекций, вызванных условно-патогенными грибами (например, из родов *Candida*, *Aspergillus*, *Mucor* и др.), развивающихся на фоне тяжелого иммунодефицита и приводящих к поражению висцеральных органов и глубоко лежащих тканей.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА РЕСПИРАТОРНЫХ ЭНДЕМИЧЕСКИХ МИКОЗОВ

Материалом для исследования служат мокрота, кровь, спинномозговая жидкость, моча, биопсийный материал.

Все эти грибы представляют явную биологическую угрозу и относятся к II группе патогенности микроорганизмов. Работа с ними проводится в специально оборудованных лабораториях 3 уровня биобезопасности с обученным персоналом соответствующей квалификации. Несмотря на то, что инфекции, вызванные данными возбудителями, не передаются от человека к человеку, возможно первичное поражение кожи при работе с культурами.

Микроскопический метод. В патологическом материале, просветленном щелочью, мазках, окрашенных по Романовскому — Гимзе, гистологических препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином или серебрением, определяют тканевые (дрожжеподобные) формы возбудителя. При гистоплазмозе изучают только окрашенные препараты (мазки крови, биоптаты).

Микологический метод. В идентификации грибковых культур диагностическим признаком является образование дрожжевых колоний при 37° С на простой или обогащенной среде. Например, возбудитель гистоплазмоза *H. capsulatum* — диморфный гриб, вырастающий в мицелиальной

форме на среде Сабуро при комнатной температуре. В течение 2–3 недель появляются пушистые светлые колонии, иногда с рыжеватой или коричневой обратной стороной. При микроскопии выделенной культуры виден мицелий с грушевидными или округлыми микроконидиями и толстостенными макроконидиями, покрытыми бугорками. При пересеве на кровяной агар при 37 °С грибок переходит в дрожжевую форму и дает светлые гладкие колонии. В микропреparate культуры видны почкующиеся клетки.

В **серологической диагностике** используются реакции иммуноферментного анализа, связывания комплемента, латекс-агглютинации и иммунодиффузии. Иммуноферментный анализ, тесты латекс-агглютинации и иммунопреципитации позволяют выявить ранние антитела класса IgM.

Кожно-аллергические пробы имеют ограниченное применение в диагностике эндемических микозов, за исключением кокцидиомикоза. Положительные кожные тесты сохраняются после перенесенной инфекции при том, что в эндемических зонах инфицирована значительная часть населения. Иногда для диагностики гистоплазмоза ставят кожно-аллергические пробы с гистоплазмином.

В настоящее время разработаны более совершенные и чувствительные **молекулярные методы идентификации возбудителей** — ПЦР, ДНК-гибридизация, и тесты по определению грибковых экзоантигенов.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА КАНДИДОЗА

Возбудителями кандидоза является около 20 видов дрожжевых грибов из рода *Candida*. В микробиологической диагностике кандидоза в настоящее время ориентируются на выделение его главного (более 80% всех случаев) возбудителя *Candida albicans*.

Микроскопический метод. При кандидозе в мазках из клинического материала, окрашенных по Граму, выявляют почкующиеся дрожжевые клетки и псевдомицелий (рисунок 93). Псевдомицелий — вытянутые, а не округлые видоизмененные дрожжевые клетки. От настоящего мицелия они отличаются тем, что не имеют истинных перегородок — септ. В месте перегородки псевдогифы сужены, здесь же обычно имеются скопления почкующихся клеток.

Микологический (культуральный) метод. Посевы клинического материала проводят на агар Сабуро, сусло-агар. *Candida spp.* в среднем через 48 ч дают типичные выпуклые, гладкие, белые или кремовые колонии. Идентификацию возбудителя проводят по морфологическим, культуральным и биохимическим признакам. Разработаны тесты быстрой идентифи-

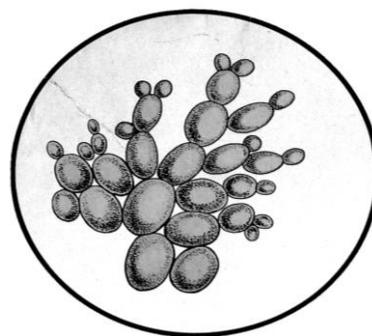


Рисунок 93 — Кандиды в мазке: почкующиеся дрожжевые клетки и псевдомицелий

кации: применение хромогенных сред для культивирования (*C. albicans* образует на них пигментированные колонии), быстрое (в течение 1 ч) определение АГ и ферментов возбудителя. Идентификация видов кандид ведётся преимущественно по спектру сахаролитической активности. Для этого выпущены специальные тест-системы и панели для автоматических анализаторов. В последние годы в диагностике глубокого кандидоза используется также *газожидкостная хроматография*, определяющая компоненты клеточной стенки грибов (D-маннозу и арабинитол).

Иммунологический метод. Серодиагностика кандидоза малоэффективна в связи с распространённым носительством грибов рода *Candida*. Серодиагностику проводят обычно при висцеральных формах кандидоза. Используют ИФА, РНГА и другие реакции, которые проводят с парными сыворотками. Иммунодиагностика включает определение маннанового АГ в крови (латекс-агглютинация) при диссеминированном кандидозе.

Молекулярно-генетический метод. ПЦР используется только в диагностике глубоких форм кандидоза в связи с распространённым носительством *Candida*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии: учеб. пособие / под ред. А. А. Воробьева, А. С. Быкова. — М.: Медицинское информационное агентство, 2003. — 236 с.

2. Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности и гельминтами: Санитарные правила 17–129. — Минск: Министерство здравоохранения Республики Беларусь, 2000.

3. *Борисов, Л. Б.* Медицинская микробиология, вирусология, иммунология: учебник / Л. Б. Борисов. — М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2005. — 736 с.

4. *Букринская, А. Г.* Вирусология: учебное пособие / А. Г. Букринская. — М.: Медицина, 1986. — 336 с.

5. *Воробьев, А. А.* Медицинская и санитарная микробиология: учеб. пособие / А. А. Воробьев, Ю. С. Кривошеин, В. П. Ширококов. — М.: Издательский центр «Академия», 2003. — 464 с.

6. *Ермакова, Т. С.* Методы и системы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам / Т. С. Ермакова, Л. П. Титов // НИИ ЭМ — практическому здравоохранению: Информационно-аналитический ежеквартальный бюллетень. — Выпуск 4 (5). — Минск, 2000. — С. 70–78.

7. *Жаворонок, С. В.* Иммуноферментный анализ: учеб.-метод. пособие / С. В. Жаворонок, Д. В. Тапальский. — Гомель, 2004. — 30 с.

8. Иммунология и аллергология (цветной атлас): учебное пособие для студ. мед. вузов / под ред. А. А. Воробьева, А. С. Быкова, А. В. Караулова. — М.: Практическая медицина, 2006. — 288 с.

9. *Коротяев, А. И.* Медицинская микробиология, иммунология и вирусология: учебник для мед. вузов / А. И. Коротяев, С. А. Бабичев; под ред. А. И. Коротяева. — СПб.: СпецЛит, 2002. — 591 с.

10. *Лопухов, Л. В.* Полимеразная цепная реакция в клинической микробиологической диагностике / Л. В. Лопухов, М. В. Эйдельштейн // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. — 2000. — Т. 2, № 3. — С. 96–106.

11. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: учебник для студ. мед. вузов: в 2 т. / под ред. В. В. Зверева, М. Н. Бойченко. — Т. 2. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. — 480 с.

12. Медицинская микология с основами микотоксикологии: учебное пособие для высш. учеб. заведений / Д. В. Леонтьев [и др.]; под ред. Д. В. Леонтьева, А. Г. Сербина. — Харьков: Запорож. нац. мед. университет; Колорит, 2010. — 141 с.

13. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: учебник для студ. мед. вузов / под ред. А. А. Воробьева. — М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2012. — 704 с.

14. Медицинская микробиология: учебное пособие / под ред. А. М. Корлюка и В. Б. Сбойчакова. — СПб, 2002. — 267 с.

15. Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: инструкция по применению: утв. Министерством здравоохранения Респ. Беларусь, 20.12.2008 г., № 226-1208 – Минск: Министерство здравоохранения Республики Беларусь, 2009.

16. *Новиков, Д. К.* Медицинская иммунология: учебное пособие / Д. К. Новиков. — Минск: Выш. шк., 2005. — 301 с.

17. *Носик, Н. Н.* Лабораторная диагностика вирусных инфекций / Н. Н. Носик, В. М. Стаханова // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. — № 2. — Т. 2. — 2002. — С. 70–78.

18. Общая медицинская вирусология: учеб. пособие / Н. С. Горячкина [и др.]; под ред. Н. С. Горячкиной, Л. И. Кафарской. — Ростов/н/Д: Феникс, 2007. — 137 с.

19. *Павлович, С. А.* Медицинская микробиология практикум / С. А. Павлович, К. Д. Пяткин. — Минск: Выш. школа, 1993. — 290 с.

20. *Поздеев, О. К.* Медицинская микробиология / О. К. Поздеев; под ред. В. И. Покровского. — М.: ГЭОТАР-МЕД, 2007. — 768 с.

21. Полимеразная цепная реакция – современный метод клинической лабораторной диагностики / С. А. Костюк [и др.] // Медицинские новости. — 2004. — № 2. — С. 24–30.

22. *Поляк, М. С.* Теория и практика определения чувствительности микроорганизмов к противомикробным препаратам диск-диффузионным методом (лекция) / М. С. Поляк // Клиническая лабораторная диагностика. — 2003. — № 1. — С. 25–32.

23. Прикладная иммунология: справочное пособие / под ред. А. А. Сохина, Е. Ф. Чернушенко. — К.: Здоров'я, 1984. — 320 с.

24. *Пыцкий, В. И.* Аллергические заболевания / В. И. Пыцкий, Н. В. Адрианова, А. В. Артемасова. — 2-е изд., перераб. и доп. — М.: Медицина, 1991. — 368 с.

25. *Райкис, Б. Н.* Общая микробиология с вирусологией и иммунологией (в графическом изображении): учеб. пособие / Б. Н. Райкис, В. О. Пожарская, А. Х. Казиев. — М.: Триада-Х, 2002. — 352 с.

26. Способы экстракции и молекулярно-биологические методы идентификации нуклеиновых кислот: метод. рекомендации / С. А. Костюк и [и др.] — Минск: БелМАПО, 2009. — 34 с.

27. *Титов, Л. П.* Вирусология: терминологический словарь / Л. П. Титов. — Минск: Минсктиппроект, 2009. — 448 с.

28. *Титов, Л. П.* Иммунология: Терминологический словарь / Л. П. Титов. — Минск: БГМУ, 2002. — 213 с.

29. Частная медицинская микробиология: учебное пособие / И. И. Генералов [и др.]; под ред. И. И. Генералова. — Витебск, ВГМУ, 2013. — 380 с.

30. Черкес, Ф. К. Руководство к практическим занятиям по микробиологическим исследованиям / Ф. К. Черкес. — 2-е изд., перераб. и доп. — М.: Медицина. — 1980. — 307 с.

31. Шагинян, И. А. Роль и место молекулярно-генетических методов в эпидемиологическом анализе внутрибольничных инфекций / И. А. Шагинян // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. — 2000. — Т. 2, № 3. — С. 82–95.

32. Шигина, Ю. В. Иммунология: учебное пособие / Ю. В. Шигина. — М.: РИОР, 2007. — 183 с.

РЕПОЗИТОРИЙ ГОМГМУ

Учебное издание

Лагун Людмила Васильевна

**МЕТОДЫ
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ
ИССЛЕДОВАНИЙ**

**Учебно-методическое пособие
для студентов 2–3 курсов лечебного и медико-диагностического
факультетов медицинских вузов**

Редактор *Т. М. Кожемякина*
Компьютерная верстка *А. М. Терехова*

Подписано в печать 19.10.2016.
Формат 60×84^{1/16}. Бумага офсетная 80 г/м². Гарнитура «Таймс».
Усл. печ. л. 9,53. Уч.-изд. л. 10,42. Тираж 185 экз. Заказ № 418.

Издатель и полиграфическое исполнение:
учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет».
Свидетельство о государственной регистрации издателя,
изготовителя, распространителя печатных изданий № 1/46 от 03.10.2013.
Ул. Ланге, 5, 246000, Гомель