

# РУКОВОДСТВО К ЛАБОРАТОРНЫМ ЗАНЯТИЯМ ПО МИКРОБИОЛОГИИ

Под редакцией  
Л. Б. БОРИСОВА

Допущено Главным управлением  
учебных заведений Министерства  
здравоохранения СССР в качестве  
руководства для студентов  
медицинских институтов



Москва. «Медицина». 1979

Авторский коллектив'  
Л. Б. БОРИСОВ, Б. Н. КОЗЬМИН-СОКОЛОВ,  
И. С. ФРЕЙДЛИН, З. Ф. ФЕДОРОВА

УДК 576.8(076.58.05) : 61

Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. Под ред. Л. Б. Борисова. М., «Медицина», 1979, 286 с., ил.

Руководство состоит из трех частей: общей микробиологии, практического применения учения об инфекции и иммунитете и частной микробиологии, которые подразделены на темы и занятия. В каждое занятие включены программа, перечень демонстрационного материала (окрашенных мазков, питательных сред, серологических реакций и др.), задания студентам для самостоятельного выполнения лабораторной работы, а также методические указания. Ко всем темам приложены контрольные вопросы по практикуму и теоретической части курса (излагаемой в учебнике и лекциях).

Руководство написано в соответствии с программой преподавания микробиологии для студентов лечебного, педиатрического и стоматологического факультетов медицинских институтов, утвержденной Главным управлением учебных заведений Министерства здравоохранения СССР.

В учебном пособии 94 рис., 30 схем, 39 табл.

Рецензенты: зав. кафедрой микробиологии Томского медицинского института академик АМН СССР С. П. Карпов и зав. кафедрой микробиологии Московского медицинского стоматологического института проф. И. И. Олейник.

Р  $\frac{51000-245}{039(01)-79}$  17-79 2003000000

© Издательство «Медицина» Москва, 1979

## ПРЕДИСЛОВИЕ

Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии написано в соответствии с Программой по микробиологии с вирусологией и иммунологией (М., 1975) и новыми инструкциями, предназначенными для микробиологических лабораторий. Оно состоит из двух разделов: общей микробиологии, включающей практическое применение учения об инфекции и иммунитете, и частной микробиологии.

Материал распределен по темам и занятиям. Продолжительность практических занятий, указанных в Руководстве, соответствует двум академическим часам. Это дает возможность студентам работать самостоятельно со сделанными посевами и во многих случаях своевременно регистрировать результаты проведенных исследований. Каждая тема включает программу занятия (или занятий), теоретическое вступление, перечень демонстраций, задание студентам для выполнения лабораторной работы, методические указания и контрольные вопросы.

В теоретических вступлениях представлены основные положения темы, дополненные таблицами и схемами, которые тесно связаны с вопросами, рассматриваемыми на соответствующих практических занятиях.

Для более эффективного усвоения изучаемого материала в настоящее руководство наряду с программой занятий введены задачи и контрольные вопросы. Это позволит в значительной мере активизировать самостоятельную работу студентов и свести к минимуму возможность ее механического выполнения, поскольку для решения каждой задачи необходима предварительная подготовка в соответствии с методическими указаниями, изложенными в руководстве.

Например, приступая к выполнению задания по теме: «Морфология микроорганизмов», студент должен знать, каким образом выявляют споры и капсулы у бактерий, в каких случаях используют окраску по Граму, другие сложные методы окраски и т. д. В помощь студентам наряду с методическими указаниями предлагается демонстрация препаратов, посевов, «пестрых» рядов, серологических реакций и т. д.

Контрольные вопросы, предлагаемые к каждой теме, позволят студентам проверить свои знания после подготовки по практикуму и теоретическому курсу, изложенному в учебнике и лекциях. Вместе с тем они призваны унифицировать требования, предъявляемые к студентам на занятиях, зачетах и экзаменах. Опыт преподавания микробиологии в I Ленинградском ордена Трудового Красного Знамени медицинском институте имени академика И. П. Павлова показал, что введение задач и контрольных вопросов заметно повысило интерес студентов к практическим занятиям и способствовало более глубокому усвоению пройденного материала.

Все темы и занятия изложены в руководстве таким образом, чтобы в зависимости от реального количества часов можно было сократить или расширить материал за счет самостоятельной работы студентов с учетом проведения контрольных занятий. При выполнении практических занятий для решения многих задач студенты используют готовые препараты, посевы, «пестрые» ряды, серологические реакции и т. д. Это сокращает объем самостоятельной работы, но не отражается на смысловом содержании темы.

Данное руководство может быть использовано и на санитарно-гигиеническом факультете, программа которого рассчитана на большее количество часов. При этом рекомендуется расширить самостоятельную работу студентов за счет выполнения исследований, указанных в демонстрациях, и ввести занятия по санитарно-бактериологическим исследованиям объектов внешней среды и пищевых продуктов.

Критические замечания, пожелания и советы по руководству будут приняты авторами с благодарностью.

# ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

---

При изучении данного раздела студенты знакомятся с устройством и оборудованием бактериологической, вирусологической, иммунологической лабораторий, с основными методиками, которые применяются при микробиологических, вирусологических исследованиях. Это прежде всего относится к микроскопии, стерилизации, приготовлению питательных сред, способам культивирования микроорганизмов и выделению чистых культур.

С помощью этих методов студенты исследуют наиболее общие морфологические, культуральные и биохимические признаки, главным образом у бактерий и вирусов, а также распространение микробов в природе, микрофлору организма человека и проводят санитарно-микробиологическую оценку воздушного бассейна, водоемов и почвы. Наряду с этим студенты изучают влияние физических и химических факторов на микроорганизмы, и методы определения чувствительности бактерий к антибиотикам, имеющие непосредственно прикладное значение. Знакомство студентов с основными методами, применяющимися для исследования генетического контроля самых разнообразных признаков микробных клеток и вирусов, позволит им лучше разобраться в современных достижениях молекулярной биологии и медицинской генетики, в бурном развитии которых микробные объекты сыграли решающую роль.

Вместе с тем от студентов требуется овладеть навыками микробиологического исследования, что позволит им в дальнейшем понять возможности микробиологических методов, широко применяющихся в диагностике инфекционных болезней и санитарно-бактериологической практике.

# МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ЛАБОРАТОРИИ И ИХ ОБОРУДОВАНИЕ

## Тема 1. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЕ, ВИРУСОЛОГИЧЕСКИЕ, И СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ ЛАБОРАТОРИИ И ИХ ОБОРУДОВАНИЕ

### Программа занятия

1. Организация микробиологических (бактериологических, вирусологических и серологических) лабораторий и правила работы в них.
2. Основные приборы и оборудование микробиологических лабораторий.
3. Микроскопы и микроскопическая техника.

### Демонстрация

1. Устройство и применение основных приборов и оборудования, используемого в микробиологических лабораториях: термостата, центрифуг, автоклава, сушильного шкафа и др., инструментария и посуды.
2. Устройство биологического микроскопа. Различные типы микроскопии: темнопольная, фазово-контрастная, люминесцентная, электронная.
3. Препараты дрожжей и бактерий при различных типах микроскопии.

### Правила работы в микробиологических лабораториях

Работа в микробиологической лаборатории медицинского учреждения проводится с патогенными микроорганизмами. Поэтому для предохранения от заражения персонал обязан строго соблюдать правила внутреннего распорядка.

1. Все сотрудники работают в медицинских халатах, шапочках и в сменной обуви, которые защищают от попадания заразного материала. В необходимых случаях на лицо надевают маску из марли. Работа с особо опасными микроорганизмами регламентируется специальной инструкцией.

Вход в лабораторию без халата категорически запрещен.

2. В лабораториях запрещается курить и принимать пищу.

3. Рабочее место должно быть всегда в образцовом порядке. Личные вещи сотрудников хранятся в специально отведенном месте.

4. При случайном попадании заразного материала на стол или на пол это место тщательно обрабатывается дезинфицирующим раствором.

5. Хранение и наблюдение за культурами микроорганизмов и их уничтожение проводятся согласно специальной инструкции. Все культуры патогенных микроорганизмов регистрируются в журнале движения культур.

После окончания работы нужно тщательно вымыть руки и при необходимости обработать их дезинфицирующим раствором.

### **Принципы организации и оборудование бактериологической, вирусологической и серологической лабораторий**

Бактериологические, вирусологические и серологические лаборатории входят в состав санитарно-эпидемиологических станций (СЭС) и организуются при крупных больницах. В этих лабораториях выполняются бактериологические, вирусологические и серологические анализы материалов, полученных от больных, обследуются бактерионосители и проводятся санитарно-микробиологические исследования воды, воздуха, пищевых продуктов.

В бактериологических лабораториях больниц обычно проводят диагностические исследования при кишечных и гнойных инфекциях, дифтерии, туберкулезе и др. Диагностика особо опасных инфекций (чума, туляремия, бруцеллез и др.) осуществляется в специальных лабораториях, организация и деятельность которых строго регламентированы.

В вирусологических лабораториях проводится диагностика вирусных инфекций (грипп, полиомиелит, энцефалиты и др.), заболеваний, вызванных хламидиями (орнитоз и др.) и риккетсиями (сыпной тиф, лихорадка Ку и др.). При организации и оборудовании вирусологических лабораторий учитывается специфика работы с вирусами, тканевыми культурами и куриными эмбрионами, требующая строжайшей асептики. Поэтому в вирусологических лабораториях имеются застекленные боксы с предбоксами.

Бактериологические и вирусологические лаборатории обычно размещаются в нескольких помещениях, которые, в зависимости от объема работы и целевого назначения, занимают большую или меньшую площадь. В каждой лаборатории предусмотрены: а) боксы для работы с отдельными группами бактерий или вирусами; б) помещения для серологических исследований, приготовления питательных сред, стерилизации, мойки посуды; в) виварий с боксами

для здоровых и подопытных животных; г) регистратура для приема и выдачи анализов.

Наряду с этими помещениями вирусологические лаборатории имеют боксы для специальной обработки исследуемого материала и для работы с тканевыми культурами.

В лаборатории должно быть следующее оборудование: биологический иммерсионный микроскоп с дополнительными приспособлениями (осветителем, фазово-контрастным устройством, темнопольным конденсором и др.), люминесцентный микроскоп, термостаты, оборудование для стерилизации (автоклавы, сушильные шкафы, свертыватели), рН-метр и компаратор Михаэлиса для определения рН, аппарат для получения дистиллированной воды (дистиллятор), центрифуги, технические, аналитические и торзионные весы; аппаратура для фильтрации (фильтры Зейтца и бактериальные свечи), водяные бани, холодильники, аппарат для изготовления ватно-марлевых пробок, набор инструментов — бактериологические петли, шпатели, иглы, пинцеты и др., лабораторная посуда (пробирки, колбы, чашки Петри, матрацы, флаконы, ампулы, пастеровские пипетки, пипетки, градуированные на 1, 2, 5 и 10 мл) и другое оборудование.

В лаборатории имеется место для окраски микроскопических препаратов, где содержатся растворы красителей, спирт для обесцвечивания, фильтровальная бумага и пр. Каждое рабочее место снабжено газовой горелкой (или спиртовкой) и банкой с дезинфицирующим раствором.

Для повседневной работы лаборатория должна располагать необходимыми питательными средами, химическими реактивами, диагностическими сыворотками и другими лабораторными материалами.

В крупных микробиологических лабораториях имеются термальные комнаты для массового выращивания микроорганизмов.

### **Аппаратура для выращивания микроорганизмов, стерилизации и других микробиологических исследований**

1. **Термостат** — аппарат для выращивания микроорганизмов, в котором поддерживается температура в пределах 28—43° С. Термостаты выпускают водяными или суховоздушными (рис. 1).

2. **Микроаэростат** — аппарат для выращивания микроорганизмов в бескислородных условиях.



Представляет собой металлический цилиндр, который герметически закрывается крышкой с резиновой прокладкой. На крышке смонтированы вакуумметр и два крана: один для откачивания воздуха, другой — для наполнения аппарата инертным газом (азотом). В аппарате имеется штатив для чашек Петри. Выкачивание воздуха проводят с помощью вакуумного насоса, после чего микроанаэроустат с посевами помещают в термостат. В микроанаэроустате культивируются анаэробные микроорганизмы при остаточном давлении 10 мм рт. ст.

3. Сушильный шкаф (печь Пастера). Предназначен для стерилизации или сушки лабораторной посуды и других материалов. Он состоит из наружного корпуса, средней и рабочей камеры, панели управления и подставки.

4. Автоклав — предназначен для стерилизации паром (рис. 2а, б). В микробиологических лабораториях используются автоклавы разных моделей (горизонтальные, вертикальные, стационарные, переносные и др.).

5. Холодильники — широко используются в микробиологических лабораториях для хранения при температуре около  $4^{\circ}\text{C}$  музейных культур микроорганизмов, питательных сред, вакцин, сывороток и других препаратов.

Для сохранения биопрепаратов при температуре менее  $0^{\circ}\text{C}$  используются низкотемпературные холодильники, в которых поддерживается температура  $-20^{\circ}\text{C}$  и ниже.

6. Центрифуги — приборы для осаждения микроорганизмов, эритроцитов и других клеток, а также для разделения неоднородных жидкостей (эмульсий, суспензий) с помощью центробежной силы. В микробиологических лабораториях применяются центрифуги, работающие при различных скоростях.

7. Прибор для счета колоний (рис. 3). Представляет собой полуавтоматический счетчик, снабженный иглой с пружинным устройством. Легкий нажим иглы на участке дна чашки Петри, соответствующем положению колонии, ос-

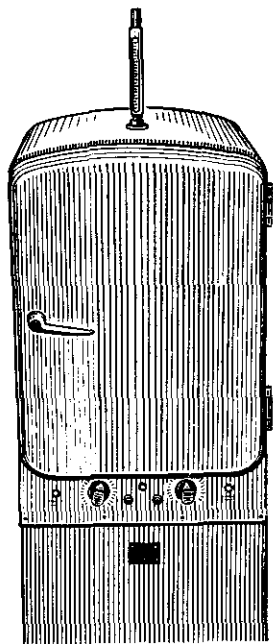


Рис. 1. Термостат.

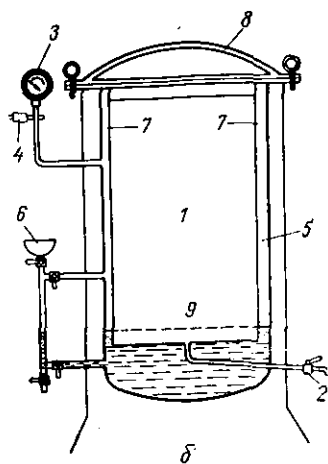
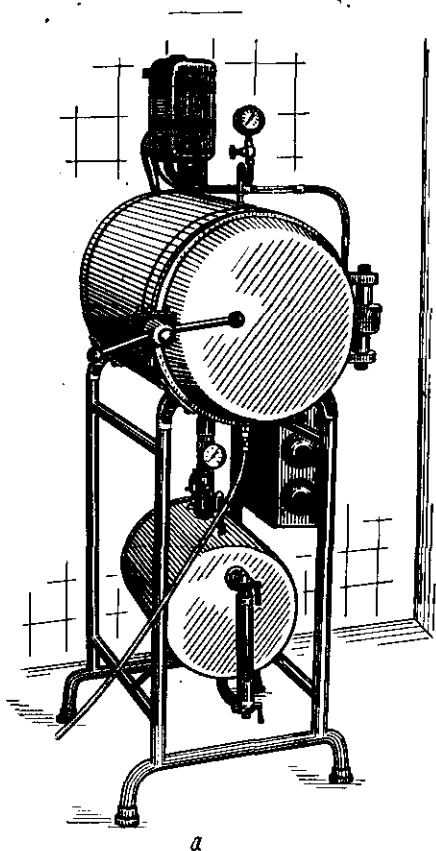


Рис. 2. Автоклавы.

а — горизонтальный; б — вертикальный (схема): 1 — стерилизационная камера; 2 — край для выхода воздуха; 3 — манометр; 4 — предохранительный клапан; 5 — водопаровая камера; 6 — воронка для заполнения автоклава водой; 7 — отверстия для поступления пара в стерилизационную камеру; 8 — крышка автоклава; 9 — подставка для размещения стерилизуемых материалов.

тавляет на стекле метку. При этом держатель поднимается вверх, электрическая цепь замыкается и показания счетчика увеличиваются на единицу.

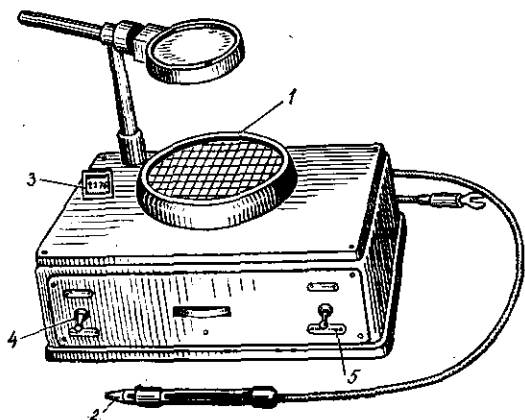
### Микроскопы и методы микроскопии

Для микробиологических исследований используют несколько типов микроскопов (биологический, люминесцентный, электронный) и специальные методы микроскопии (фазово-контрастный, темнопольный).

**Биологический микроскоп.** В микробиологической практике широко применяют микроскопы отечественного произ-

Рис. 3. Прибор для счета колоний микроорганизмов.

1 — столик для чашки Петри; 2 — игла с пружинным устройством; 3 — показатель счетчика; 4 — тумблер для включения импульсного счетчика; 5 — тумблер для включения лампы освещения столика.



водства: МБР-1, МБИ-1, МБИ-2, МБИ-3, МБИ-6, Биолам Р-1 и др. Они предназначены для изучения формы, структуры, размеров и некоторых других признаков различных микроорганизмов, величина которых не менее 0,2—0,3 мкм.

Микроскоп состоит из двух частей — механической и оптической (рис. 4).

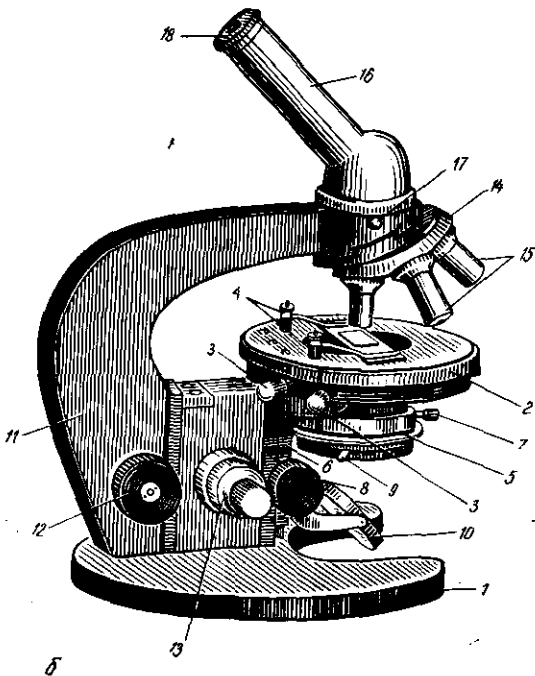
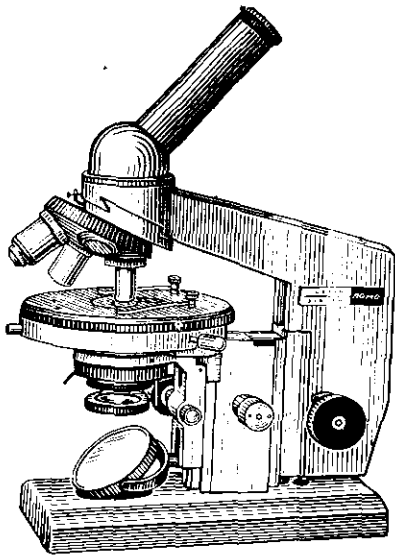
Объективы микроскопа состоят из фронтальной (нижней) линзы, увеличивающей объект, и коррекционных линз, исправляющих недостатки оптического изображения. Объективы разделяются на сухие и иммерсионные (immersion — погружение). В микроскопах МБР-1, МБИ-1 и других имеются два сухих объектива и один иммерсионный. Данные о каждом объективе имеются на его оправе: 1) увеличение 8, 40, 90; 2) числовая (нумерическая) апертура; 3) заводской номер. Наряду с этими обозначениями иммерсионные объективы 90 имеют дополнительный буквенный индекс ОИ или МИ (объектив иммерсионный или масляная иммерсия), а также черную маркировочную линию в нижней части объектива.

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

Предельная разрешающая способность иммерсионного микроскопа равна 0,2 мкм. Общее увеличение микроскопа определяется произведением увеличения объектива на увеличение окуляра. Например, увеличение микроскопа с иммерсионным объективом 90 и окуляром 10 составляет:  $90 \times 10 = 900$  раз. Полезное увеличение микроскопа может

Рис. 4. Микроскопы.

а — общий вид микроскопа «Биолом»; б — схема микроскопа МБР-1; 1 — основание микроскопа; 2 — предметный столик; 3 — винты для перемещения предметного столика; 4 — клеммы, прижимающие препарат; 5 — конденсор; 6 — кронштейн конденсора; 7 — винт, укрепляющий конденсор в гильзе; 8 — рукоятка перемещения конденсора; 9 — рукоятка ирисовой диафрагмы конденсора; 10 — зеркало; 11 — тубусодержатель; 12 — рукоятка макрометрического винта; 13 — рукоятка микрометрического винта; 14 — револьвер объективов; 15 — объективы; 16 — наклонный тубус; 17 — винт для крепления тубуса; 18 — окуляр.



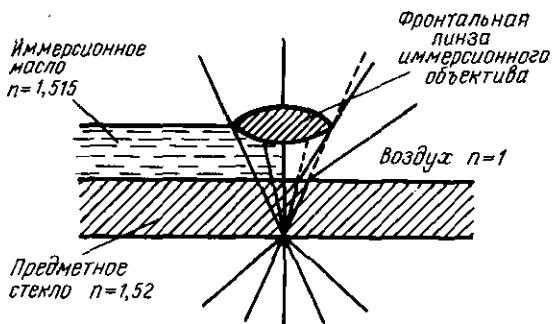


Рис. 5. Ход лучей в иммерсионной системе.

достигать 2000 раз. В повседневной практике обычно используют увеличения порядка 630—900.

Ход лучей в микроскопе представлен на рис. 5.

**Дополнительные приспособления к биологическому микроскопу.** Приспособления позволяют максимально использовать все его возможности, облегчают условия работы и значительно расширяют диапазон применения. В микробиологии часто применяются следующие приспособления:

1. Темнопольные кардиовид- и параболоид-конденсоры.
2. Фазово-контрастное приспособление КФ-1, КФ-4 и другие модели.

3. Бинокулярная насадка, приближающая микроскопию к условиям естественного зрения.

4. Осветители ОИ-7, ОИ-19 и другие модели, обеспечивающие оптимальное и стабильное освещение, интенсивность света которых регулируется реостатом.

5. Окуляр-микрометр и объект-микрометр, предназначенные для измерения микроскопических объектов.

6. Нагревательный столик, который устанавливается вместо предметного столика микроскопа для обеспечения постоянной температуры  $37^{\circ}\text{C}$ . Применяется для длительного наблюдения за живыми микроорганизмами.

7. Рисовальный аппарат для высококачественной зарисовки препарата, с помощью которого можно одновременно видеть изображение объекта и бумаги, расположенной на столе вблизи микроскопа, и обводить на бумаге контуры объекта.

8. Цветные, нейтральные и тепловые оптические светофильтры устанавливаются между источником света и мик-

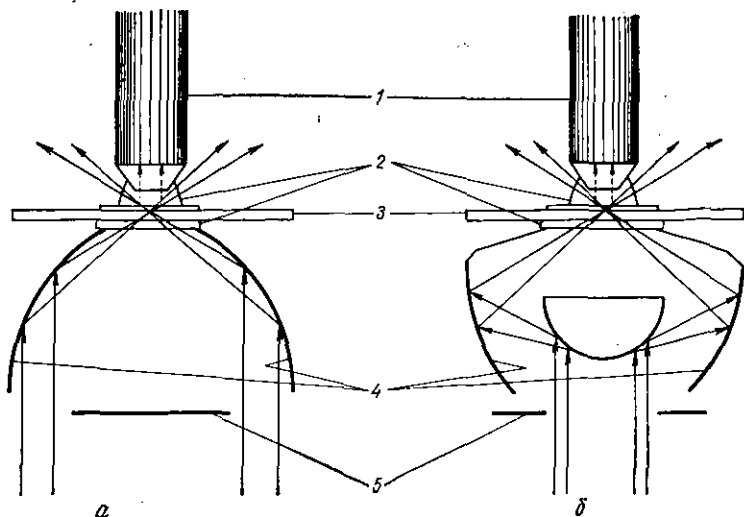


Рис. 6. Ход лучей в темнопольных конденсорах.

а — параболоид-конденсор; б — кардиоид-конденсор; 1 — объектив; 2 — иммерсионное масло; 3 — препарат; 4 — зеркальная поверхность; 5 — диафрагма.

роскопом и применяются при микрофотографии и при специальных методах микроскопии.

9. Микрофотонасадки МФН-1, МФН-3 и другие модели для фотографии микроскопических объектов.

10. Микроустановка для цейтраферной (прерывистой) микрокиносъемки, применяющаяся в сочетании с фазово-контрастной микроскопией, позволяет изучить динамику развития и размножения микроорганизмов, влияние на них разных факторов и многие другие вопросы.

**Темнопольная микроскопия.** Микроскопия в темном поле основана на явлении дифракции света при сильном боковом освещении взвешенных в жидкости мельчайших частиц (эффект Тиндаля). Это достигается с помощью параболоид- или кардиоид-конденсора, которым заменяют обычный конденсор в биологическом микроскопе (рис. 6а, б).

Параболоид-конденсор имеет затемнение в центре, задерживающее центральные лучи света, и внутреннюю зеркальную поверхность для отражения лучей. В кардиоид-конденсоре лучи сначала отражаются от выпуклой зеркальной поверхности, затем от вогнутой. Краевые лучи, выходящие из темнопольного конденсора, проходят в косом направлении и не попадают в объектив, в связи с чем поле зрения остается темным. В объектив поступают отраженные от объекта лучи,

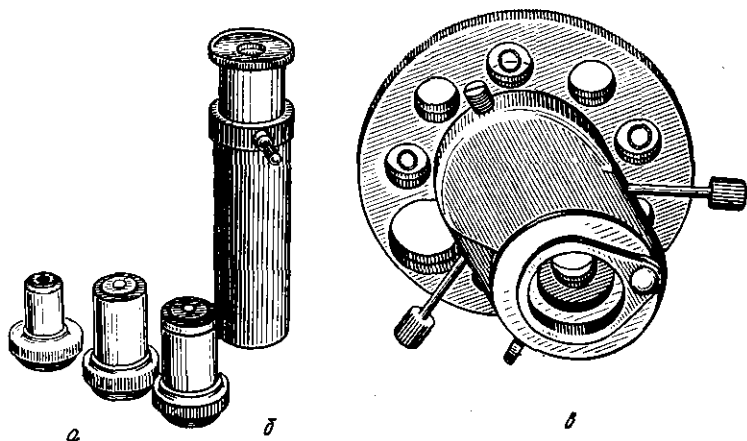


Рис. 8. Фазово-контрастное устройство.

а — фазовые объективы; б — вспомогательный микроскоп; в — фазовый конденсор.

которые образуют весьма характерное изображение ярко светящихся контуров микробных клеток и других частиц, находящихся в препарате на темном фоне (рис. 7).

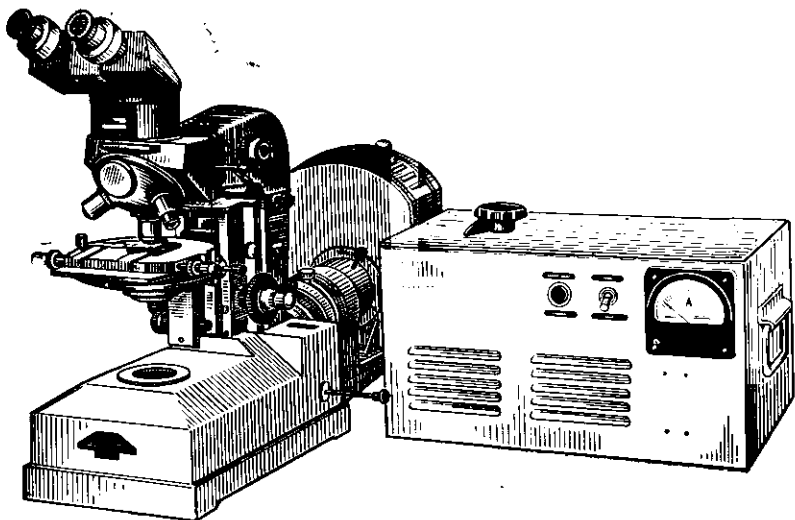
**Фазово-контрастная микроскопия** основана на превращении изменения по фазе, возникающего при прохождении световой волны через так называемые фазовые (прозрачные) объекты, в изменения по амплитуде, которые улавливаются глазом.

С помощью фазово-контрастного приспособления фазовые изменения световых волн, проходящих через объект, превращаются в амплитудные и прозрачные объекты, становятся видимыми в микроскоп. Прозрачные биологические объекты при фазово-контрастной микроскопии приобретают высокую контрастность изображения, которая может быть позитивной или негативной. Позитивным фазовым контрастом называют темное изображение объекта на светлом поле зрения, негативным фазовым контрастом — светлое изображение объекта на темном фоне.

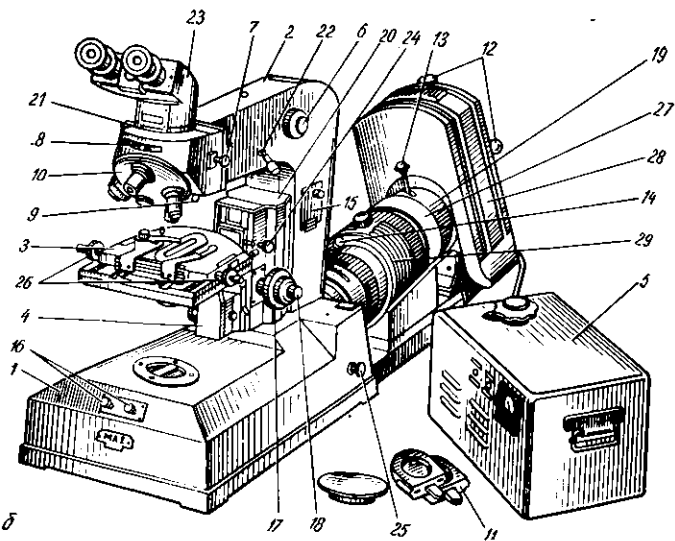
Для фазово-контрастной микроскопии используют обычный микроскоп и дополнительное фазово-контрастное приспособление КФ-1 или КФ-4 (рис. 8).

В комплект КФ-1 и КФ-4 входят:

1. Специальные объективы с фазовыми кольцами, изменяющие фазу и уменьшающие амплитуду световой волны. На оправе фазовых



а



б



объективов обозначен дополнительный буквенный индекс «Ф» — Ф-10, Ф-20, Ф-40 и ФОИ-90.

2. Фазовый конденсор с револьвером специальных кольцевых диафрагм для каждого объектива. Индексом «0» обозначено отверстие для наблюдения препарата обычным методом с ирисовой диафрагмой.

3. Вспомогательный микроскоп малого увеличения, которым заменяют окуляр при наблюдении за центрировкой освещения.

При фазово-контрастной микроскопии используют осветители типов ОИ-7 или ОИ-19.

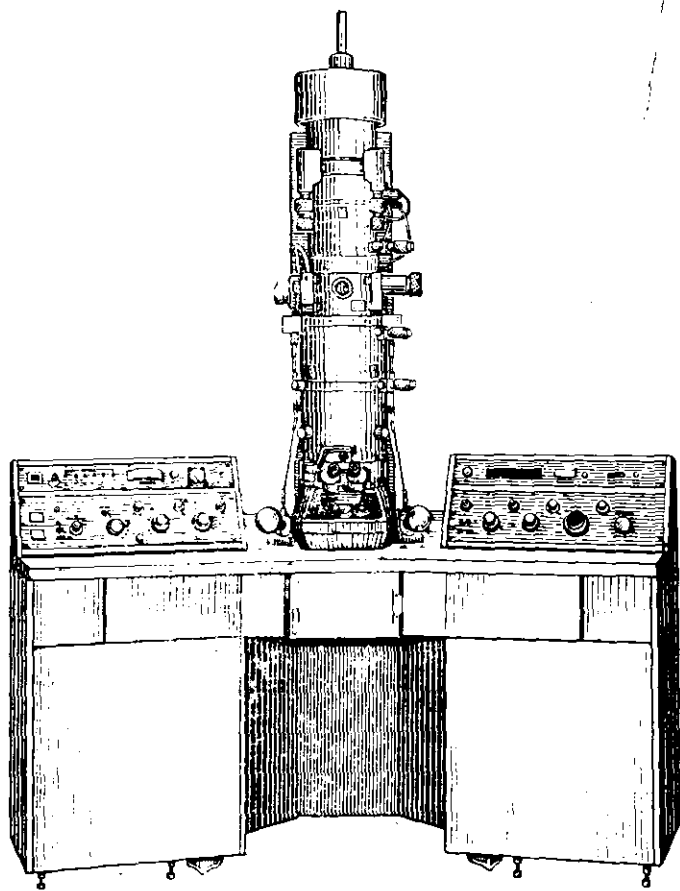
**Люминесцентная (или флюоресцентная) микроскопия** основана на явлении фотолюминесценции.

Люминесценция (lumen — свет) — это свечение веществ, возникающее под действием каких-либо источников энергии: света, электронных лучей, ионизирующего излучения. Фотолюминесценция — это люминесценция объекта под влиянием света. Свет люминесценции имеет большую длину волны, чем свет возбуждающий, поэтому выгодно возбуждать люминесценцию коротковолновыми лучами света. Если освещать люминесцирующий объект синим светом, то он испускает лучи красного, оранжевого, желтого или зеленого цветов. В результате возникает цветное изображение объекта. Длина волны излучаемого света (цвет люминесценции) зависит от физико-химической структуры люминесцирующего вещества.

Первичная (собственная) люминесценция наблюдается без предварительного окрашивания объекта; вторичная (наведенная) люминесценция возникает после окраски препаратов специальными люминесцирующими красителями — флюорохромами. Наведение люминесценции широко применяется в микробиологической практике. Люминесцентная микроскопия по сравнению с обычными методами обладает рядом преимуществ: цветное изображение, высокая степень контрастности, возможность исследования живых микроорганизмов и обнаружение в

Рис. 9. Люминесцентный микроскоп МЛ-2.

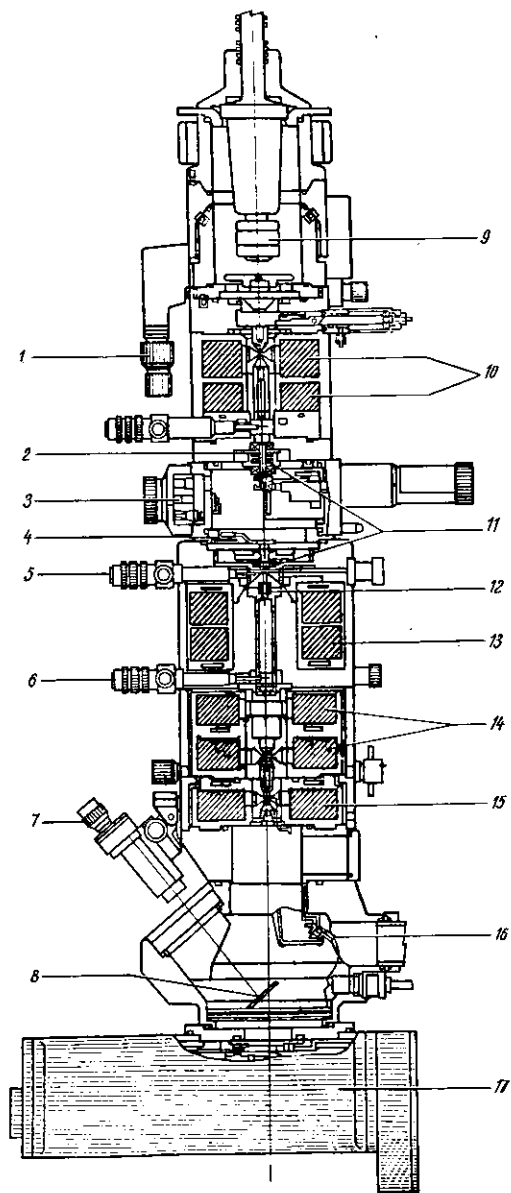
а — общий вид; б — схема: 1 — основание микроскопа; 2 — тубусодержатель; 3 — предметный столик; 4 — кронштейн с конденсором; 5 — электропульс ПРЛ-5; 6 — рукоятка полевой диафрагмы; 7 — рукоятка для переключения освещения; 8 — револьверный диск с «запирющими» светофильтрами; 9 — рукоятка включения ахроматической линзы; 10 — револьвер объективов; 11 — светофильтры в оправе; 12 — винты для центровки лампы; 13 — рукоятка перемещения коллектора; 14 — рукоятка полевой диафрагмы; 15 — крышка гнезда светофильтров; 16 — винты для центровки полевой диафрагмы; 17 — микрометрический винт; 18 — микрометрический винт; 19 — оправка коллектора; 20 — коробка с механизмами грубого и тонкого перемещения препарата; 21 — винт для крепления насадки; 22 — винты для центровки полевой диафрагмы; 23 — бинокулярная насадка; 24 — рукоятка тормоза грубого движения; 25 — рукоятка для переключения освещения; 26 — рукоятка для перемещения препарата в горизонтальной плоскости; 27 — защитная втулка; 28 — корпус ртутной лампы; 29 — кювета с дистиллированной водой.



а

Рис. 10. Электронный микроскоп.

а — общий вид; б — схема колонки: 1 — ручка для регулирования юстирующего устройства; 2 — устройство, фокусирующее пучок электронов; 3 — камера для сеток, на которые помещены исследуемые объекты; 4 — противозагрязнительное устройство; 5 — диафрагма объективной линзы; 6 — диафрагма поля зрения; 7 — бинокулярная лупа; 8 — флуоресцентный экран; 9 — электронная пушка; 10 — конденсорные линзы; 11 — устройство, фокусирующее пучок электронов; 12 — стигматор объективной линзы; 13 — объективная линза; 14 — промежуточные линзы; 15 — проекционная линза; 16 — фотоэкспонетр; 17 — фотокамера.



δ

исследуемом материале бактерий в небольших концентрациях.

В лабораторной практике люминесцентная микроскопия применяется для выявления и изучения многих микроорганизмов (рис. 9).

Электронная микроскопия делает возможным наблюдение объектов, размеры которых лежат за пределами разрешающей способности светового микроскопа (0,2 мкм). Электронный микроскоп применяется для изучения вирусов, тонкого строения различных микроорганизмов, макромолекулярных структур и других субмикроскопических объектов (рис. 10).

В электронных микроскопах световые лучи заменяют поток электронов, имеющий при определенных ускорениях длину волны около 0,005 нм, т. е. почти в 100 000 раз короче длины волны видимого света. Высокая разрешающая способность электронного микроскопа, практически составляющая 0,1—0,2 нм, позволяет получить общее полезное увеличение до 1 000 000 раз.

Наряду с приборами «просвечивающего» типа, используют «сканирующие» электронные микроскопы, обеспечивающие рельефное изображение поверхности объекта. Разрешающая способность этих приборов значительно ниже, чем у электронных микроскопов «просвечивающего» типа.

### Методические указания

Правила работы с микроскопом. Работа с микроскопом состоит из правильной установки освещенности поля зрения и препарата, и его микроскопии разными объективами. Освещение может быть естественным (дневным) или искусственным. Для искусственного освещения используют специальные источники света, например, осветитель ОИ-7.

При микроскопии препаратов с иммерсионным объективом следует: 1) на приготовленный и окрашенный мазок нанести небольшую каплю иммерсионного масла и поместить препарат на предметный столик (укреплять зажимами не обязательно); 2) повернуть револьвер и установить иммерсионный объектив 90, осторожно опустить тубус микроскопа вниз до погружения фронтальной линзы иммерсионного объектива в каплю масла; 3) установить ориентировочный фокус при помощи макрометрического винта; нельзя допускать соприкосновения объектива с препаратом,

которое может повлечь поломку препарата или фронтальной линзы (свободное расстояние иммерсионного объектива 0,1—1 мм).

Окончательную фокусировку препарата производят микрометрическим винтом, который рекомендуется вращать не более чем в пределах одного оборота.

После окончания работы микроскоп необходимо привести в порядок. Специальной тряпочкой тщательно вытирают масло с иммерсионного объектива, переводят револьвер на малый сухой объектив. 8.

Порядок работы с фазово-контрастным устройством. 1. Установить в микроскопе фазовый конденсор и необходимый фазовый объектив. Револьвер конденсора поставить в положение «0».

2. Поместить препарат на предметный столик.

3. Установить освещение, чтобы четкое изображение нити электротолпы находилось в плоскости полностью открытой прис-диафрагмы конденсора.

4. Заменить окуляр на вспомогательный микроскоп МИР-4 и перемещением его окуляра сфокусировать фазовое кольцо объектива до получения четкого темно-серого изображения.

5. Установить диафрагму в соответствии с фазовым объективом. В поле зрения появляется светлое кольцо диафрагмы.

6. С помощью центрировочных винтов конденсора полностью совместить светлое и темное кольца.

7. Заменить вспомогательный микроскоп окуляром и микроскопировать препарат.

8. При смене объектива или препарата вновь проверить центровку кольцевой диафрагмы с фазовым кольцом.

Правильное выполнение всех условий обеспечивает достаточно высокую контрастность изображения.

Техника темнопольной микроскопии. 1. Заменить обычный конденсор в микроскопе на темнопольный (параболоид- или кардиоид-конденсор). 2. Для создания оптически гомогенной среды на верхнюю линзу темнопольного конденсора нанести каплю иммерсионного масла. Поднять конденсор до соприкосновения капли масла с предметным стеклом. 3. Установить достаточно сильный и стабильный источник света (например, осветитель ОИ-7) и провести точную юстировку осветительной системы микроскопа.

Возможные ошибки при микроскопии в темном поле связаны с наличием пузырьков воздуха между конденсором и предметным стеклом, неправильной установкой конденсора и другими причинами.

Техника люминесцентной микроскопии. В повседневной работе обычно пользуются освещением объекта сверху через объектив в падающем свете. При этом используют синие светофильтры ФС-1 (2 мм) и ФС-2 (4 мм), которые устанавливают в соответствующие гнезда на правой стороне штатива микроскопа. В качестве желтого запирающего фильтра для защиты глаза используют фильтр ЖС-18, который вмонтирован в барабан, находящийся над револьвером микроскопа МЛ-2. Цифра «1» на барабане, обращенная в сторону исследователя, соответствует фильтру ЖС-18.

При работе с микроскопом МЛ-2 необходимо: 1) включить вилку блока питания микроскопа в электрическую сеть; 2) поворотом по часовой стрелке установить рукоятку регулятора напряжения у красной точки; 3) тумблер на лицевой стороне блока питания установить в положение «ВКЛ» (включено и нажать кнопку зажигания лампы микроскопа; если лампа не загорается, повернуть рукоятку регулятора напряжения на несколько миллиметров по часовой стрелке и вновь нажать кнопку (на кнопку нажимать не более 2—3 с); 4) после зажигания лампы установить рукоятку регулятора рабочего тока на отметку в 4 А; через 10 мин после включения лампы микроскопа можно начинать исследование препаратов.

При работе с опак-иллюминатором ОИ-17 следует: 1) укрепить опак-иллюминатор в тубусном гнезде головки микроскопа и сверху установить тубус; 2) отцентрировать лучи ртутно-кварцевой лампы в отношении опак-иллюминатора; 3) перед источником света поместить два синих светофильтра; для защиты глаз на окуляр надеть желтый светофильтр.

Препарат помещают на предметный столик микроскопа, револьвер с объективами устанавливают в требуемое положение и добиваются фокусировки исследуемого объекта с помощью макро- и микровинта.

Люминесцентную микроскопию проводят в затемненной комнате.

Методы приготовления препаратов для темнопольной, фазово-контрастной и люминесцентной микроскопии. Для темнопольной и фазово-контрастной микроскопии приготавливают препарат «раздавленная» капля. Микроскопируют препарат с объективом 40 или специальным иммерсионным объективом с ирис-диафрагмой, позволяющей регулировать численную апертуру от 1,25 до 0,85.

Толщина предметных стекол не должна превышать 1—1,5 мм, покровных — 0,15—0,2 мм.

Для люминесцентной микроскопии готовят на предметных стеклах препараты-мазки или «раздавленная» капля, которые флюорохромируют специальными красителями: акридиновым желтым, акридиновым оранжевым, аурамином, корифосфином в разведении 1:10 000 и более. При работе с иммерсионным объективом используют нефлюоресцирующее масло.

Приготовление препаратов для исследования в электронном микроскопе. Приготовление и исследование препаратов в электронном микроскопе имеет ряд особенностей. Препараты готовят на специальных пленках-подложках, так как стекло непроницаемо для электронов. Исследуемый объект максимально очищают от посторонних примесей, наносят на пленку-подложку, предварительно помещенную на опорную металлическую сеточку, и изучают в электронном микроскопе.

## Контрольные вопросы

1. Принципы организации и режим работы бактериологической, серологической и вирусологической лабораторий. Какое оборудование используют в лабораториях?

2. Назначение автоклава, сушильного шкафа, термостата, центрифуги.

3. Правила работы с биологическим микроскопом. Как следует производить установку препарата на резкость?

4. Принцип метода фазово-контрастной микроскопии. Преимущества фазово-контрастной микроскопии.

5. Принцип темнопольного метода микроскопии.

6. Устройство люминесцентного микроскопа. Какие флюорохромы применяют для окраски препаратов при люминесцентной микроскопии?

7. Как устроен электронный микроскоп? Методы приготовления электронно-микроскопических препаратов бактерий и вирусов.

## МОРФОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

В данной главе рассматриваются морфологические особенности основных представителей многообразного мира микроорганизмов: бактерий, актиномицетов, спирохет, микоплазм, риккетсий, грибов, вирусов животных и людей, вирусов бактерий (фагов).

### Тема 2. МОРФОЛОГИЯ И СТРУКТУРА БАКТЕРИЙ

#### Программа трех занятий

1. Формы бактерий и методы их изучения.
2. Ультраструктура бактериальных клеток.
3. Простые и сложные методы окраски.

Бактерии — одноклеточные организмы, которые относятся по современной классификации Берджи (1976) к разным семействам. Они имеют разнообразную форму и довольно сложную структуру, определяющую многообразие их функциональной деятельности. Для бактерий характерны три основные формы: сферическая (шаровидная), цилиндрическая (палочковидная) и извитая (рис. 11).

Шаровидные бактерии, или кокки (от греч. — «ягода»), обычно имеют правильную круглую, ланцетовидную или бобовидную форму, диаметр их равен 1—2 мкм. Кокки подразделяют в зависимости от плоскости деления и по расположению отдельных особей.

1. Микрококки (*Micrococcus*) делятся в разных плоскостях и после деления клетки разъединяются, располагаясь в препарате в виде отдельно лежащих кокков.

2. Диплококки (*Diplococcus*) делятся в одной плоскости и располагаются парами.

3. Стрептококки (*Streptococcus*) делятся в одной плоскости и располагаются в виде цепочек.

4. Тетракокки (*Tetracoccus*) делятся в двух взаимно перпендикулярных плоскостях и располагаются по четыре.

5. Сарцины (*Sarcina*) делятся в трех взаимно перпендикулярных плоскостях и располагаются в виде пакетов по 8 или 16 кокков.



6. Стафилококки (*Staphylococcus*) делятся в разных плоскостях и располагаются в виде скоплений, напоминающих виноградную гроздь.

Палочковидные микробы — бактерии (*Bacterium*), так же как и кокки, по своему расположению в препарате подразделяются на: одиночные, дипло- и стрептобактерии. Размеры бактерий колеблются — от десятых долей микрона до 10 мкм и более. К бактериям относятся и вибрионы, слегка изогнутые палочки (род *Vibrio*). Бактерии, образующие споры, называются бациллами (род *Bacillus*), или клостридиями (род *Clostridium*).

Извитые формы бактерий представляют собой изогнутые клетки. К ним относятся спирали, имеющие несколько завитков, равных одному или нескольким оборотам спирали, что придает им штопорообразный вид. Длина спиралей иногда достигает 30 мкм, чаще 5—8 мкм.

### Структура бактерий

К структурам бактериальной клетки относят жгутики, реснички, капсулу, клеточную стенку, цитоплазматическую мембрану, нуклеоид, включения, содержащиеся в цитоплазме, и споры (рис. 12).

**Жгутики** — органы движения бактериальной клетки, представляющие собой волнообразные нити, прикрепленные к цитоплазматической грануле (блефаропласту), находящейся с внутренней стороны цитоплазматической мембраны. Жгутики содержат до 98% белка-флагеллина. Расположение жгутиков может быть полярным (монотрихи, лототрихи) или перитрихальным, т. е. по всей поверхности клетки. Монотрихи являются наиболее подвижными бактериями (рис. 13).

**Реснички** (пили, фимбрии) — полые отростки шириной 0,01 мкм и длиной 0,2—2 мкм располагаются по всей поверхности бактериальной клетки. Способствуют склеиванию

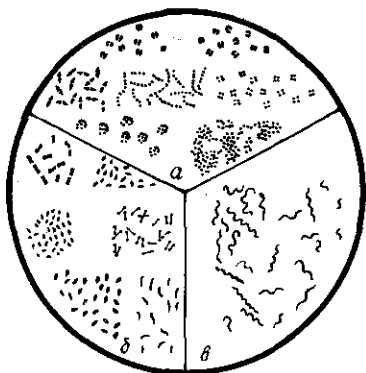


Рис. 11. Формы бактерий.

а — шаровидные; б — палочковидные; в — извитые.

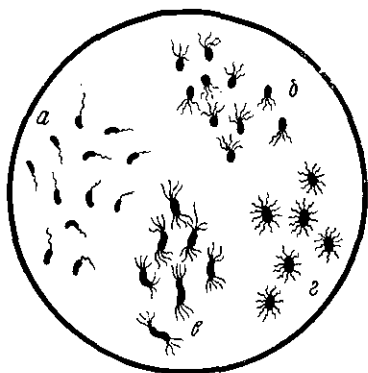


Рис. 13. Жгутики бактерий (схема).

а — монотрих; б — лофотрих; в — амфотрих; г — перитрих.

ванию бактерий друг с другом, а также абсорбции на различных клетках грибов, растений и животных (например, на эритроцитах). Реснички имеют бактерии ограниченного числа видов и родов.

**Капсула** — слизистый слой, толщиной от долей микрона до нескольких микрон, окружающий со всех сторон бактериальную клетку. Состоит из полисахаридов, полипептидов или протеидов. У одних видов бактерий она представляет собой обособленный слизистый

слой, у других — тесно прилегает к клеточной стенке. Капсула защищает микробную клетку от высыхания и от воздействия других неблагоприятных факторов среды, особенно от действия защитных факторов организма, а также от избыточного поступления воды внутрь клетки. Капсульные бактерии объединены в род *Klebsiella*. Кроме того, капсулы могут образовывать и некоторые другие патогенные бактерии.

**Клеточная стенка** — слоистая оболочка (толщиной 0,02 мкм), расположенная непосредственно под капсулой. Она определяет форму бактериальной клетки, обладает высокой прочностью, позволяющей выдерживать внутриклеточное осмотическое давление, ригидностью, обусловленной наличием в ее составе особых мукопептидов, отсутствующих в составе оболочек животных клеток, проницаемостью для солей и многочисленных низкомолекулярных соединений. В клеточной стенке бактерий различают три слоя: наружный — липопротеиновый, средний — липополисахаридный и внутренний — мукопептидный (муреиновый). У грамположительных бактерий наиболее выражен муреиновый слой, у грамотрицательных — липополисахаридный (рис. 14).

Бактериальная клетка, лишенная клеточной стенки, представляет собой протопласт, который в определенных условиях может сохранить свою жизнеспособность.

**Цитоплазматическая мембрана** — наружный слой цитоплазмы, тесно связанный с клеточной стенкой. Является

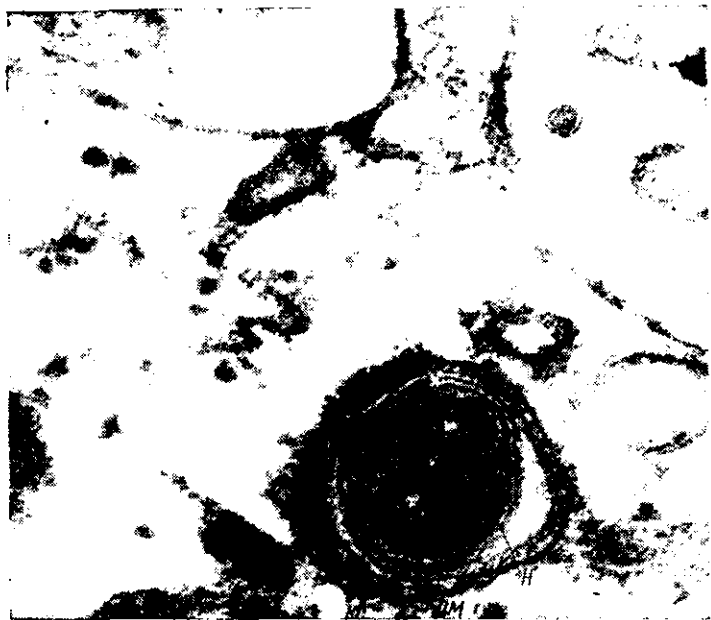


Рис. 14. Электронная микроскопия среза стафилококка.  
КС — клеточная стенка; ЦМ — цитоплазматическая мембрана; Н —  
нуклеоид.

осмотическим барьером бактериальной клетки, поддерживающим постоянное внутриклеточное осмотическое давление, в ней локализуются окислительно-восстановительные ферменты, система субстратспецифичных транспортных белков, обеспечивающих регулируемую роль цитоплазматической мембраны в процессах питания и дыхания бактериальной клетки. Цитоплазматическая мембрана содержит рибонуклеиновую кислоту (РНК) и липоиды, представленным главным образом фосфолипидами.

Цитоплазма составляет основную массу живого вещества бактериальной клетки. В ней находятся ядерные элементы и различные включения, в том числе те, которые выполняют функции митохондрий (мезосомы) и рибосом. Количество рибосомальных гранул в одной бактериальной клетке достигает 50 000. К включениям цитоплазмы относятся волютин, включения липидов, углеводов, серы, железа и других веществ.

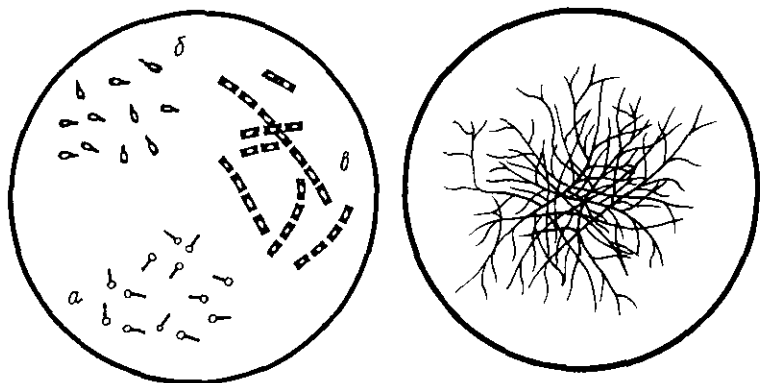


Рис. 15. Споры бактерий (схема). Рис. 16. Актиномицеты.  
*а* — терминальное расположение; *б* — субтерминальное; *в* — центральное.

**Нуклеоид** или ядро у бактерий представляет собой нить дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), в которой заключена наследственная информация бактериальной клетки. В отличие от животных и растительных клеток, нуклеоид не окружен ядерной мембраной и имеет вид округлого зернистого или волокнистого образования на электронно-микроскопических фотографиях.

**Споры** — овальные или сферические образования, окруженные многослойной оболочкой. Бактериальная клетка способна образовать только одну спору, которая служит для выживания и сохранения вида, так как очень устойчива к неблагоприятным воздействиям внешней среды (высокая температура, высушивание). Эта способность связана с высоким содержанием кальция и с полным отсутствием свободных молекул воды.

Споры могут быть расположены в центре бактериальной клетки (центральное расположение), на ее конце (терминальное расположение) и между центром и концом (субтерминальное расположение) (рис. 15).

Споры образуют бактерии, принадлежащие к семейству Bacillaceae, и редко другие микроорганизмы — при неблагоприятных условиях среды.

Для изучения морфологии бактерий из них готовят нативные (прижизненные) препараты и фиксированные мазки, которые окрашивают анилиновыми красителями. В основе окраски лежат сложные химические и физико-хи-

мические процессы взаимодействия компонентов микробной клетки с анилиновыми красителями. Бактериальные клетки имеют отрицательный электрический заряд. Для окраски микроорганизмов используют главным образом основные красители: метиленовый синий, кристаллический фиолетовый, веэувин и др. Для выявления различных структурных элементов бактериальной клетки применяют нейтральные и кислые краски.

Различают простые и сложные окраски. Отношение микробов к красителям определяет их тинкториальные свойства.

### Морфология актиномицетов

Актиномицеты (*Actinomyces*) — нитевидные ветвящиеся микроорганизмы — относятся к порядку *Actinomycetales* семейству *Actinomycetaceae*, роду *Actinomyces*. Обладают свойствами бактерий и грибов. Их сходство с бактериями состоит в примерно одинаковом диаметре клеток (около 1 мкм), которые у актиномицетов имеют вид сравнительно длинных и ветвящихся нитей (рис. 16). Кроме того, актиномицеты лишены ядерной мембраны и имеют недифференцированное ядро, клеточная стенка содержит мукопептиды, некоторые виды обладают жгутиками бактериального типа. Вместе с тем вегетативные клетки актиномицетов, так же как и у грибов, представляют собой мицелий (гифы) с истинным ветвлением. Актиномицеты размножаются спорами, которые отделяются от мицелия.

### Демонстрация

1. Методика приготовления мазков из бактериальных культур и их окраска.
2. Различные морфологические формы бактерий в препаратах-мазках, окрашенных простыми методами.
3. Подвижность бактерий в препарате «висячая» капля.
4. Мазок из смеси бактерий. Окраска по методу Грама.
5. Препарат актиномицета. Окраска по методу Грама.
6. Мазок из чистой культуры капсульных бактерий. Окраска по методу Бурри — Гинса.
7. Мазок из чистой культуры дрожжей, содержащих зерна волютина. Окраска по методу Нейссера.
8. Мазок из чистой культуры спорообразующих бактерий. Окраска по методу Ожешки.
9. Мазок из чистой культуры кислотоустойчивых бактерий. Окраска по методу Циля — Нильсена.
10. Методика определения размеров микробной клетки с техникой градуировки окулярного микрометра по объект-микрометру.
11. Структурные элементы бактериальной клетки на электрофотографических микрофотографиях.

## Задание студентам для выполнения лабораторной работы

1. Определить форму клеток неизвестной бактериальной культуры, используя простой метод окраски.
2. Определить форму клеток и отношение к окраске по Граму разных бактерий, содержащихся в смеси бактериальных культур.
3. Определить наличие спор, зерен волютина и кислотоустойчивость исследуемой микробной культуры, используя соответствующие методы окраски.
4. Определить подвижность исследуемых бактерий. Составить протокол и сделать заключение по результатам проведенных исследований (см. с. 34).

### Методические указания

#### Приготовление препаратов для микроскопического исследования

**Взятие материала для исследования.** Для приготовления препарата исследуемый материал берут бактериологической петлей (предварительно простерилизованной в пламени горелки), или двумя препаровальными иглами (простерилизованными таким же образом), или стерильной пипеткой.

При взятии материала из пробирки с бактериальной культурой петлю прожигают в пламени горелки до покраснения, держа ее в правой руке за петледержатель. Затем берут пробирку в левую руку, так, чтобы видеть всю поверхность питательной среды; вращательным движением вынимают из нее ватную пробку, прижимая мизинцем и безымянным пальцем правой руки к ладони, и обжигают край пробирки. Вводят петлю в пробирку, охлаждая ее о внутреннюю поверхность, после чего легким скользящим движением набирают посевной материал; вынимают петлю из пробирки, вновь обжигают ее край и закрывают пробкой. После приготовления препарата петлю стерилизуют в пламени. Жидкий материал из пробирки набирают пипеткой, держа ее в правой руке и закрывая отверстие указательным пальцем.

**Приготовление препаратов для изучения микроорганизмов в живом состоянии.** Метод «висячей» капли. Используют стекла с лункой и покровные стекла. Край покровного стекла смазывают вазелином, а в центр наносят одну каплю бактериальной культуры. Затем предметное стекло лункой вниз прижимают к покровному стеклу, так, чтобы капля находилась в центре лунки. Быстрым движением переворачивают препарат покровным стеклом вверх.

В правильно приготовленном препарате капля должна свободно висеть над лункой, не касаясь ее дна или края. Используя малый сухой объектив 8, находят край капли, затем устанавливают объектив 40 и микроскопируют.

**Метод «раздавленной» капли.** На поверхность чистого предметного стекла наносят каплю исследуемого материала или суспензию бактерий и покрывают ее покровным стеклом. Капля должна быть небольшой и не выходить за края покровного стекла. Микроскопируют препарат с объективом 40.

**Прижизненная (витальная) окраска.** Взвесь микробов вносят в каплю 0,001% раствора метиленового синего или нейтрального красного. Затем приготавливают препарат «висячей» или «раздавленной» капли и микроскопируют.

После микроскопии препаратов в «раздавленной» или «висячей» капле стекла опускают в дезинфицирующий раствор.

**Приготовление фиксированных препаратов-мазков.** Для приготовления препарата на чистое и обезжиренное предметное стекло наносят каплю воды или физиологического раствора, в которую петлей вносят исследуемый материал и распределяют его на предметном стекле так, чтобы получить тонкий и равномерный мазок диаметром около 1—1,5 см. Если исследуемый материал содержится в жидкой среде, то петлей этот материал непосредственно наносят на предметное стекло.

Высушивают мазок на воздухе или в струе теплого воздуха над пламенем горелки.

Для фиксации мазка предметное стекло (мазком вверх) проводят несколько раз в течение 5—6 с через пламя горелки. Микроорганизмы при фиксации погибают, плотно прикрепляясь к поверхности стекла, и не смываются при дальнейшей обработке. Более длительное нагревание может вызвать деформацию клеточных структур. Мазки крови, мазки-отпечатки органов и тканей и в некоторых случаях мазки из культур микроорганизмов фиксируют специальными жидкостями (метиловым спиртом, этиловым спиртом, смесью Никифорова, сулемовым спиртом и др.).

### Методы окраски мазков

Для проведения простой окраски фиксированный мазок окрашивают каким-либо одним красителем: фуксином водным (1—2 мин), метиленовым синим (3—5 мин) или

другим, промывают водой, высушивают и микроскопируют.

При сложных методах окраски на препарат последовательно наносят красители, различающиеся по химическому составу и цвету, что позволяет выявить определенные структуры клеток и дифференцировать одни виды микроорганизмов от других.

**Окраска по методу Грама.** 1. Фиксированный мазок окрашивают генциановым фиолетовым 1—2 мин через полоску фильтровальной бумаги, затем ее снимают и краситель сливают.

2. Наносят раствор Люголя и через 1—2 мин раствор сливают.

3. Обесцвечивают препарат этиловым спиртом в течение 30—60 с до прекращения отхождения фиолетовых струек красителя.

4. Промывают водой.

5. Окрашивают водным фуксином 1—2 мин, промывают водой, высушивают и микроскопируют.

Грамположительные бактерии окрашиваются в темно-фиолетовый цвет, грамотрицательные — в красный (рис. 17).

Отношение бактерий к окраске по Граму определяется их способностью удержать образовавшийся в процессе окраски комплекс генцианового фиолетового и йода. У грамположительных бактерий основным веществом клеточной стенки являются мукопептиды-муреин (до 90%), у грамотрицательных бактерий однослойный муреин располагается в глубине стенки, значительно больше содержится белков и липидов, которые вместе с полисахаридами образуют поверхностные слои в виде мозаики, их цитоплазма содержит РНК и ДНК в соотношении 8:1 и 1:1 соответственно. Кроме того, проницаемость клеточной стенки у грамположительных бактерий меньше, чем у грамотрицательных. Это объясняется большим содержанием мукопептида в составе клеточной стенки грамположительных бактерий и меньшим диаметром пор, что способствует удержанию образовавшегося комплекса при обработке бактерий этиловым спиртом.

**Окраска кислотоустойчивых бактерий по методу Циля — Нильсена.** 1. Фиксированный мазок окрашивают карболовым фуксином через полоску фильтровальной бумаги с подогреванием до появления паров в течение 3—5 мин.

2. Снимают бумагу и после охлаждения стекла промывают мазок водой.



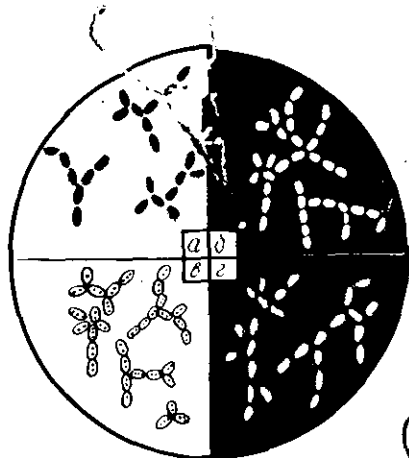


Рис. 7. Культура дрожжей *Sacharomyces cerevisiae* при разных методах микроскопии (к стр. 15).

а — микроскопия мазка, окрашенного метиленовым синим; б — темновольная микроскопия; в — фазово-контрастная микроскопия; г — люминесцентная микроскопия, окраска корифосфином.

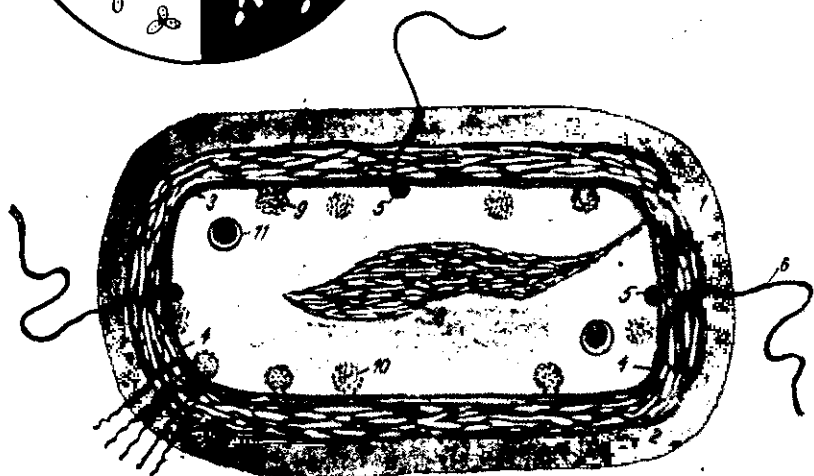
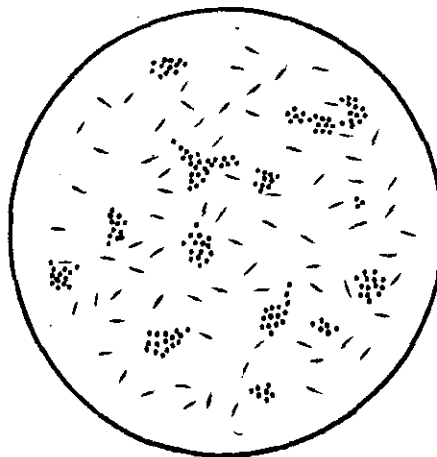


Рис. 12. Строение бактериальной клетки (схема) (к стр. 25).

1 — капсула; 2 — клеточная стенка; 3 — цитоплазматическая мембрана; 4 — протопласт; 5 — базальное тельце; 6 — жгутик; 7 — реснички (пили); 8 — нуклеотид; 9 — мезосомы (эквиваленты митохондрий); 10 — рибосомы; 11 — включения волютина, жира, полисахаридов.

Рис. 17. Смесь стафилококков и кишечных палочек. Окраска по Граму (к стр. 32).



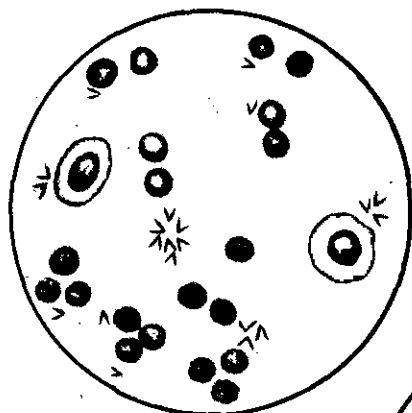


Рис. 18. Туберкулезные микобактерии в мокроте. Окраска по Цилю — Нильсену (к стр. 33).

Рис. 19. Споры и вегетативные клетки бацилл сибирской язвы (к стр. 33).

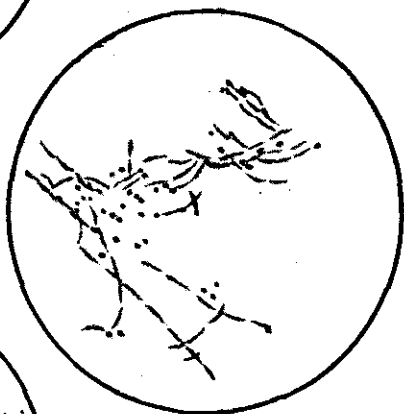


Рис. 20. Коринебактерии дифтерии. Окраска по Нейссеру. Видны зерна волютина (к стр. 33).

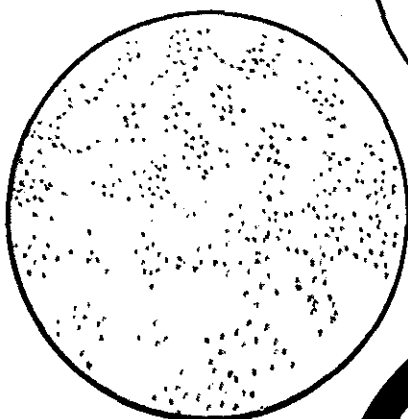
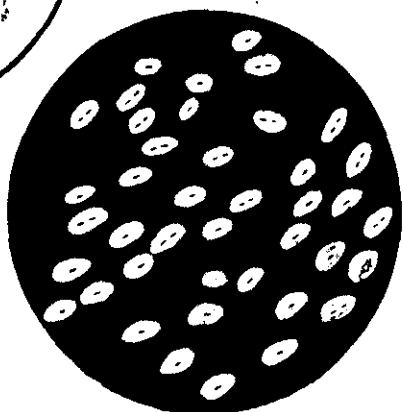


Рис. 21. Капсула у бактерии Фридлендера. Окраска по Бурри — Гинсу (к стр. 34).



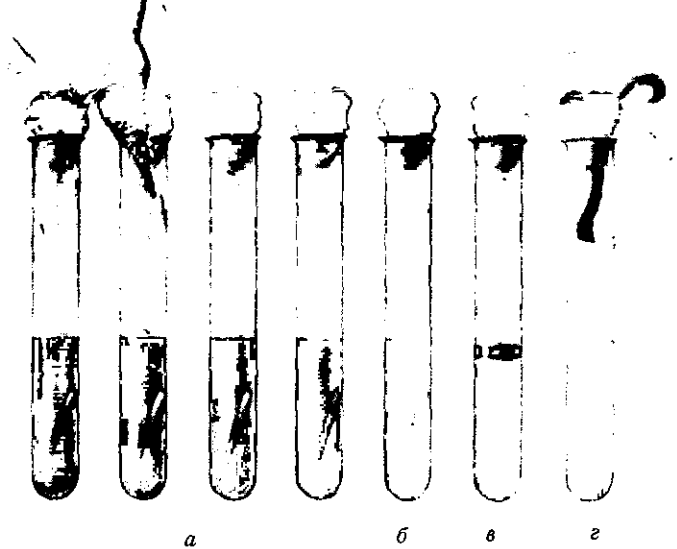


Рис. 35. «Пестрый» ряд (к стр. 69).

*a* — ферментация углеводов до кислоты и газа; *б* — отсутствие ферментации; *в* — индолообразование; *г* — образование сероводорода.



Рис. 45. Рост колоний кишечной палочки на мембранных фильтрах в чашках со средой Эндо (к стр. 92).

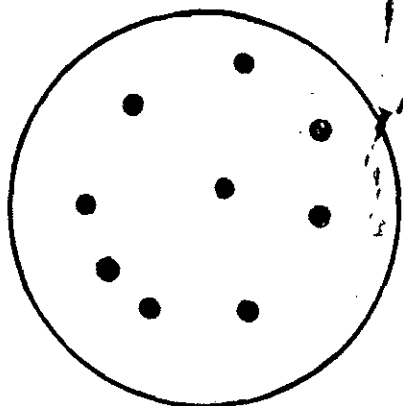


Рис. 46. Определение чувствительности бактерий к антибиотикам методом дисков (к стр. 101).

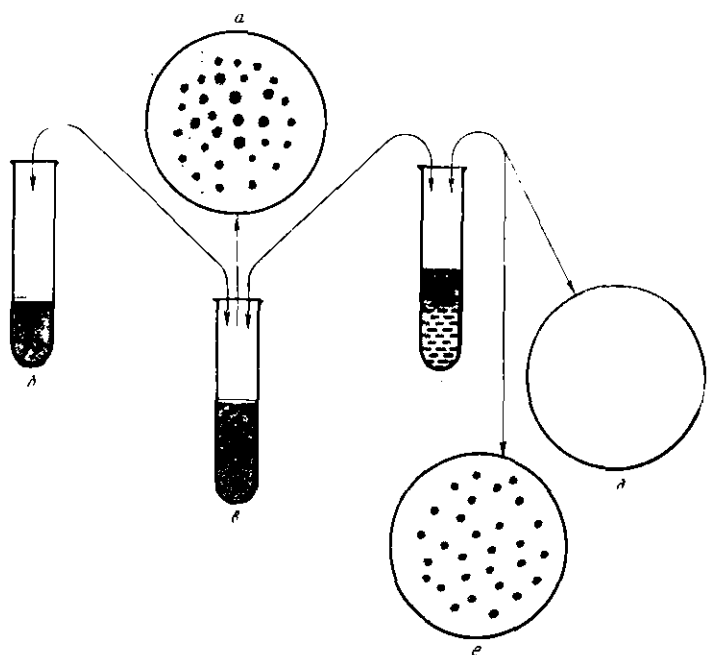


Рис. 48. Схема постановки опыта трансформации (к стр. 108).

*a* — рост трансформантов на селективной среде со стрептомицином; *б* — раствор ДНК, выделенный из *B. subtilis sm<sup>f</sup>*; *в* — контакт реципиентных бактерий с ДНК; *г* — реципиент *B. subtilis sm<sup>s</sup>*; *д* — высев на селективную среду со стрептомицином; *е* — высев на среду без стрептомицина.

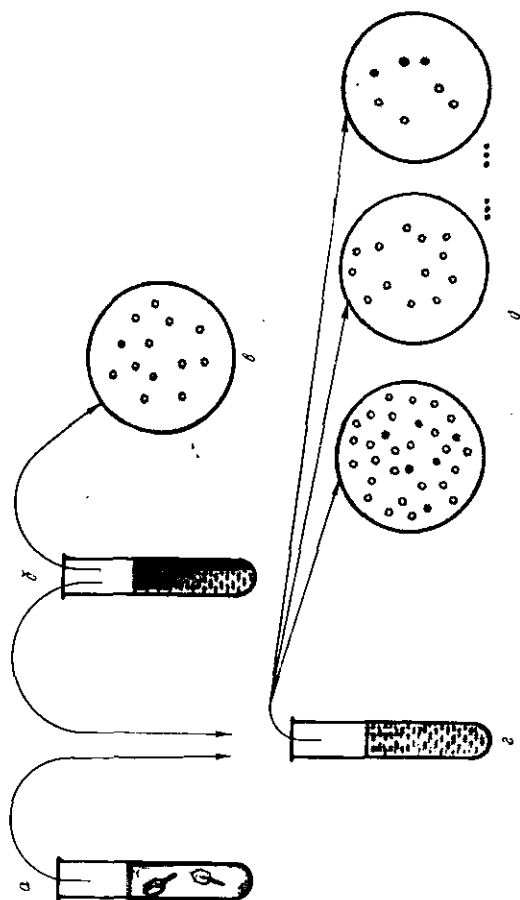


Рис. 49. Схема постановки опыта специфической трансдукции (к стр. 108).  
 а — фаг  $\lambda$  dg; б — реципиент *E. coli* lac<sup>-</sup>; в — рост колоний реципиентного штамма на среде Эндо; г — зараженный трансдуцирующим фагом  $\lambda$  dg культура *E. coli* lac<sup>-</sup>; д — рост колоний трансдуктантов, несущих ген gal на среде Эндо.

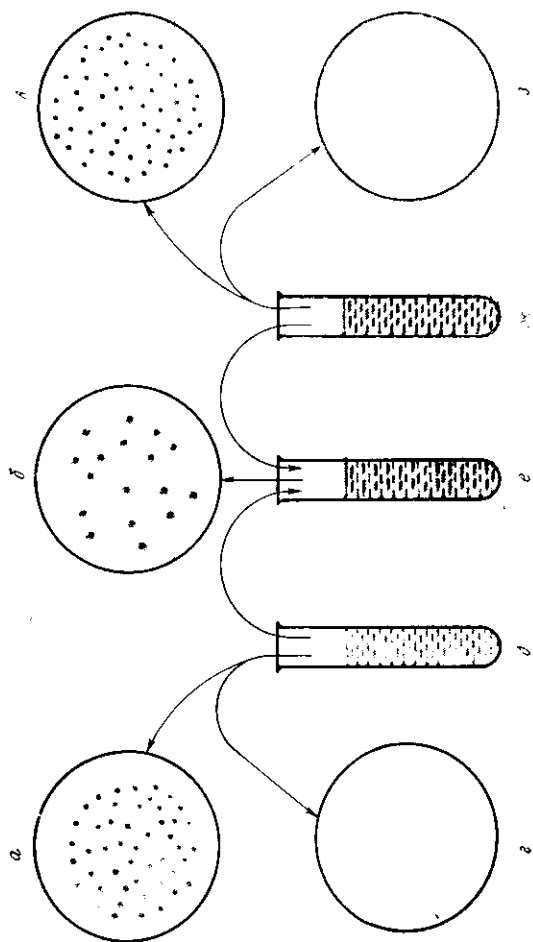


Рис. 50. Схема постановки опыта конъюгации (к стр. 109).

а — колонии на минимальной среде без стрептомицина; б — колонии рекомбинантов на селективной среде со стрептомицином без лейцина; в — колонии на полной среде со стрептомицином; г — отсутствие роста на селективной среде со стрептомицином; д — донор — культура *E. coli* Hg; е — контакт между донорскими и реципиентными бактериями; ж — реципиент культуры *E. coli* F<sup>-</sup>, Leu<sup>-</sup>Sm<sup>r</sup>; з — отсутствие роста на селективной среде со стрептомицином без лейцина.

Рис. 54. Фагоцитоз стафилококков (к стр. 120).

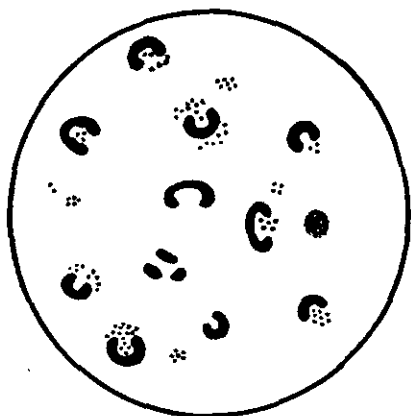


Рис. 55. Кожно-аллергическая проба (к стр. 125).

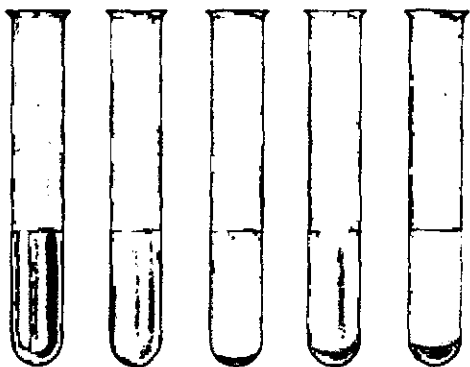


Рис. 66. Титрование гемолитической сыворотки (к стр. 140).

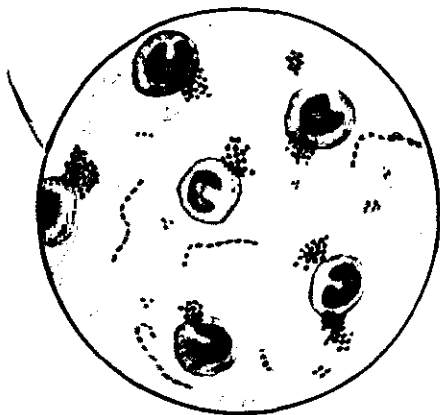


Рис. 67. Стафилококки и стрептококки в гное. Окраска по Граму (к стр. 149).

Рис. 68. Колонии стафилококков на кровяном агаре (к стр. 149).

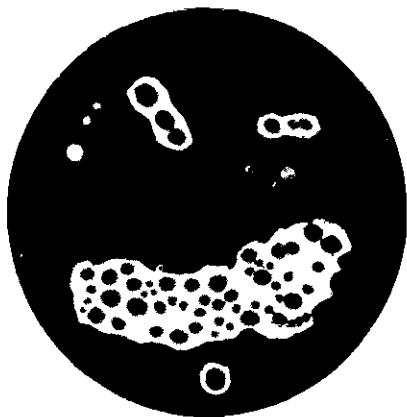


Рис. 69. Пневмококк в мокроте. Окраска по Граму (к стр. 154).



3. Обесцвечивают препарат 5% серной кислотой или 3% солянокислым спиртом.

4. Промывают водой.

5. Окрашивают метиленовым синим 3—5 мин.

6. Промывают водой, высушивают и микроскопируют.

Кислотоустойчивость обусловлена наличием в клеточной стенке и цитоплазме бактерий повышенного количества липидов, воска и оксикислот, в частности миколовой кислоты. Карболовая кислота разрыхляет клеточную стенку и тем самым повышает ее тинкториальные свойства, а высокая концентрация красителя и нагревание в процессе окраски усиливают реакцию взаимодействия бактериальных клеток с красителями, которые окрашиваются при этом в красный цвет. При обработке препарата серной кислотой некислотоустойчивые бактерии обесцвечиваются и окрашиваются метиленовым синим в голубой цвет (рис. 18).

**Окраска спор по методу Ожешки.** 1. На нефиксированный мазок наносят 0,5% раствор соляной кислоты и подогревают на пламени горелки 2—3 мин. *нел*

2. Кислоту сливают, препарат промывают водой, просушивают и фиксируют над пламенем. *но*

Далее препарат окрашивают по способу Циля — Нильсена. Споры бактерий окрашиваются в красный цвет, а вегетативные формы — в синий (рис. 19).

**Окраска зерен волютина по методу Нейссера.** 1. Фиксированный мазок окрашивают ацетатом синьки Нейссера в течение 2—3 мин.

2. Наносят раствор Люголя на 10—30 с.

3. Промывают препарат водой.

4. Окрашивают везувином или хризоидином в течение 0,5—1 мин.

5. Промывают водой, высушивают и микроскопируют.

Зерна волютина представляют собой соединения, имеющие в отличие от цитоплазмы щелочную реакцию и поэтому избирательно воспринимают ацетат синьки, окрашиваясь (в темно-синий цвет). Цитоплазма клетки, обладающая кислой реакцией, воспринимает щелочной краситель — везувин и окрашивается в (желтый цвет) (рис. 20).

**Окраска капсул по методу Бурри — Гинса.** 1. Приготавливают тушевой препарат по Бурри. Для этого смешивают каплю взвеси микробов с каплей туши и при помощи стекла со шлифованным краем готовят мазок (так же, как приготавливают мазки из крови, см. с. 41); затем его высушивают и фиксируют.

2. Окрашивают водным фуксином в течение 1—2 мин.
3. Промывают водой, высушивают на воздухе и микроскопируют.

Бактерии окрашиваются в красный цвет, неокрашенные капсулы контрастно выявляются на черно-розовом фоне (рис. 21).

### Измерение микробов

Для характеристики размеров микроскопических объектов употребляются следующие единицы: микроны (мкм),  $1 \text{ мкм} = 0,001 \text{ мм}$ ; миллимикроны (ммкм),  $1 \text{ ммкм} = 0,001 \text{ мкм} = 1 \text{ нм}$ .

Размеры бактерий и многих других микроорганизмов принято выражать в микронах, размеры вирусов и субмикроскопических структурных элементов — в миллимикронах (нанометрах).

Для измерения микробов применяются окуляр-микрометр и объект-микрометр. Окуляр-микрометр служит для непосредственного измерения объекта и представляет собой стеклянную пластинку, в центральной части которой нанесена шкала с 50 делениями. Объект-микрометр представляет собой предметное стекло, в середине которого имеется эталонная шкала, разделенная на 100 частей. Цена деления шкалы известна и указана на стекле. Обычно каждое деление шкалы объект-микрометра равно 10 мкм.

Результаты работ по изучению бактериальной культуры протоколируют по прилагаемой форме (табл. 1).

Таблица 1

Характеристика культуры по морфологическим и тинкториальным признакам

Форма клеток	Величина	Окраска по Граму	Подвижность	Наличие			Кислотоустойчивость	Заключение
				споры	капсулы	веревчатина		

### Контрольные вопросы

1. Какие принципы положены в основу классификации микроорганизмов? Какие признаки относят к таксономическим?

2. Морфологические формы бактерий и их отличия друг от друга.
3. Структура, химический состав и функции клеточной стенки бактерий. В чем состоят различия в строении клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий?
4. Роль капсулы в жизнедеятельности бактериальной клетки. Ее химический состав.
5. В чем состоит процесс образования спор у бактерий? Структура и химический состав споры.
6. Химический состав и функции цитоплазматической мембраны.
7. Что такое протопласт? В каких условиях он образуется и может сохранять свою жизнеспособность?
8. В каких органоидах цитоплазмы бактериальной клетки происходят энергетические процессы и синтез белка?
9. Химический состав, организация и функция бактериального ядра. Сколько хромосом у бактериальной клетки?
10. Строение, химический состав и функции жгутиков бактериальной клетки. Определение подвижности бактерий.
11. Строение и функции ресничек у бактерий.
12. Какие включения могут содержаться в цитоплазме бактериальной клетки? Их роль в жизнедеятельности бактерий.
13. Какие Вам известны методы изучения морфологии бактерий? Преимущества исследования бактерий в живом состоянии, в фиксированных окрашенных препаратах—мазках и в электронном микроскопе.
14. Механизм окраски по Граму.
15. Механизм окраски по Цилю—Нильсену и Бурри—Гинсу.
16. Морфологические особенности актиномицетов. В чем состоят их сходство и различия с бактериями и грибами?

### Тема 3. МОРФОЛОГИЯ ГРИБОВ

#### Программа занятия

1. Морфология плесневых грибов, дрожжеподобных грибов.
2. Методы изучения морфологии грибов.

Грибы — растительные организмы, имеющие как макро-, так и микроскопические размеры и характеризующиеся следующими основными свойствами: наличием дифференцированного ядра, отсутствием хлорофилла, размножением спорами, наличием у большинства видов вегетативных органов — гиф, которые, переплетаясь, образуют мицелий.

Грибы подразделяются на пять основных классов: архимицеты, фикомицеты, аскомицеты, адономицеты или несовершенные грибы и дрожжеподобные грибы, которые отличаются друг от друга по типу мицелия, по наличию и строению органов плодоношения, типу спор и другим признакам.

У грибов различают субстратный мицелий, погруженный в питательную среду, и мицелий воздушный, растущий на ее поверхности. Многие грибы имеют септированный (мно-

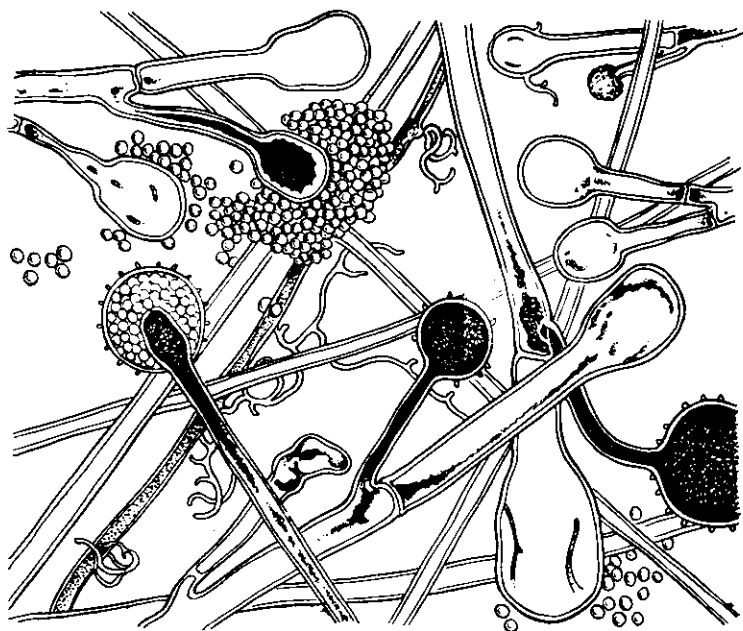


Рис. 22. Мукоровая плесень (*Mucor*).

гоклеточный) мицелий, гифы которого разделены внутренними перегородками — септами; для других грибов характерен несептированный мицелий.

Споры грибов располагаются внутри мицелия (эндоспоры) или вне его (экзоспоры). Среди гифов выделяют так называемые плодоносящие (спороносные) гифы. Так, например, у мукоровой плесени (*Mucor*) плодоносящие гифы — спорангиеносцы на конце имеют расширение — спорангии, внутри которых находятся эндоспоры. Плодоносящие гифы грибов рода *Aspergillus* и *Penicillium* называются конидиеносцами. На их концах помещаются небольшие клетки — стеригмы, на которых свободно располагаются цепочки конидий (экзоспоры). У некоторых грибов споры покрыты толстой двуконтурной оболочкой (хламидоспоры) и располагаются внутри нити мицелия или на ее конце. Существуют и другие типы спор, отличающихся друг от друга по происхождению, структуре и расположению в мицелии гриба (рис. 22—24).

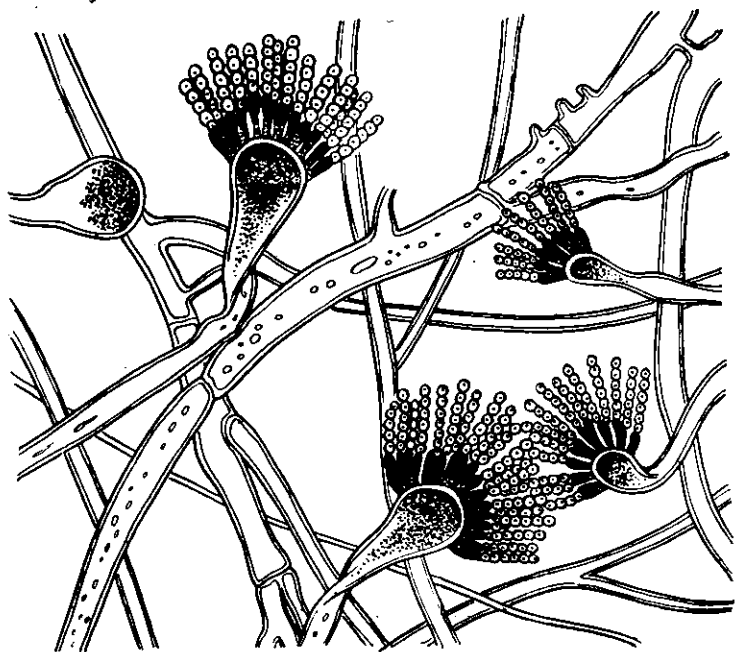


Рис. 23. Леечная плесень (*Aspergillus*).

Дрожжевые грибы представляют собой крупные клетки овальной, шаровидной и палочковидной формы: они не образуют мицелия и размножаются различными путями: почкованием, делением, половым путем и эндоспорами, которые располагаются в особых сумках (асках) и называются аскоспорами. Бластоспорами называют экзоспоры дрожжевых или других грибов, образующиеся в результате почкования материнской клетки.

Дрожжеподобные грибы не образуют истинного мицелия. Однако при размножении клетки дрожжеподобных грибов располагаются цепочками и вытягиваются в длинные нити, которые называются псевдомицелием.

#### Демонстрация

1. Методика приготовления препаратов из культур грибов.
2. Препараты дрожжеподобных грибов, окрашенные метиленовым синим.

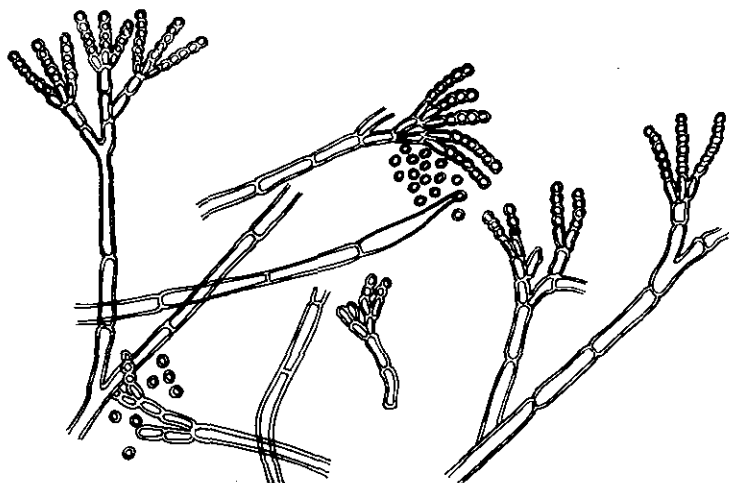


Рис. 24. Зеленая плесень — кистевик (*Penicillium*).

**Задание студентам  
для выполнения лабораторной работы**

Определить родовую принадлежность плесневых грибов на основании особенностей строения мицелия, плодоносящих гиф и спор, пользуясь табл. 2.

Таблица 2

**Морфологические признаки плесневых грибов**

Наименование рода	Мицелий	Плодоносящие гифы	Тип спор	Расположение спор	
<i>Mucor</i>	Несептированный	Несептированный спорангионосец	Эндоспоры	В спорангии	
<i>Aspergillus</i>	Септированный	Несептированный конидионосец	Экзоспоры (конидии)	Свободное расположение на концах ответвлений плодоносящих гиф	В виде «лейки»
<i>Penicillium</i>	Септированный	Септированный конидионосец	Экзоспоры (конидии)	Свободное расположение на концах ответвлений плодоносящих гиф	В виде «кисточек»

## Методические указания

При приготовлении препарата «раздавленная» капля препаративными иглами отделяют небольшой участок мицелия с плодоносящими гифами и прилегающим к нему тонким слоем питательной среды. Материал помещают в каплю воды на предметном стекле, иглой расправляют мицелий, придавливают покровным стеклом и микроскопируют при опущенном конденсоре.

Препарат просматривают с объективом 8, а затем с объективом 40.

Предварительно колонии или культуры грибов микроскопируют непосредственно на чашках или в пробирках под малым увеличением.

Результаты работ по изучению плесневых грибов протоколируются в таблице с учетом дифференциальных морфологических признаков (табл. 2).

### Контрольные вопросы

1. Морфология плесневых грибов. Основные отличительные признаки грибов родов *Mucor*, *Aspergillus* и *Penicillium*.

2. Морфологические особенности дрожжей и дрожжеподобных грибов. Чем они отличаются между собой и от бактерий?

3. Объясните значение терминов: мицелий, псевдомицелий, гифы, септы, плодоносящие гифы, спорангиеносец, конидии, споры, хламидоспоры.

4. Как происходит размножение плесневых грибов, дрожжей и дрожжеподобных грибов?

## Тема 4. МОРФОЛОГИЯ СПИРОХЕТ

### Программа занятия

1. Морфологические и тинкториальные признаки спирохет.
2. Дифференцирование спирохет по морфологическим признакам.

Спирохеты — извитые подвижные микроорганизмы, которые относятся к порядку *Spirochaetales*, семейство *Spirochaetaceae* и включают 3 рода (табл. 3). Спирохеты обладают признаками истинных бактерий и простейших. Первых они напоминают отсутствием компактного ядра. Со вторыми их сближает фибриллярность структуры цитоплазмы,

## Морфологические признаки патогенных спирохет

Наименование родов спирохет	Количество завитков	Характер завитков	Характер движения	Окраска по Романовскому—Гимзе
Borrelia	3—10	Крупные, неравномерные	Толчкообразное	Сине-фиолетовая
Treponema	8—12	Мелкие, равномерные	Плавное, медленное, разнообразное	Бледно-розовая
Leptospira		Многочисленные первичные завитки; вторичные завитки в виде буквы S с пугочатыми утолщениями на концах	Очень активное, разнообразное	Розовато-сиреневая

отсутствие клеточной стенки и наличие перипластоподобного образования, напоминающего оболочку клеток животных организмов. Цитоплазма спирохет вокруг эластичной осевой нити образует первичные завитки. Изгибы осевой нити представляют собой вторичные завитки.

Движение спирохет происходит в виде поступательного перемещения вперед, сгибания и вращения вокруг продольной оси. Количество завитков, как и характер движения, имеет важное значение для характеристики каждого рода этих микроорганизмов (рис. 25).

Спирохеты так же, как и простейшие, плохо окрашиваются анилиновыми красителями. Для их дифференцирования применяют краску Романовского — Гимзы.

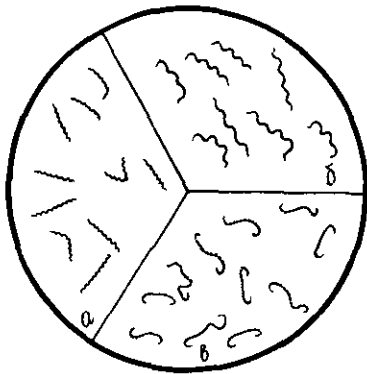


Рис. 25. Морфология спирохет (схема).

а — трепонемы; б — боррелии; в — лептоспиры.



## Демонстрация

1. Движение лептоспир в темнопольном микроскопе.
2. Препарат лептоспир. Негативная окраска по Бурри.
3. Препарат бледной трепонемы. Негативная окраска по Бурри.
4. Препарат боррелий в толстой капле крови. Окраска по Романовскому — Гимзе.

### Задание студентам для выполнения лабораторной работы

1. Определить родовую принадлежность спирохеты в готовом мазке, окрашенном по методу Романовского — Гимзы, используя данные, изложенные в табл. 3.

## Методические указания

Морфологию спирохет изучают в препаратах «раздавленная» капля и в мазках, окрашенных по методу Романовского — Гимзы. Нативные препараты микроскопируют в темном поле или с помощью фазово-контрастной микроскопии, наблюдая за активным и характерным движением спирохет и особенностями их формы.

**Приготовление мазков из крови.** На чистое обезжиренное предметное стекло ближе к одному из его концов помещают каплю крови. Другое предметное стекло, имеющее шлифованный край, прижимают под углом  $45^\circ$  к капле крови, а затем скользящим движением передвигают его к свободному концу первого стекла. При этом кровь распределяется по предметному стеклу тонким слоем. Высушивают препарат на воздухе, фиксируют в жидком фиксаторе (метиловом спирте, смеси этилового спирта и эфира).

Для приготовления «толстой» капли на предметное стекло наслаивают 2—3 капли крови, распределяя ее по стеклу до величины 10-копеечной монеты. После высушивания на воздухе осторожно наливают несколько капель дистиллированной воды на 10—15 мин для удаления гемоглобина из эритроцитов.

**Окрашивание препаратов по методу Романовского — Гимзы.** Краска Романовского — Гимзы состоит из метиленового синего, эозина и азура. На мазок наносят рабочий раствор красителя (2 капли красителя на 1 мл дистиллированной воды) на 10—20 мин. Затем препарат промывают водой и высушивают на воздухе. По Романовскому — Гимзе спирохеты возвратного тифа окрашиваются в фиолетовый цвет, эритроциты крови — в розовый, ядра лейкоцитов — в фиолетовый.

## Контрольные вопросы

1. Какое положение в систематике микроорганизмов занимают спирохеты?
2. Морфологические особенности спирохет.
3. Какие методы применяются для изучения морфологии спирохет?
4. Чем отличается подвижность спирохет от подвижности бактерий?
5. По каким морфологическим особенностям дифференцируют спирохеты рода трепонема, боррелия и лептоспира?

## Тема. 5. МОРФОЛОГИЯ МИКОПЛАЗМ, РИККЕТСИИ ХЛАМИДИЙ И ВИРУСОВ

### Программа занятия

1. Морфология микоплазм, риккетсий, хламидий и методы их изучения.
2. Ультраструктура вирусов человека, животных, растений и бактерий (фагов) и методы ее изучения.

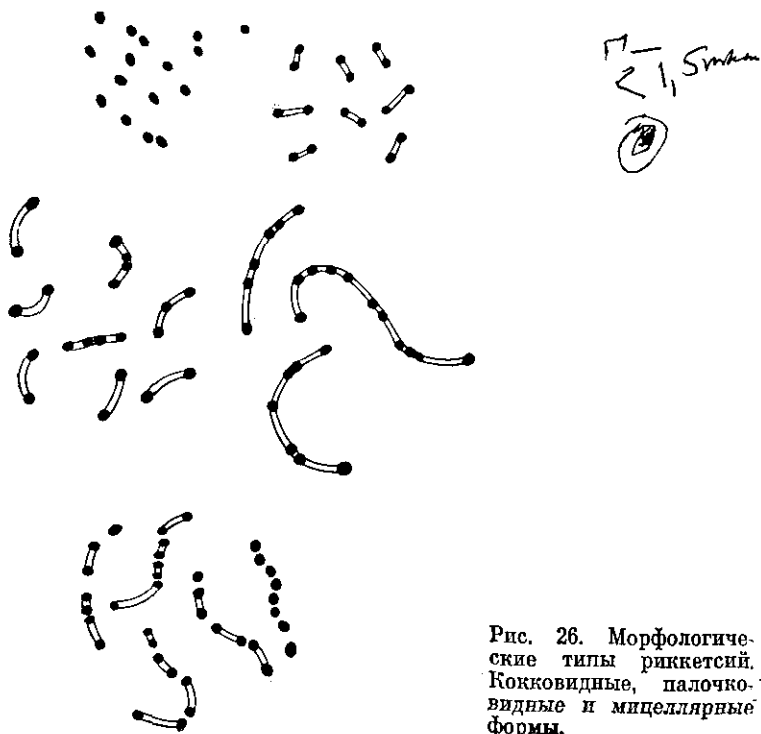


Рис. 26. Морфологические типы риккетсий. Кокковидные, палочковидные и мицеллярные формы.

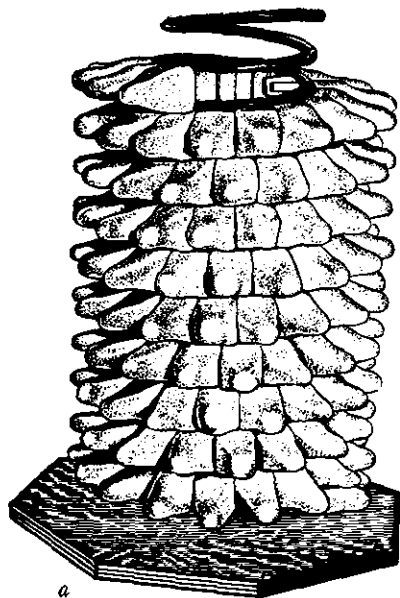
Микоплазмы принадлежат к классу Mollicutes, порядку Mucoplasmatales. Это полиморфные микроорганизмы, представляющие собой шаровидные, нитевидные и мельчайшие зернистые образования, которые имеют размеры 0,15—10 мкм. Они не имеют плотной клеточной стенки и окружены трехслойной липопротеидной цитоплазматической мембраной; содержат ДНК и РНК.

Риккетсии принадлежат к порядку Rickettsiales, семейству Rickettsiaceae. Они занимают промежуточное положение между бактериями и вирусами. Представляют собой мелкие грамотрицательные микроорганизмы, размеры которых не превышают 1,5 мкм. Отличаются выраженным полиморфизмом, образуя кокковидные, палочковидные, нитевидные формы (рис. 26). Спор и капсул не образуют. Электронно-микроскопические данные указывают на наличие у риккетсий двухслойной наружной мембраны, зернистой цитоплазмы и расположенного в ней нуклеоида, который имеет фибриллярную структуру и спиралевидную или овальную форму (рис. 27).

Хламидии относятся к порядку Chlamydiales, семейству Chlamydiaceae. Имеют различную форму (шаровидную, овоидную, палочковидную), довольно крупные размеры (не проходят через бактериальные фильтры). Перед делением частицы хламидий обволакиваются образованием, напоминающим капсулу. Размеры хламидий составляют 0,3—0,5 мкм.



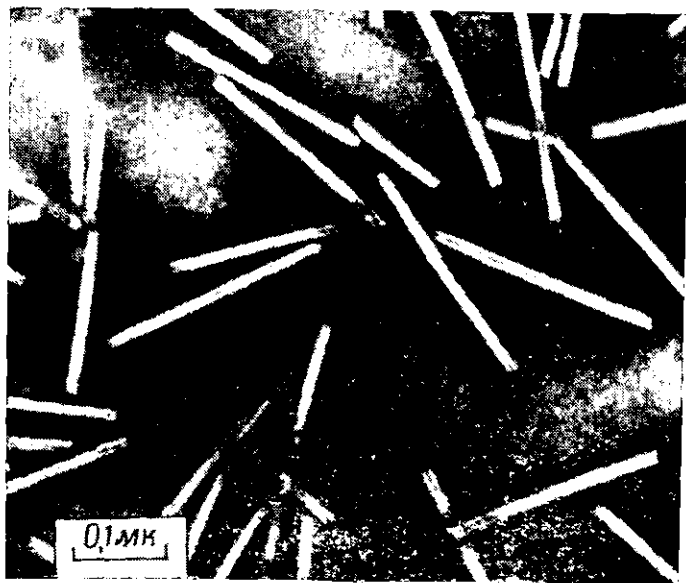
Рис. 27. Риккетсия Провачека. Электронная микроскопия.  $\times 108\ 000$ . Видны микрокапсула, клеточная стенка, представленная трехслойной мембраной, граничащей с цитоплазматической мембраной. Ядерное вещество содержится среди грапулярного компонента цитоплазмы.



a

Рис. 28. Вирус табачной мозаики.

а — модель вируса табачной мозаики. Изображен фрагмент вирусного капсида, построенного из одинаково спирально расположенных белковых субъединиц. Между субъединицами помещается полирибонуклеотидная цепочка РНК, конфигурация которой целиком определяется их спиральным расположением. На модели часть спирали РНК условно показана свободной; б — вирусоны вируса табачной мозаики. Электронная микроскопия.



**Вирусы** представляют собой отдельное «царство» — *Vira*. Они отличаются от других микроорганизмов своей структурной организацией и наличием только одного типа нуклеиновой кислоты — ДНК или РНК. Размеры вирусов колеблются от 15—20 до 300—500 мкм. Они имеют палочковидную или цилиндрическую форму (вирус табачной мозаики и многие другие вирусы растений), нитевидную форму в виде изгибающихся тонких нитей шириной около 10 мкм и длиной до 1 мкм (вирусы растений и некоторые фаги), сферическую форму, напоминающую многогранники (пикорнавирусы, аденовирусы и др.), кубовидную форму (поксвирусы) и булабовидную или сперматозоидную форму (вирусы бактерий — фаги).

Вирионы состоят из белковой оболочки — капсида, внутри которого содержится нуклеиновая кислота. Это позволило охарактеризовать вирион в морфологическом отношении как нуклеокапсид, а в химическом — как нуклеопротеид. Капсид состоит из отдельных структурных субъединиц, представляющих собой одну или несколько полипептидных цепей. Симметричные объединения (группы) структурных несимметричных субъединиц называются морфологическими единицами, или капсомерами, которые выявляются при электронной микроскопии.

Для капсидов вирионов характерны два типа симметричной укладки субъединиц: спиральная симметрия со спиральной структурой и кубическая симметрия со структурой капсида, близкой к сферонду. С помощью рентгеноструктурного анализа показано, что вирионы со спиральным типом симметрии характеризуются укладкой структурных субъединиц (белковых глобул) в форме спирали вокруг оси (рис. 28). К ним относятся вирусы табачной мозаики, некоторые арбовирусы, миксовирусы.

С помощью рентгеноструктурного анализа было доказано, что истинное число субъединиц у разных вирусов равно 60 или кратно данной величине (например, 420 у вируса полиомы, 540 у реовируса, 960 у вируса герпеса, 1500 у аденовируса) (рис. 29).

В отличие от структурных субъединиц, общее число капсомеров не кратно 60. Различия между структурными субъединицами и капсомерами состоят в том, что последние представляют собой объединения из 2, 3 или 5 структурных субъединиц, непосредственно расположенных на осях симметрии 2-го, 3-го и 5-го порядков соответственно. При этом число капсомеров равно 30, 20 или 12. Вирионы со сложным капсидом, построенным более чем из 60 структурных субъединиц, содержат группы из пяти или шести капсомеров (пентамеры или гексамеры).



Рис. 29. Аденовирус человека. Электронная микроскопия.  $\times 600\,000$ . Видны капсомеры, образующие грани и вершины икосаэдра.

Некоторые сложноустроенные вирионы имеют внешнюю оболочку, называемую суперкапсидом, или пеплосом. Она состоит из липопротеидов и во многих случаях содержит некоторые компоненты клетки хозяина и вирус-специфические белки, состоящие аналогично капсомерам из полипептидных цепей (рис. 30). Для фагов, имеющих сперматозоидную форму, характерен смешанный тип симметрии, так как их головка имеет кубический тип симметрии, а отросток — спиральный (рис. 31).

#### Демонстрация

Электронно-микроскопические фотографии микоплазм, риккетсий, хламидий и некоторых вирусов человека, животных, растений и бактерий (фагов).

#### Задание студентам для выполнения лабораторной работы

1. Изучить морфологию риккетсий в препарате, окрашенном по Романовскому — Гимзе.
2. Изучить морфологию вируса осповакцины в препарате, окрашенном по Морозову.

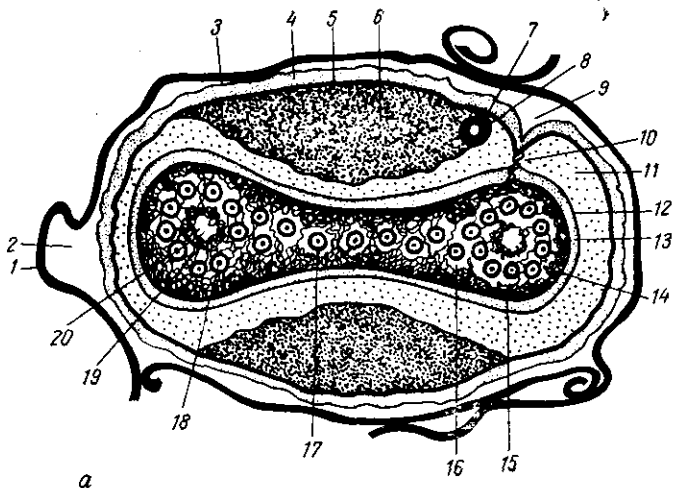
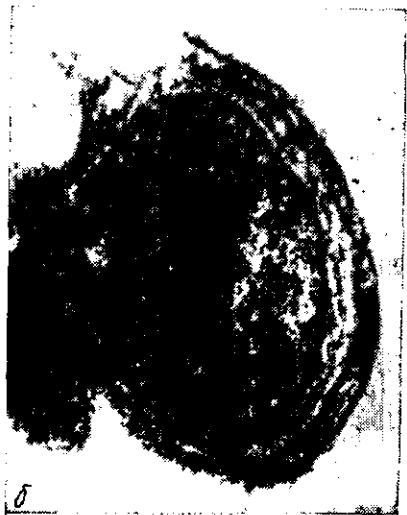


Рис. 30. Вирус оспы.

а — строение вириона оспы (схема): 1 — фрагмент цитоплазматической оболочки, захваченной вирионом при выходе из инфицированной им клетки; 2 — пространство между этой оболочкой и поверхностью вириона; 3 — внешняя осмиофильная мембрана оболочки вириона; 4 — средняя осмиофобная мембрана оболочки вириона; 5 — внутренняя мембрана оболочки вириона; 6 — боковое (латеральное) тело; 7 — фрагмент клеточной оболочки, адсорбированной на поверхности вириона; 8 — внутривиральная гранула; 9 — локальное втяжение оболочки; 10 — тяж, связывающий компонент нуклеоида с оболочкой; 11 — вирусоплазма; 12 — внешняя осмиофильная мембрана оболочки нуклеоида; 13 — средняя осмиофобная мембрана оболочки нуклеоида; 14 — внутренняя осмиофильная мембрана оболочки нуклеоида; 15 — нуклеоидоплазма; 16 — осмиофобный компонент S-образной структуры; 17 — кольцо-срез спиральной укладки ДНК (гипотеза); 18 — центр этого кольца; 19 — внутренний компонент S-образной структуры нуклеоида; 20 — центральный компонент S-образной структуры нуклеоида; б — вирион натуральной оспы. Электронная микроскопия  $\times 230\ 000$ . Видна S-образная структура нуклеоида.



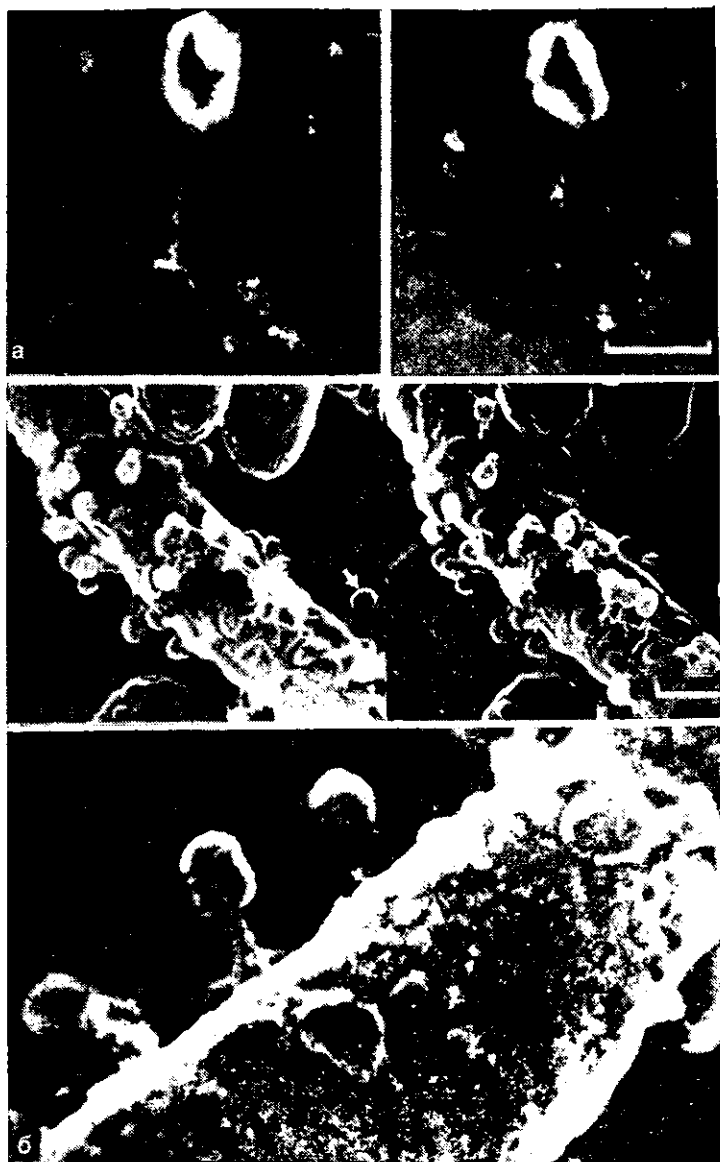


Рис. 31. Фаги.

а — фаг T<sub>2</sub>. Электронная микроскопия;  $\times 100\,000$ . Видны гексагональная головка, отросток с фибриллами, базальная пластинка; б — адсорбция фага T<sub>2</sub> на клетках *E. coli* в сканирующем электронном микроскопе.



## Методические указания

Окраска риккетсий по методу Здродовского. 1. Окрашивают мазок разведенным фуксином Циля (10—15 капель на 10 мл дистиллированной воды) в течение 5 мин.

2. Промывают водой.

3. Обрабатывают мазок 0,5% раствором лимонной кислоты или 0,01% раствором соляной кислоты.

4. Промывают водой.

5. Окрашивают метиленовым синим в течение 1 мин.

6. Промывают водой, высушивают препарат.

Риккетсии по методу Здродовского окрашиваются в красный цвет; цитоплазма клеток, в которых они паразитируют, — в голубой, ядра — в синий.

Метод серебрения по Морозову. Для окраски по Морозову необходимы следующие растворы:

Раствор 1. Ледяная уксусная кислота 1 мл. Формалин 40% 2 мл. Дистиллированная вода 100 мл.

Раствор 2. Танин 5 г. Жидкая карболовая кислота 1 мл. Дистиллированная вода 100 мл.

Раствор 3. Приготавливают путем добавления к 5% раствору нитрата серебра раствора аммиака (по каплям) до легкой опалесценции.

Техника окраски: 1) высушенный мазок фиксируют раствором 1 в течение 1 мин, затем раствор сливают и мазок промывают водой; 2) протравливают раствором 2 в течение 1—2 мин при подогревании до появления паров, после чего промывают водой; 3) окрашивают мазок раствором 3 при подогревании до появления темно-коричневого цвета; промывают водой, высушивают и микроскопируют.

Вирусы окрашиваются в черный цвет.

### Контрольные вопросы

1. Каковы особенности морфологии микоплазм? С чем связана их полиморфность?

2. Что представляют собой стабильные и нестабильные L-формы бактерий?

3. Какое положение в систематике микроорганизмов занимают риккетсии и хламидии? Их строение и химический состав.

4. Основные принципы современной классификации вирусов.

5. Почему вирусы выделены в особое «царство» — *Vira*? Чем они принципиально отличаются от других микроорганизмов?

6. Структура и химический состав вириона.

7. Сравнительная характеристика структуры вирусных капсидов с кубическим и спиральным типами симметрии.

8. Что понимают под внутриклеточными вирусными включениями?

В данном разделе студенты прежде всего знакомятся с основными методами микробиологического исследования: приготовлением питательных сред, стерилизацией, техникой посевов и пересевов, способами культивирования микроорганизмов в лабораторных условиях и выделением чистых культур.

Изучение физиологии микроорганизмов, т. е. процессов пластического и энергетического метаболизма заключается в исследовании ферментов питания и дыхания, а также размножения микробных клеток. Наличие общих закономерностей в метаболизме разных микроорганизмов сочетается с существенными различиями в путях и способах превращения веществ и энергии. На этом основано их дифференцирование и идентификация — важнейшие этапы в микробиологической диагностике инфекционных заболеваний.

Наряду с прикладным значением изучение метаболизма у бактерий открыло широкие перспективы для познания биохимических и генетических механизмов, ответственных за наследственную информацию и способы ее реализации, систему регуляции синтеза белка и другие процессы, протекающие в микробной клетке.

## Тема 6. СТЕРИЛИЗАЦИЯ

### Программа занятия

1. Методы стерилизации.
2. Аппаратура, используемая для стерилизации.
3. Методы определения эффективности стерилизации и действия дезинфицирующих веществ.

**Стерилизация** — это полное уничтожение вегетативных форм микроорганизмов и их спор в различных материалах.

Стерилизацию проводят физическими методами, главным образом путем воздействия высокой температуры и ультрафиолетового облучения, механическим путем — фильтрацией жидкостей через бактериальные фильтры. С помощью химических соединений — антисептических веществ осуществляют дезинфекцию — уничтожение патогенных микроорганизмов при обеззараживании различных материалов,

## Физические методы стерилизации

1. **Прокаливание** производится в пламени спиртовки или газовой горелки. Этим способом стерилизуют бактериологические петли, препаровальные иглы, пинцеты и некоторые другие инструменты.

2. **Кипячение** применяют для стерилизации шприцев, мелкого хирургического инструментария, предметных и покровных стекол и т. п. Стерилизацию проводят в стерилизаторах, в которые наливают воду и с помощью нагрева доводят ее до кипения. Для устранения жесткости и повышения температуры кипения к воде добавляют 1—2% бикарбоната натрия. Инструменты кипятят обычно в течение 30 мин. Данный метод не обеспечивает полной стерилизации, так как споры бактерий при этом не погибают.

3. **Стерилизация сухим жаром** производится в сушильном шкафу (печи Пастера) — см. с. 9 — при температуре 165—170°С в течение 45 мин. При более высокой температуре начинается обугливание ватных пробок, бумаги, в которую завернута посуда, а при более низкой температуре требуется больший срок стерилизации. Сухим жаром стерилизуют стеклянную посуду — пробирки, чашки Петри, пипетки и пр.

4. **Стерилизация паром под давлением.** Это один из наиболее эффективных методов стерилизации, основанный на сильном гидролизующем действии насыщенного пара. Проводится в автоклаве (см. рис. 2). Работа с автоклавом требует точного выполнения специальной инструкции и правил безопасности.

### Правила работы с автоклавом

1. Перед началом работы проверить исправность всех частей автоклава (манометра, упругость резиновой прокладки, крепление крышки и др.).

2. Налить через воронку воду в котел до верхней отметки на водомерной трубке и закрыть кран.

3. Загрузить материал в стерилизационную камеру и плотно закрыть крышку автоклава.

4. Включить нагревательную систему автоклава при открытом выпускном кране.

5. Закрыть выпускной кран после того, как пар вытеснит из паровой камеры весь воздух и конденсат. Признаком полного выхода конденсата служит появление непрерывной струи насыщенного «сухого» пара.

6. После достижения в паровой камере рабочего давления стерилизовать материал в течение определенного времени (табл. 4).

7. Окончив стерилизацию, выключить электрический подогрев и закрыть кран на патрубке между котлом и паровой камерой.

8. Открыть выпускной кран и постепенно выпустить пар из паровой камеры в сосуд с водой.

9. После снижения давления в паровой камере до нуля — отметки манометра, открыть крышку автоклава и приступить к его разгрузке: при открытии крышки ранее указанного срока стерилизуемая жидкость вскипает и может вытолкнуть пробки из сосудов вследствие быстрого падения давления.

Многие питательные среды, перевязочный материал, белье стерилизуют при давлении 1 атм в течение 15—20 мин, питательные среды с углеводами — при 0,5 атм в течение 15 мин, а обеззараживание инфицированного материала проводят при 1,5—2 атм в течение 20—25 мин.

Таблица 4

Соотношение между температурой, давлением и временем стерилизации в автоклаве

Давление пара, атм	Температура, °С	Время стерилизации, мин
0	100	30—60
0,5	111	20—30
1	121	15—20
1,5	127	15—20
2	133	15

#### Контроль работы автоклава

Максимальную температуру пара удобнее всего измерить максимальным термометром, который помещают в автоклаве вместе со стерилизуемым материалом. В некоторых случаях используют химические вещества с определенной температурой плавления: бензоафтол 110° С, бензойная кислота 120° С и др.

5. Стерилизация текучим паром — при температуре 100° С применяется в тех случаях, когда материал не выдерживает более высокой температуры (например, питательные среды с витаминами, углеводами, желатином и др.). Стерилизацию текучим паром проводят в автоклаве при открытом выпускном кране и незавинченной крышке или в аппарате Коха.

Для полного обеспложивания применяют принцип дробной стерилизации, т. е. стерилизуют материал при 100° С (или 80—90° С) в течение 20—30 мин в течение

3 дней подряд. При этом вегетативные формы погибают, а споры сохраняются и в течение суток прорастают при комнатной температуре. Последующее двукратное прогревание обеспечивает достаточно надежную стерильность материала.

6. Тиндализация — это дробная стерилизация материалов при  $56-58^{\circ}\text{C}$  в течение часа 5—6 дней подряд. Применяется для стерилизации легко разрушающихся при высокой температуре веществ (сыворотки, витамины и пр.).

7. Пастеризация — нагревание материала до  $50-65^{\circ}\text{C}$  в течение 15—30 мин или  $70-80^{\circ}\text{C}$  — 5—10 мин для уничтожения неспорных микроорганизмов. Применяется для стерилизации пищевых продуктов (вино, пиво, молоко, соки и пр.).

8. Стерилизация ультрафиолетовыми лучами применяется для стерилизации воздуха в микробиологических лабораториях, боксах, операционных и т. д. Для этого используют бактерицидные лампы различной мощности (БУВ-15, БУВ-30 и др.).

### Механическая стерилизация (фильтрование)

Фильтрование проводят с помощью мелкопористых фильтров разных типов, задерживающих только клеточные формы микробов и их споры.

Фильтры Шамберлана изготовлены из каолина с примесью песка и кварца и имеют вид свечей, полых внутри, с различными размерами пор и условно обозначены  $L_1, L_2, L_3$  и т. д. Фильтры  $L_5-L_{13}$  бактерий не пропускают.

Фильтры Беркефельда сделаны из инфузорной земли в виде свечи. Размеры пор в порядке увеличения обозначены буквами W, N, V.

Фильтр Зейтца состоит из асбестовой пластинки, которая монтируется в специальную металлическую воронку, вставленную через резиновую пробку в колбу Бунзена. Фильтрование проводят под вакуумом. Перед фильтрованием всю систему стерилизуют в автоклаве (рис. 32).

Мембранные фильтры готовят из нитроклетчатки. В зависимости от размеров пор эти фильтры имеют номера 1—5 (размеры пор соответственно равны 350—1200 мкм).

Фильтрованием стерилизуют жидкие материалы, не выдерживающие нагревания (сыворотку крови, антибиотики

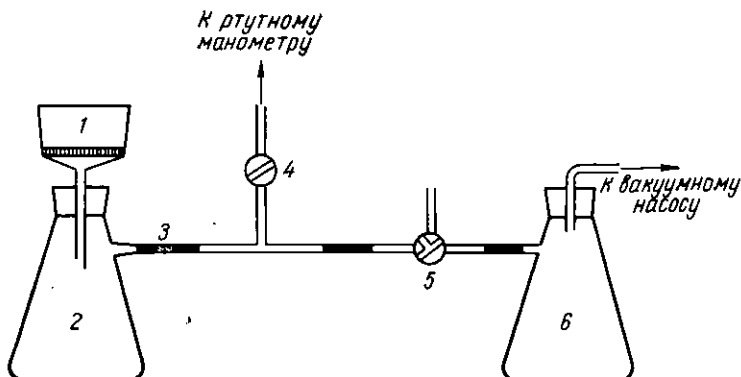


Рис. 32. Установка для фильтрации в условиях вакуума.  
 1 — фильтр Зейтца; 2 — колба Бунзена (для сбора фильтра); 3 — переходная трубка с ватным фильтром; 4, 5 — вакуумные краны; 6 — ловушка.

и др.). Фильтрацию также используют для получения бактериальных токсинов, фагов и разных продуктов жизнедеятельности бактерий.

### Дезинфекция

Под дезинфекцией понимают обеззараживание материалов с помощью химических веществ. В лабораторной практике чаще всего используют растворы карболовой кислоты или фенола (3—5%), лизола (1—3%), формалина (4%), хлорной извести (10—20%), хлорамина (1—5%) и др. Некоторые вещества (борную кислоту, мертиолят, глицерин, фенол и др.) применяют как консерванты при приготовлении лечебных и диагностических сывороток, вакцин и других препаратов.

### Демонстрация

Аппаратура (автоклав, сушильный шкаф, фильтрационная установка), используемая для стерилизации.

### Задание студентам для выполнения лабораторной работы

1. Учесть результаты опытов, поставленных с бактериальными тест-объектами для контроля эффективности стерилизации, проведенной путем кипячения и автоклавирования. Сделать заключение.
2. Учесть результат опыта, поставленного для определения эффективности действия дезинфицирующих веществ на бесспорную и спорообразующую культуры. Сделать заключение.

## Методические указания

**Бактериологический контроль стерилизации.** Три пробирки с мясо-пептонным бульоном засеять шелковыми нитями, смоченными смесью споровой и неспоровой культур. Первую пробирку подвергнуть автоклавированию, вторую — кипячению, третью (контрольную) — не подвергать никакому воздействию. Посевы выдержать в термостате при 37° С в течение 24 ч. Отметить результат поставленного опыта и сделать заключение.

**Определение эффективности действия дезинфицирующих веществ.** Приготовить два вида бактериальных тест-объектов: 1) шелковые нити, смоченные культурой *E. coli*, 2) шелковые нити, смоченные спорообразующей культурой (с большим содержанием спор). Нити поместить в растворы фенола (5%), лизола (5%), хлорной извести (10%) на 5 и 60 мин, после чего отмыть от дезинфицирующих веществ, засеять в мясо-пептонный бульон и поместить в термостат до следующего дня. Контрольные тесты не подвергать действию дезинфицирующих веществ. Отметить результат поставленного опыта и сделать заключение.

### Контрольные вопросы

1. Дать определение понятиям: асептика, антисептика, стерилизация, дезинфекция.
2. Какие существуют методы стерилизации? Перечислите методы, с помощью которых достигается полная или частичная стерилизация материала.
3. В каких аппаратах используют стерилизующий эффект нагретого воздуха и нагретого пара? Особенности их бактерицидного действия.
4. Какие материалы стерилизуются паром под давлением, текучим паром? Как проконтролировать эффективность стерилизации в автоклаве?
5. Что такое тиндализация и пастеризация? Какие материалы обрабатывают этими методами?
6. Что такое механическая стерилизация? Какие материалы стерилизуют этим методом?
7. В каких случаях для стерилизации используют УФ-лучи?
8. Где стерилизуют стеклянную посуду?

## Тема 7. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

### Программа занятия

1. Знакомство с работой отделения для приготовления питательных сред.
2. Питательные среды и ингредиенты, используемые для их приготовления.
3. Техника приготовления питательных сред и определение рН.

Питательные среды широко применяются в микробиологической практике для выращивания разных микроорганизмов с исследовательской целью, для диагностики инфекционных заболеваний, для получения из микробов различных продуктов жизнедеятельности (токсинов, антибиотиков, и др.) и т. д.

Любая питательная среда должна отвечать следующим требованиям: содержать все необходимые для роста и размножения данного микроба вещества в легко усвояемой форме, быть изотоничной, иметь оптимальную влажность, вязкость, рН, оптимальный окислительно-восстановительный потенциал, быть стерильной и, по возможности, прозрачной.

Питательные среды готовят из естественных продуктов животного и растительного происхождения (мяса, молока, яиц, сыворотки крови, овощей, дрожжей, казеина и др.) или из искусственно полученных из этих продуктов веществ (пептона, аминокептида, дрожжевого экстракта, кукурузного экстракта и др.), или из химически чистых соединений с точно известным составом (аминокислот, углеводов, витаминов, минеральных солей).

Большое значение имеет наличие в составе питательных сред ростовых факторов, играющих роль катализаторов метаболических процессов, и компонентов клеточных белков и нуклеиновых кислот, которые бактерии не способны синтезировать. К ним относятся витамины (никотиновая кислота или ее амиды, пантотеновая кислота, витамин В<sub>1</sub>, рибофлавин и др.), пуриновые и пиримидиновые основания, аминокислоты (глутаминовая, триптофан, метионин и др.).

В бактериологической практике чаще всего используют питательные среды комбинированного состава, включающие мясную воду с добавлением пептона, натрия хлорида, а в некоторых случаях — набора органических и минеральных соединений; углеводов, крови и других веществ, обеспечивающих интенсивный рост гетеротрофных бактерий. Многие питательные среды выпускаются в виде порошка. Для приготовления питательной среды его растворяют в кипящей воде.

По целевому назначению питательные среды можно разделить на основные, дифференциально-диагностические и элективные.

К основным относятся мясо-пептонный бульон и агар, которые применяются для выращивания многих патогенных и непатогенных гетеротрофных бактерий. При приготовле-



нии **элективных сред** ставится задача создать максимально благоприятные условия для роста микроба одного вида.

Целевое назначение **дифференциально-диагностических сред** (Гисса, Эндо, Плоскирева и др.) состоит в возможности распознавания отдельных видов бактерий по их ферментативным свойствам. Наличие у бактерий ферментов к субстрату, входящему в состав питательной среды, приводит к образованию разных метаболических продуктов.

Все большее значение приобретают **синтетические питательные среды**, приготовленные из растворов химически чистых органических и неорганических соединений.

По консистенции питательные среды могут быть жидкими, плотными и полужидкими. Для получения плотных и полужидких сред к ним добавляют агар-агар. Последний представляет собой продукт переработки особого вида морских водорослей и в застывшем состоянии придает среде плотность. Агар-агар плавится при температуре 80—86° С, а затвердевает при комнатной температуре. Для приготовления плотных сред добавляют 2—2,5% агар-агара, а для получения полужидких 0,15—0,7%. В некоторых случаях для получения плотных питательных сред используют желатин (10—15%). Такие среды, как свернутая сыворотка крови, свернутый яичный белок, сами по себе являются плотными.

### Демонстрация

1. Ингредиенты, используемые для приготовления питательных сред.
2. Этапы приготовления мясной воды, **мясо-пептонного бульона** и **мясо-пептонного агара**.
3. Определение рН **мясо-пептонного бульона**.
4. Питательные среды: основные, **дифференциально-диагностические**, **элективные**, **синтетические**. Сухие питательные среды.

### Методические указания

Основные среды — **мясо-пептонный бульон** и **мясо-пептонный агар** готовят из мясной воды.

Для приготовления **мясной воды** определенное количество свежего мяса (говядины), освобожденного от костей, жира и сухожилий, пропускают через мясорубку. Полученный фарш заливают холодной водопроводной водой в двойном объеме, хорошо размешивают и оставляют на сутки в прохладном месте или на 2 ч при температуре 37° С. Затем мясо отжимают через марлю или полотно и мясной настой кипятят для свертывания белков, дают остыть, фильтруют

через ватный фильтр и доливают водой до первоначального объема. Приготовленную мясную воду разливают во флаконы, колбы или бутылки и стерилизуют в автоклаве при 120° С в течение 20—30 мин.

Мясная вода представляет собой прозрачную желтоватую жидкость слабокислой реакции (рН 6,2), лишенную белков. В ней содержатся в небольших количествах аминокислоты, соли, углеводы, факторы роста и др.

При приготовлении мясо-пептонного бульона к мясной воде добавляют 0,5% натрия хлорида и 1% пептона. Затем устанавливают рН среды, после чего ее кипятят для выпадения осадка, охлаждают, фильтруют через бумажный фильтр, доливают водой до первоначального объема. Для приготовления мясо-пептонного агара к мясо-пептонному бульону добавляют 2—2,5% сухого агара, который растворяют в бульоне при кипячении. Мясо-пептонные среды разливают в колбы и пробирки и стерилизуют в автоклаве при 120° С.

**Кровяные, сывороточные и асцитические среды.** Эти среды готовят ex tempore. К расплавленному и остуженному до 40—50° С мясо-пептонному агару стерильно добавляют дефибрированную кровь (5—10%) или в таком же количестве сыворотку крови, или 25% асцитической жидкости, хорошо перемешивают путем взбалтывания и сразу же разливают в чашки Петри, пробирки или другую лабораторную посуду. При приготовлении жидкой среды к мясо-пептонному бульону добавляют такие же количества сыворотки или асцитической жидкости.

**Свернутая сыворотка.** Лошадиную или бычью сыворотку крови разливают в пробирки и в наклонном положении свертывают и одновременно стерилизуют в свертывателе при 80° С, по 1,5 ч в три дня подряд.

**Среды с углеводами.** К мясо-пептонному агару или бульону добавляют 0,5—1% глюкозы или другого углевода. Стерилизацию производят текучим паром или паром при давлении 0,5 атм.

**Среды Гисса.** К 1% пептонной воде добавляют 0,5% определенного углевода (глюкозы, лактозы, мальтозы, маннита и др.) и индикатор Андрее (кислый фуксин в 1 н. растворе NaOH). Среды Гисса разливают по пробиркам, в которые помещают поплавок (трубку длиной около 3 см, один из концов которой запаян) для улавливания газообразных продуктов, образующихся при разложении углеводов. При стерилизации, которую проводят текучим паром или паром под давлением в 0,5 атм, поплавок заполняется

питательной средой. Среда при pH 7,2—7,4 бесцветна. При разложении углевода среда приобретает красный цвет.

Среда Эндо выпускается в виде порошка, который состоит из высушенного мясо-пептонного агара с 1% лактозы и индикатора — основного фуксина, обесцвеченного сульфитом натрия.

Среда Левина выпускается в виде порошка и состоит из высушенного мясо-пептонного агара с лактозой,  $K_2HPO_4$ , метиленовым синим и эозином. Среда темно-фиолетового цвета. Лактозоположительные бактерии образуют колонии насыщенного синего цвета, лактозоотрицательные — бесцветные колонии.

Среда Плоскирева (бактоагар Ж) также выпускается в сухом виде и содержит мясо-пептонный агар с лактозой, бриллиантовым зеленым, солями желчных кислот, минеральными солями и индикатором (нейтральная красная краска). Эта среда является не только дифференциально-диагностической, но и селективной, так как она подавляет рост многих микробов (кишечной палочки и др.) и способствует лучшему росту некоторых болезнетворных бактерий (возбудителей брюшного тифа, паратифов, дизентерии). Лактозоотрицательные бактерии образуют на этой среде бесцветные колонии, а лактозоположительные — красные.

Из сред, выпускаемых в высушенном виде, перед употреблением делают навеску, которую вносят в колбу с определенным количеством дистиллированной воды и подвергают кипячению при периодическом помешивании до полного растворения. Затем разливают в чашки Петри.

Среда Вильсона — Блера (железосульфитный агар) для культивирования анаэробов готовится из мясо-пептонного агара, к которому добавляют глюкозу,  $Na_2SO_3$ ,  $FeCl_2$  (хлорид железа). Анаэробные микробы (*Cl. perfringens*) образуют на этой среде колонии черного цвета за счет восстановления  $Na_2SO_3$  в  $Na_2S$  (сульфид натрия), который, соединяясь с хлоридом железа, дает осадок сульфата железа ( $FeS$ ) черного цвета.

Среда Китта — Тароцци для культивирования анаэробов состоит из мясо-пептонного бульона, 0,5% глюкозы и кусочков печени или мясного фарша для адсорбции воздуха. Перед посевом среду прогревают на кипящей водяной бане 10—15 мин для удаления воздуха. До посева или после посева, для изоляции от атмосферного воздуха, среду заливают небольшим слоем вазелинового масла.

### Контрольные вопросы

1. Классификация питательных сред и их применение в микробиологической практике. Какие требования предъявляют к питательным средам?
2. Основные ингредиенты для приготовления сред. Какие вещества используют для приготовления плотных питательных сред?
3. Какие значения pH являются оптимальными для выращивания бактерий на средах? Методы определения pH.
4. Основные питательные среды и методы их приготовления.
5. Какие среды относят к селективным и для чего их применяют? Привести примеры.
6. Какие известны дифференциально-диагностические среды? Их целевое назначение.

## Тема 8. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ, КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР АЭРОБНЫХ И АНАЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ

### Программа двух занятий<sup>1</sup>

1. Получение чистых культур аэробных и анаэробных бактерий.
2. Методы идентификации бактерий, используемые для определения их родовой, видовой и типовой принадлежности.

**Вид** — это совокупность микроорганизмов, имеющих единое происхождение и генотип, сходное строение и функциональные признаки. Видимый рост микробных клеток одного вида, выращенных на плотной или жидкой средах, называют чистой культурой. Культуры микробов одного вида, выделенные из разных источников или из одного источника, называют штаммами. Многие виды микроорганизмов включают различные разновидности, отличающиеся друг от друга одним или несколькими признаками. Эти разновидности в микробиологии называют типами, или биотипами. Типы микробов могут различаться по биохимическим признакам, чаще всего по способности ферментировать определенные сахара (биохимические или ферментативные типы), по чувствительности к специфическим фагам (фаготипы), по антигенным признакам (серотипы).

Культура, полученная в результате размножения одной клетки, изолированной с помощью микроманипулятора или другим путем, называется клоном. Последний содержит генетически однородные клетки. Такого рода культуры используют главным образом в научно-исследовательских и производственных целях.

---

<sup>1</sup> Для экономии времени посев бактериальной смеси рекомендуется произвести на предыдущем занятии.

Бактерии одного вида, выросшие в результате размножения одной или нескольких клеток в виде изолированного скопления на плотной питательной среде, составляют колонию.

Чистые культуры микроорганизмов необходимы для изучения свойств отдельных видов и типов бактерий, определения их родовой, видовой и типовой принадлежности, т. е. для идентификации, приготовления диагностических, лечебных и профилактических препаратов, получения в производственных условиях антибиотиков, ферментов, витаминов, органических кислот и др.

Принадлежность микробной культуры к определенной систематической группе: семейству, роду, виду и типу устанавливается путем изучения ее морфологических, тинкториальных, культуральных, биохимических, антигенных и других признаков (схема 1). Перечисленные признаки получили название таксономических.

Морфологические и тинкториальные признаки бактерий изучают при микроскопическом исследовании окрашенных разными методами мазков и нативных препаратов.

Культуральные свойства, характеризующие рост бактерий на плотной и жидкой средах, устанавливаются по морфологии колоний и особенностям роста культуры.

Биохимические признаки бактерий обусловлены набором конститутивных и индуцибельных ферментов, присутствующих определенному роду, виду, типу микробов, которые могут быть изучены качественными и количественными методами. В бактериологической практике таксономическое значение имеют в основном сахаролитические и протеолитические признаки бактерий, которые определяют на дифференциально-диагностических средах.

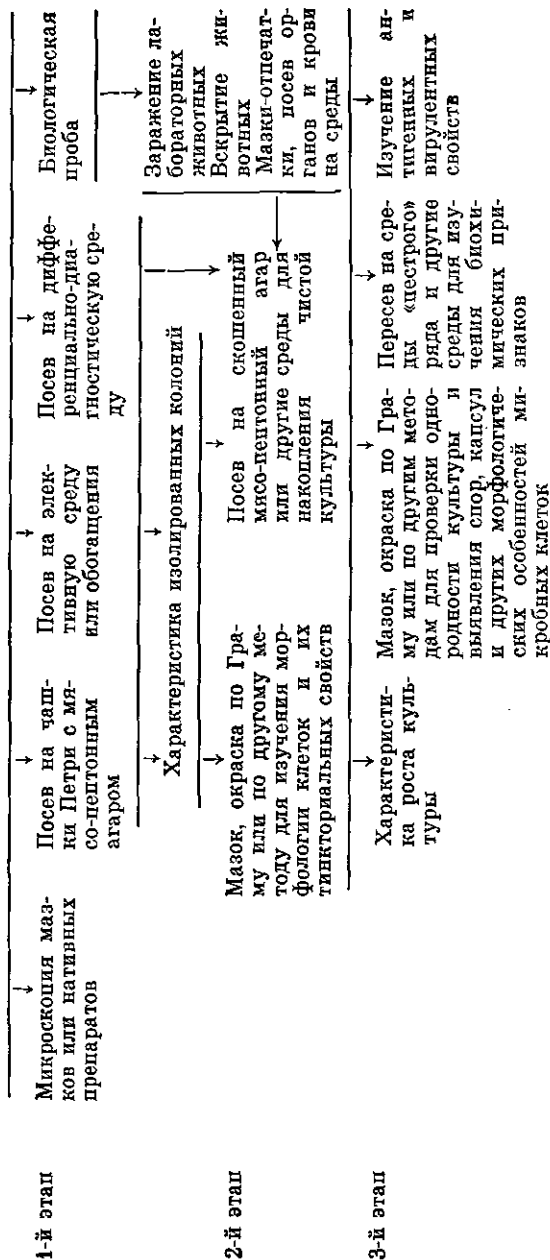
Существенное значение для идентификации бактерий имеют пигменты, окрашивающие колонии и культуры в самые разнообразные цвета. Например, красный пигмент, образуемый *Serratia marcescens* (палочкой чудесной крови); белый пигмент — *Staphylococcus albus* (белым стафилококком); золотистый пигмент — *Staphylococcus aureus* (золотистым стафилококком); сине-зеленый пигмент — *Pseudomonas aeruginosa* (палочкой сине-зеленого гноя) и др.

#### Демонстрация

1. Техника посева петлей, пипеткой, иглой, шпательем.
2. Характер роста разных бактериальных культур на плотных и

## Схема выделения и идентификации чистой культуры бактерий

## Исследуемый материал



Примечание: 1. Исследуемый материал перед посевом для освобождения от сопутствующей микрофлоры иногда подвергается обработке (прогрев при температуре 80° С для выделения споробразующих бактерий, обработка кислотой — для выделения кислотоустойчивых бактерий и т. д.). 2. Условия инкубации посевов могут быть различными, что зависит от физиологических особенностей культуры бактерий (в бескислородной среде, при повышенном содержании CO<sub>2</sub>, при температуре ниже 37° С и т. д.).

жидких средах, различные типы колоний, «пестрые» ряды бактерий с разной ферментативной активностью.

3. Аппаратура, используемая для культивирования аэробных и анаэробных бактерий.

4. Методы Цейслера и Вейнберга для выделения чистой культуры анаэробных бактерий.

### Задание студентам для выполнения лабораторной работы

1. Выделить чистую культуру аэробных бактерий из исследуемого материала.

2. Идентифицировать выделенную культуру по морфологическим, тинкториальным, культуральным и биохимическим свойствам.

Составить протокол по проведенным исследованиям (таблица 1, см. с. 34).

## Методические указания Техника посевов и пересевов

Универсальным инструментом для производства посевов является бактериальная петля. Кроме петли, для посева уколом используют препаровальную иглу, а для посевов на среды в чашках Петри — металлические или стеклянные шпатели. Для посевов жидких материалов, кроме петли, используют пастеровские и градуированные пипетки. У пастеровских и градуированных пипеток широкий конец закрывают ватой, после чего их помещают в специальные пеналы или обертывают бумагой и стерилизуют.

При пересеве бактериальной культуры в левую руку берут пробирку, вынимают из нее ватную пробку, набирают петлей посевной материал, после чего быстро закрывают пробирку пробкой, как это описано на с. 30. Затем в пробирку со скопленным мясо-пептонным агаром вносят петлю с посевным материалом, опуская ее до конденсата в нижней части среды, и делают посев штрихом — распределяя материал зигзагообразным движением по скопленной поверхности агара. Вынув петлю, обжигают край пробирки и закрывают ее пробкой. Петлю стерилизуют в пламени горелки и ставят в штатив. Пробирки с посевами сейчас же надписывают, указывая дату посева и характер посевного материала (номер исследования или название культуры).

При работе с пипеткой прежде всего ее освобождают от бумаги или вынимают из пенала, быстрым движением проводят через пламя горелки и вводят в пробирку. Затем набирают в пипетку посевной материал и, соблюдая описанные выше правила, переносят в пробирку или другую лабораторную посуду. Микробную культуру всасывают с

помощью резиновой трубки или груши. Отработанную пипетку опускают в банку с дезинфицирующим раствором. Таким же образом производят посевы пастеровскими пипетками, предварительно обламывая запаянный конец.

### Методы выделения чистой культуры аэробных бактерий

Выделение микроорганизмов (бактерий) в чистых культурах из исследуемого материала, содержащего смесь микробов, является одним из основных этапов любого микробиологического исследования, проводимого с самыми разнообразными целями: диагностики заболеваний, определения микробной обсемененности внешней среды и др. Для выделения чистой культуры применяют методы, основанные на механическом разобщении бактериальных клеток на поверхности плотной питательной среды.

Наиболее старым является метод Коха, который заключается в приготовлении ряда разведений материала в стерильном изотоническом растворе хлорида натрия и внесении одной капли (петли) каждого разведения в пробирки с расплавленным и остуженным до 40° С агаром. После тщательного перемешивания содержимое каждой пробирки выливают в стерильную чашку Петри.

В настоящее время применяют метод Дригальского, который состоит в том, что материал петлей или пипеткой наносится на поверхность агара в чашку Петри и равномерно распределяется стерильным шпателем. Затем этим же шпателем (не прожигая его в пламени горелки) материал растирают по поверхности агара во второй и третьей чашках.

Посев материала в некоторых случаях делают бактериальной петлей. Для этого в верхней части чашки густо заштриховывают петлей небольшой участок агаровой среды, освободив таким образом петлю от излишнего материала. Затем наносят параллельно штрихи по оставшейся части среды.

Каждый из перечисленных методов приводит к разобщению бактериальных клеток, которые после инкубации образуют изолированные колонии.

Первый день. Исследуемый материал разводят в пробирке с изотоническим раствором хлорида натрия. Одну петлю приготовленного разведения наносят на поверхность мясо-пептонного агара в чашку Петри и тщательно втирают



шпателем в среду на одной половине чашки. Этим же шпателем оставшийся на нем материал втирают в агаровую среду на второй половине чашки, затем шпатель погружают в дезинфицирующий раствор.

После посева чашку переворачивают дном кверху, подписывают и помещают в термостат при  $37^{\circ}\text{C}$  на 18—24 ч.

Второй день. Просматривают чашки и изучают изолированные колонии, обращая внимание на их форму, величину, консистенцию и другие признаки, описанные на с. 67. Для определения морфологии клеток и их тинкториальных свойств из части исследуемой колонии приготавливают мазок, окрашивают по Граму и микроскопируют.

Для выделения и накопления чистой культуры одну изолированную колонию или несколько различных изолированных колоний пересевают в отдельные пробирки со скошенным мясо-пептонным агаром или какой-либо другой питательной средой. Для этого часть колонии снимают петлей, стараясь не задеть окружающие колонии.

Третий день. Отмечают характер роста выделенной чистой культуры. Для проверки ее однородности (чистоты) приготавливают мазок, окрашивают и микроскопируют. В том случае, если в мазке обнаруживают однородные микробные клетки, выделенная культура является чистой.

### Выделение чистой культуры анаэробных бактерий

Первый день. Исследуемый материал засевают для обогащения в пробирку со средой Китта — Тароцци. Среду необходимо перед посевом прогреть на кипящей водяной бане в течение 10—20 мин для удаления растворенного в ней кислорода воздуха, а затем охладить до  $30\text{—}37^{\circ}\text{C}$ . При выделении споровых форм анаэробов засеянную среду вновь прогревают на водяной бане при  $80^{\circ}\text{C}$  в течение 20 мин для уничтожения неспоровых форм бактерий, затем инкубируют в термостате при  $37^{\circ}\text{C}$ .

Второй день. Просматривают посевы, приготавливают мазки и окрашивают по Граму. В положительном случае обнаруживают помутнение и пузырьки газа в среде и крупные споровые грамположительные палочки в мазках.

Для выделения чистой культуры по методу Цейслера петлю материала из среды Китта — Тароцци наносят на кровяной сахарный агар в первую чашку Петри и рас-

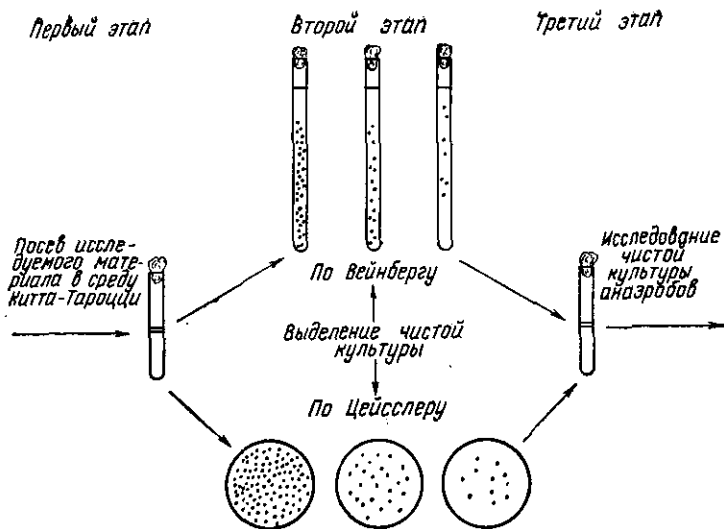


Рис. 33. Схема выделения чистой культуры анаэробных бактерий.

пределяют шпателем по поверхности среды, затем этим же шпателем втирают материал в среду второй и третьей чашек для получения изолированных колоний.

По методу Вейнберга одну или две петли материала из среды Китта — Тароцци вносят в пробирку с бульоном для разведения материала. Затем пастеровской пипеткой с запаянным концом переносят материал последовательно в 3—5 узких пробирок с предварительно прокипяченным (около 20 мин) остуженным до 50° С сахарным мяско-пептонным агаром, погружая капилляр пипетки в расплавленный агар до самого дна пробирки. Засеянные пробирки быстро охлаждают под струей водопроводной воды, при этом агар застывает и фиксирует разобщенное положение отдельных микробных клеток в глубине столбика агара.

Третий день. Выросшие на чашках или в глубине агара в узких пробирках колонии изучают с помощью лупы. На месте отобранной для выделения чистой культуры колонии делают распил пробирки, колонию отсасывают пастеровской пипеткой и переносят в пробирку со средой Китта — Тароцци, которую помещают в термостат (рис. 33).

## Идентификация бактериальной культуры

Идентификацию выделенных бактериальных культур проводят путем изучения морфологии бактерий, их культуральных, биохимических и других признаков.

**Изучение культуральных признаков.** Колонию характеризуют по величине, форме, цвету, консистенции, контуру края, структуре и характеру поверхности (рис. 34).

По величине колонии могут быть крупного (диаметр более 4—5 мм), среднего (диаметр 2—4 мм) и малого (диаметр 1—2 мм) размера. По форме — круглые, розеткообразные, многолопастные, в форме листа и т. д. Цвет колонии зависит от выработки определенного пигмента: белого, желтого, красного и др. Колонии беспигментных бактерий бесцветны. По консистенции различают сухие, влажные, сочные или слизистые колонии. Поверхность колонии бывает гладкой, морщинистой, исчерченной, плоской, плоско-выпуклой, вдавленной. Край колонии может быть ровным, волнистым, бахромчатым или волнообразным. Колонии могут иметь аморфную, зернистую, волокнистую внутреннюю структуру.

Рост чистой культуры на скопленном питательном агаре может быть сухим, влажным, ползучим, складчатым, пигментированным; на жидкой питательной среде — диффузным, придонным, пристеночным, а также сопровождаться образованием пленки или осадка.

**Изучение ферментативных признаков.** Для определения способности микроорганизмов ферментировать углеводы используют короткий и длинный «пестрый» ряд. Первый включает в себя среды Гисса с моно- и дисахаридами: глюкозой, лактозой, сахарозой, мальтозой и с шестиатомным спиртом — маннитом. В длинный «пестрый» ряд вводят дополнительно среды с моносахаридами (арабинозой, ксилозой, рамнозой, галактозой и др.), полисахаридами (инулином, крахмалом, гликогеном и др.) и спиртами (глицерином, дульцитом, инозитом и др.). В качестве индикатора во все среды добавляют реактив Андраде или другой индикатор (см. с. 58).

Чистую культуру исследуемых бактерий засевают петлей на среды «пестрого» ряда. Посевы инкубируют при 37° С в течение 18—24 ч. В том случае, если бактерии ферментируют углевод до образования кислых продуктов, наблюдается изменение цвета среды; при разложении углевода до кислоты и газообразных продуктов наряду с изме-

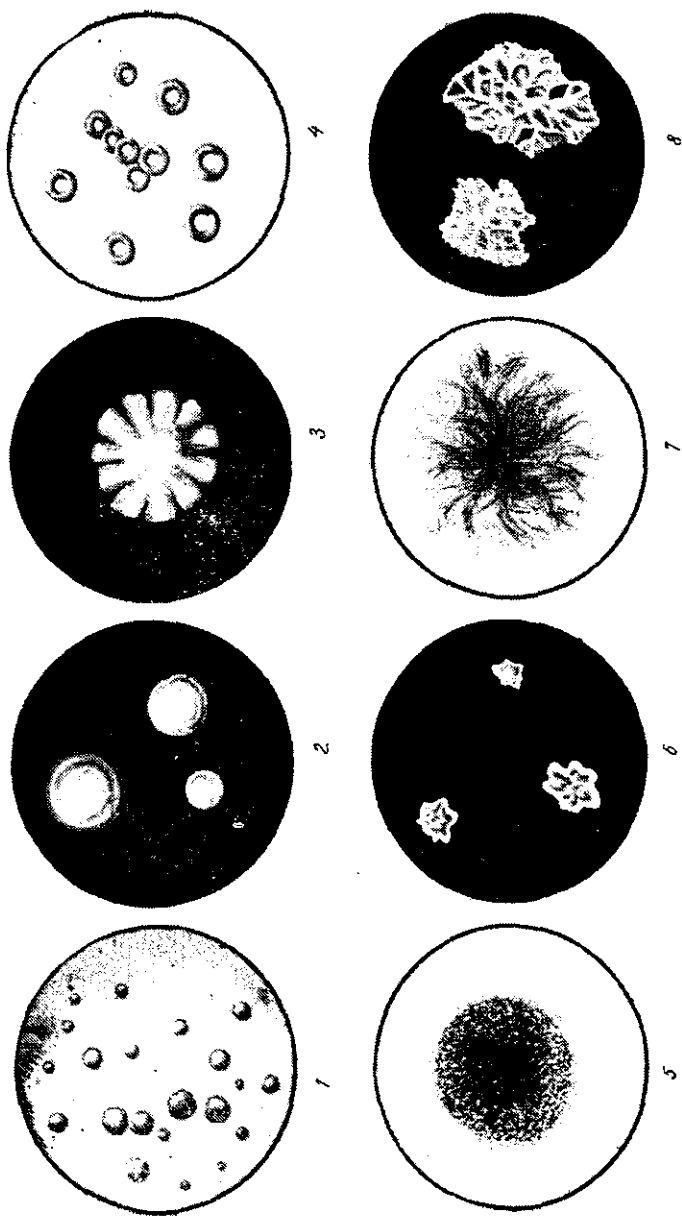


Рис. 34. Типы колоний.

1 — круглые с ровными краями; 2 — круглые, выпуклые, блестящие, слизистой консистенции; 3 — с неровными краями; 4 — круглые с валиком по периферии; 5 — зернистые; 6 — плоские листовидные; 7 — ветвистые; 8 — складчатые.

нением цвета появляется пузырек газа в доплавке. При отсутствии ферментации цвет среды не меняется. Поскольку бактерии ферментируют не все, а только некоторые углеводы, входящие в состав сред Гисса, то наблюдается довольно пестрая картина. Поэтому набор сред с углеводами и цветным индикатором был назван «пестрым» рядом (рис. 35).

Для определения протеолитических ферментов производят посев культуры бактерий уколом в столбик 10—20% желатина, в мясо-пептонный бульон или пептонную воду. Посевы в желатине инкубируют при 20—22°C в течение нескольких дней. При наличии соответствующих ферментов бактерии разжижают желатин, причем наблюдается рост, напоминающий форму воронки, ёлочки, гвоздя. Посевом в мясо-пептонный бульон или пептонную воду определяют продукты расщепления пептона после инкубирования в течение 2—3 сут при 37°C. Для этого ставят реакции на наличие аммиака, индола, сероводорода и др.

1. Реакция на аммиак. Узкую полоску лакмусовой бумаги укрепляют под пробкой так, чтобы она не соприкасалась с питательной средой. Посинение бумаги свидетельствует о наличии аммиака.

Таблица 5

Регистрация морфологических и физиологических признаков культуры

Описание морфологии бактерий	Окраска по Граму или другим методам	Биохимические свойства						Наименование рода и вида культуры						
		Описание характера роста		Ферментация					Образование					
		культуры	колоний	мясо-пептонном бульоне	мясо-пептонном агаре	глюкозы	лактозы		сахарозы	мальтозы	индола	Н <sub>2</sub> S	наличие каталазы	

2. Реакция на индол. *Способ Эрлиха*: в пробирку с культурой бактерий на мясо-пептонном бульоне прибавляют 2—3 мл эфира, содержимое энергично перемешивают и добавляют несколько капель реактива Эрлиха (спиртового раствора парадиметиламидобензальдегида с соляной кислотой); в присутствии индола наблюдается розовое окрашивание, при осторожном насаивании образуется розовое кольцо.

*Способ Мореля*. Полоски фильтровальной бумаги, пропитанные щавелевой кислотой, укрепляют под пробкой вместе с лакмусовой полоской. При образовании индола нижняя часть бумажки окрашивается в розовый цвет.

3. Реакция на сероводород. Под пробкой укрепляют полоску фильтровальной бумаги, пропитанную ацетатом свинца; в присутствии сероводорода нижняя часть бумаги чернеет вследствие образования сульфида свинца.

4. Обнаружение фермента каталазы. На предметное стекло наносят каплю 1—3% раствора перекиси водорода и вносят в нее петлю бактериальной культуры. Каталаза разлагает перекись водорода на  $H_2O$  и  $O_2$ . Выделение пузырьков кислорода свидетельствует о наличии у данного вида бактерий фермента каталазы.

Результаты работ по идентификации выделенной культуры рекомендуется протоколировать согласно табл. 5.

#### Контрольные вопросы

1. Дайте определение вида, штамма и клона бактерий. Что такое колония и чистая культура микроорганизмов?
2. Перечислите оптимальные условия культивирования бактерий.
3. Методы выделения чистых культур аэробных бактерий. От чего зависит выбор определенного метода?
4. Как создать бескислородные условия, необходимые для выращивания анаэробных бактерий?
5. Какие методы и питательные среды применяют для выделения чистых культур аэробных бактерий и их культивирования?
6. Методы идентификации бактерий.
7. Из каких процессов складывается метаболизм бактерий?
8. Основные механизмы питания бактерий. Каким образом питательные вещества поступают в бактериальную клетку?
9. Классификация бактерий по типу питания. Какие бактерии называют прототрофными и ауксотрофными?
10. Основные группы ферментов бактерий. Какие ферменты относят к конститутивным и индуцибельным?
11. Ростовые факторы бактерий и их роль в метаболизме.
12. Перечислите ферменты бактерий, имеющие значение для их дифференцирования и идентификации.

## Тема 9. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ РИККЕТСИЙ, ХЛАМИДИЙ И ВИРУСОВ

### Программа 1-го занятия

1. Методы культивирования риккетсий, хламидий и вирусов в тканевых культурах, курином эмбрионе и в организме лабораторных животных.

2. Методы выявления вирусов в тканевой культуре и курином эмбрионе.

Риккетсии и хламидии являются облигатными внутриклеточными паразитами. В отличие от вирусов размножаются простым делением и содержат оба типа нуклеиновой кислоты (ДНК и РНК) и многие ферменты, необходимые для энергетического и пластического метаболизма. По типу дыхания риккетсии относятся к аэробным микроорганизмам, но в отличие от последних активно окисляют глютаминовую кислоту и индифферентны к глюкозе. Наличие у риккетсий высокопроницаемой оболочки позволяет им получать из клеток, в которых они размножаются, необходимые ферменты и метаболиты.

Хламидии являются энергетическими паразитами клетки-хозяина, так как у них отсутствуют собственные энергодающие ферментные системы. Вследствие этого искусственные питательные среды даже самого сложного состава не могут удовлетворить потребности риккетсий и хламидий. Для их размножения необходимы живые, метаболизирующие клетки.

Для выделения и культивирования риккетсий и хламидий применяются тканевые культуры, куриные эмбрионы и восприимчивые лабораторные животные.

Вирусы выделены в отдельное «царство» — *Vira*. Они содержат только один тип нуклеиновой кислоты, не имеют клеточной структуры, не имеют самостоятельного обмена веществ, являясь внутриклеточными паразитами, репродукция вирусов осуществляется дисъюнктивным (разобщенным) способом.

### Тканевые культуры, используемые для культивирования риккетсий, хламидий и вирусов

Все тканевые культуры подразделяются на первичные, перевиваемые и полуперевиваемые, которые приготавливаются из тканей животных или человека. Перевиваемые куль-

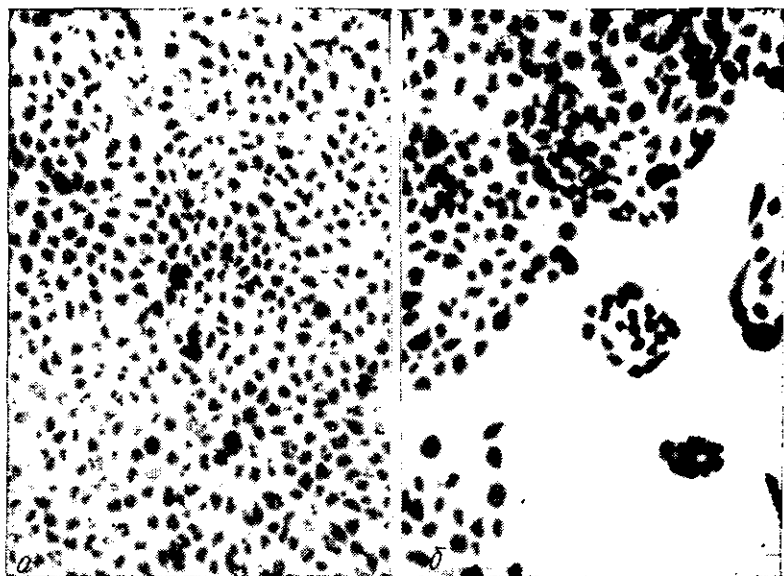


Рис. 36. Культура ткани.

а — неизмененные клетки; б — цитопатические изменения в клетках (ЦПД).

туры в отличие от первичных адаптированы к условиям постоянного существования *in vitro*.

Приготовление первичной культуры клеток складывается из нескольких последовательных этапов: измельчения ткани, разъединения клеток путем трипсинизации, отмывания полученной однородной суспензии изолированных клеток от трипсина с последующим суспендированием клеток в питательной среде, обеспечивающей их размножение, например в среде 199 с добавлением телячьей сыворотки крови. Клетки ткани легко и довольно прочно прикрепляются к стенке пробирки или флакона, на которой растут и распространяются в виде пласта, состоящего из одного слоя клеток — монослоя.

Перевиваемые однослойные тканевые культуры готовят из линий клеток, обладающих свойством длительно пассироваться в течение многих лет *in vitro* в определенных условиях. К ним относятся штамм L (из культуры мышечных фибробластов), штамм HeLa (из карциномы шейки матки), штамм Нер-3 (из лимфоидной карциномы),



штаммы клеток амниона человека, почек обезьяны и др.

К полуперевиваемым культурам относятся диплоидные клетки человека. Они представляют собой клеточную систему, сохраняющую в процессе 50 пассажей (до года) диплоидный набор хромосом, типичный для соматических клеток используемой ткани. Диплоидные клетки человека не претерпевают злокачественного перерождения и выгодно отличаются от опухолевых и других перевиваемых клеточных линий, которые могут быть загрязнены латентными вирусами и микоплазмами.

После внесения вируса в тканевую культуру он проникает в клетки, в которых интенсивно репродуцируется. При этом происходит повреждение клеток, сопровождающееся морфологическими изменениями, изучаемыми под микроскопом.

Часть клеток погибает и отслаивается от поверхности стекла. Подобное действие вируса на культуру ткани характеризуется как цитопатическое (цитопатогенное) действие (ЦПД). Его оценивают в динамике, изучая тканевую культуру под микроскопом в разные сроки после заражения вирусом. Выявление ЦПД является одним из методов обнаружения и идентификации вирусов, поскольку характер цитопатических изменений, вызванных разными вирусами, может быть неодинаков (рис. 36, а, б).

Некоторые вирусы можно обнаружить по выявлению включений в ядре или цитоплазме зараженных клеток. Эти включения имеют различную форму и размеры от 0,25 до 25 мкм. Они представляют собой скопления вирусных частиц или реакцию клетки на присутствие в ней вируса. Включения могут быть выявлены в препаратах, пригото-

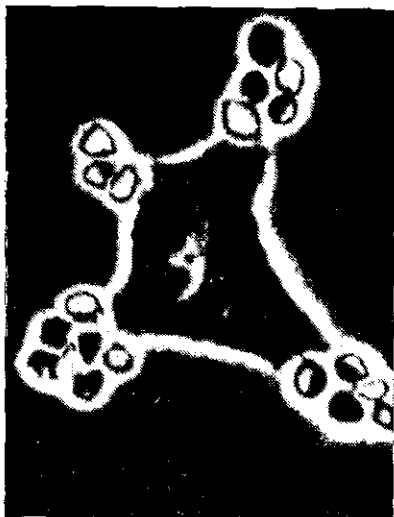


Рис. 37. Адсорбция эритроцитов на поверхности клеток, зараженных вирусом (гемадсорбция).



Рис. 38. Колонии (бляшки) вирусов на культуре ткани.

а — бляшки вируса ньюкаслской болезни; б — бляшки вируса Коксаки.

ленных из ткани и окрашенных краской Романовского — Гимзы или флюорохромами.

Приобретение инфицированной культурой клеток способности к гемадсорбции. При этом на пораженных вирусами клетках наблюдается хорошо видимая под микроскопом адсорбция эритроцитов (рис. 37).

Количественным методом учета отдельных вирусных частиц является метод бляшек (рис. 38). Метод бляшек основан на появлении в монослое клеток, зараженных вирусом, под агаровым покрытием светлых участ-

ков, состоящих из дегенерированных клеток. Эти участки, получившие название бляшек, соответствуют местам размножения вируса, причем каждая бляшка образуется при размножении одной вирусной частицы. Подсчет бляшек производят на светлом фоне.

Размеры, морфология и сроки появления бляшек отличаются не только у разных видов вирусов, но и у отдельных штаммов одного и того же вида, что используется для селекции штаммов и получения «чистых линий» вирусов.

### Культивирование риккетсий, хламидий и вирусов в куриных эмбрионах

Куриные эмбрионы имеют значительные преимущества по сравнению с тканевыми культурами и подопытными животными, поскольку они свободны от вирусов и других микроорганизмов и обладают большой жизнеспособностью и устойчивостью к разным воздействиям. Обычно используют эмбрионы в возрасте 8—12 дней. Данный метод широко применяется для выделения риккетсий и хламидий, массового их накопления для приготовления риккетсиозных препаратов (вакцин, диагностических антигенов). Для куль-

тивирования риккетсий куриные эмбрионы заражают в полость желточного мешка.

Ряд вирусов (гриппа, оспы и др.) культивируют также в курином эмбрионе. Об их репродукции судят по морфологическим изменениям, обнаруженным в эмбрионе и его оболочках (см. рис. 41), а также с помощью реакции геммагглютинации (см. с. 77).

### **Выделение риккетсий, хламидий и вирусов путем заражения лабораторных животных**

Наряду с культивированием в культурах клеток и куриных эмбрионах широко используют и метод заражения лабораторных животных. В ряде случаев животные бывают чувствительны к вирусам только в первые дни жизни (например, мыши-сосунки — к вирусам Коксаки). Применяют подкожный, интраназальный, внутримышечный, внутрибрюшинный, субдуральный и другие методы заражения лабораторных животных. Животных с клиническими симптомами заболевания и часть незаболевших забивают на 8—10-й день и полученный от них материал используют для проведения пассажей на свежих животных. После 4—5 пассажей выделенный возбудитель изучают по биологическим и серологическим тестам для идентификации.

#### **Демонстрация**

1. Этапы приготовления однослойной культуры ткани.
2. Цитопатические изменения клеток культуры ткани, вызванные репродукцией вируса.
3. Техника заражения вирусом и вскрытие куриного эмбриона.

#### **Задание студентам для выполнения лабораторной работы**

1. Определить репродукцию вируса: а) по цитопатическому действию в культуре ткани, б) с помощью реакции геммагглютинации в курином эмбрионе.

### **Методические указания**

**Методика изучения цитопатического действия вирусов.** Для исследования монослоя клеток пробирку с тканевой культурой помещают на предметный столик микроскопа так, чтобы монослой находился сверху. Для удобства определения положения монослоя на противоположной стороне пробирки проводят черту, которая должна быть обращена вниз. Придерживая пробирку левой рукой, изучают морфо-

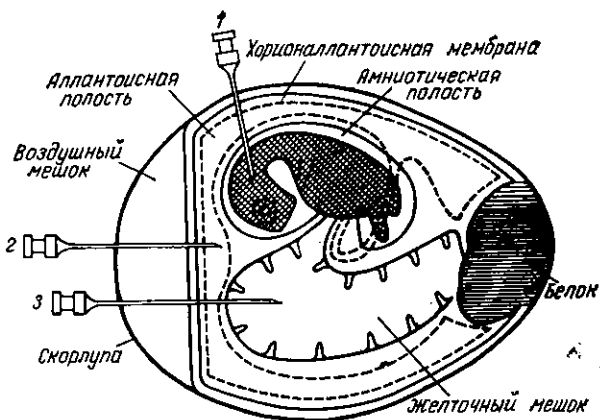


Рис. 39. Способы заражения куриного эмбриона.

1 — в амнион; 2 — в аллантоисную полость; 3 — в желточный мешок.

логию клеток тканевой культуры с помощью объектива 8 при опущенном конденсоре и прикрытой диафрагме.

При сравнении клеточного монослоя, инфицированного вирусом, с незараженными клетками в контрольной пробирке, отмечают полное или островковое разрушение пласта клеток, которое характерно для цитопатического действия различных вирусов.

**Методика заражения куриных эмбрионов.** Существует несколько способов заражения куриного эмбриона. Чаще всего материал вводят в аллантоисную и амниотическую полости, на хорионаллантоисную оболочку и в желточный мешок (рис. 39).

Перед заражением скорлупу яйца над воздушной камерой обрабатывают 70% спиртом, обжигают на пламени, смазывают 2% йодной настойкой, вторично протирают спиртом и обжигают.

При заражении в аллантоисную полость в скорлупе над воздушной камерой (границы которой заранее обводят карандашом при просвечивании яйца в овоскопе) проделывают небольшое отверстие с помощью ножниц или скальпеля. Туберкулиновым шприцем вводят 0,1—0,2 мл вирусосодержащего материала на глубину 2—3 мм ниже границы воздушной камеры. Прокол в скорлупе заливают расплавленным парафином.

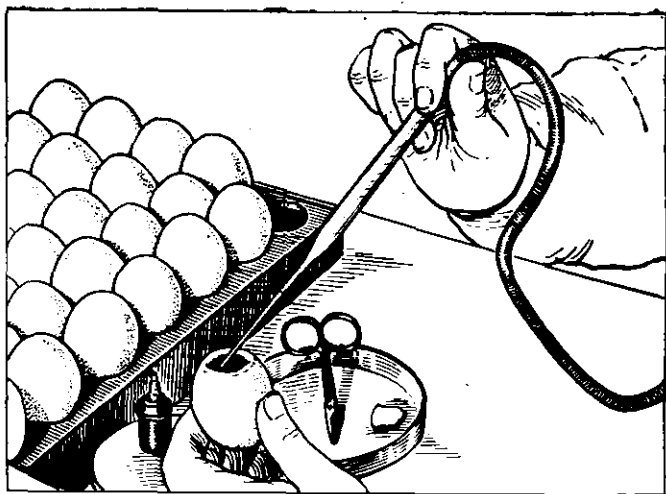


Рис. 40. Вскрытие куриного эмбриона.

Вскрытие зараженных эмбрионов производят в сроки максимального накопления вируса (через 48—72 ч инкубации при  $37^{\circ}\text{C}$ ). Перед вскрытием эмбрионы оставляют на ночь при  $4^{\circ}\text{C}$ . После обработки скорлупы спиртом и 2% раствором йода ее рассекают и сбрасывают, снимают осторожно подскорлупную оболочку и рассматривают хорион-аллантоисную оболочку вокруг места заражения на наличие очагов поражений (геморрагий, белесоватых очагов поражений). Затем (пастеровской пипеткой) прокалывают аллантоисную оболочку в участке, свободном от сосудов, отсасывают аллантоисную жидкость (рис. 40). После этого извлекают хорионаллантоисную оболочку, которую дважды промывают изотоническим раствором хлорида натрия, помещают в чашку Петри и рассматривают на черном фоне специфические поражения (рис. 41).

**Постановка реакции гемагглютинации (РГА).** Для постановки РГА куриные эмбрионы вскрывают, аллантоисную жидкость отсасывают и разливают в пробирки или лунки плексигласовой пластины двукратные возрастающие разведения в объеме 0,5 мл (для контроля берут 0,5 мл такой же жидкости незараженного эмбриона). Затем добавляют по 0,5 мл 1% суспензии отмытых куриных эритроцитов и выдерживают при комнатной температуре. Результаты

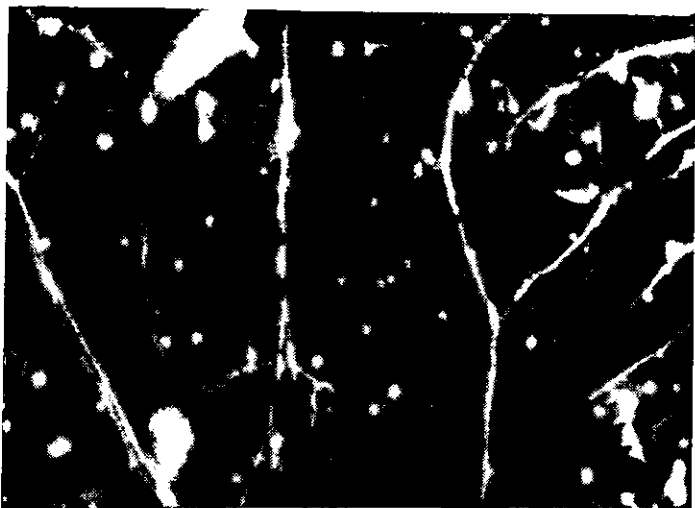


Рис. 41. Поражения на хорионаллантоисной оболочке куриного эмбриона, зараженного вирусом оспы.

реакции учитывают через 40 мин после оседания эритроцитов в контроле. Наличие гемагглютинации в опытных пробирках при ее отсутствии в контрольных указывает на содержание вируса в исследуемой жидкости. Тип вируса дифференцируют в РТГА (см. с. 269).

### Программа 2-го занятия

1. Основные методы изучения фагов.
2. Выделение, титрование и индикация фагов во внешней среде.

Вирусы бактерий или бактериофаги широко распространены во внешней среде: водоемах, почве. Там же встречаются и актинофаги, хозяевами которых являются актиномицеты. Дизентерийные, брюшнотифозные и другие фаги выделяются из сточных вод и испражнений. Стафилофаги обнаруживаются в слизи из носоглотки, на коже и в раневом отделяемом, фаги анаэробных бактерий — в раневом отделяемом, почве. Наличие фага в среде указывает на присутствие в ней чувствительных к нему бактерий.

Существуют вирулентные и умеренные фаги. При заражении бактериальных клеток каждый из них инъецирует внутрь клетки только свою нуклеиновую кислоту,

а белковая оболочка остается снаружи. Вирулентные фаги вызывают инфекцию, заканчивающуюся лизисом бактериальных клеток и синтезом новых фаговых частиц. Умеренные фаги не лизируют зараженные ими клетки. ДНК этих фагов включается в хромосому бактерий и передается при их делении неограниченному числу потомков.

Репродукция вирулентного фага в бульонной бактериальной культуре сопровождается лизисом бактерий и просветлением среды. При действии на чувствительные бактерии, выращенные на агаровой среде в чашке Петри, фаги образуют зоны очагового или сплошного лизиса, что зависит от их концентрации и других факторов. Зоны очагового лизиса получили название негативных колоний фага, или стерильных пятен. Они имеют морфологию, характерную для различных фагов, и образуются из одной фаговой частицы при ее внедрении и последующей репродукции в бактериальной клетке.

В практической работе фаги применяют: 1) для фаготипирования бактерий (определения фаготипа), т. е. чувствительности разных штаммов бактерий одного и того же вида к набору типоспецифических фагов; 2) фагодиагностики — косвенной диагностики инфекционных заболеваний, заключающейся в выделении фага из организма больного, например, из испражнений; 3) индикации возбудителей инфекционных заболеваний во внешней среде и в испражнениях больных с помощью реакции нарастания титра фага (РНТФ); 4) фагопрофилактики — предупреждения некоторых заболеваний (например, дизентерии) среди лиц, находящихся в очаге; 5) фаготерапии заболеваний, вызванных шигеллами, протеем, стафилококком, палочкой синезеленого гноя и др.

### Демонстрация

1. Методика выделения фага из внешней среды.
2. Методика обнаружения лизогенных бактерий.

### Задание студентам для выполнения лабораторной работы

По результатам поставленных опытов: а) рассчитать титр фага по методу Грациа; б) определить спектр литического действия polyvalentного фага; в) определить фаготип стафилококковых культур, выделенных при пищевом отравлении; г) учесть результаты РНТФ и сделать соответствующее заключение.

## Методические указания

**Выделение фага из объектов внешней среды.** Для получения вирулентного фага готовят фильтрат исходного материала (воды, суспензии фекалий и т. д.), пропуская его через бактериальный фильтр. Фильтрат вместе с соответствующей бактериальной культурой засевают на бульон, инкубируют при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 18—24 ч. После лизиса культуры оставшиеся бактериальные клетки удаляют центрифугированием или фильтрацией через бактериальный фильтр. В других случаях предварительно инкубируют исходный материал с культурой бактерии-хозяина, а затем уже центрифугируют или фильтруют через бактериальный фильтр. Наличие фага в фильтрате определяют качественными и количественными методами.

**Качественный метод определения фагов.** Чашку Петри с мясо-пептонным агаром засевают суточной бульонной культурой кишечной палочки «газоном». Для этого всю поверхность агара тщательно протирают тампоном, смоченным в бульонной культуре кишечной палочки, и подсушивают 10—15 мин при  $37^{\circ}\text{C}$ . Затем на поверхность «газона» наносят каплю фага и наклоняют чашку так, чтобы капля стекла к противоположному краю. После суточной инкубации в термостате просматривают чашку и отмечают наличие зоны лизиса на месте стекания капли фага.

**Количественный метод определения титра фага по Грациа.** Приготавливают десятикратные разведения исследуемой суспензии фага ( $10^{-2}$ — $10^{-7}$  в зависимости от предполагаемого титра). Затем по 0,5 мл из 2—3 последних разведений смешивают с суточной бульонной культурой чувствительных к фагу бактерий в таком же объеме и с 3—4 мл 0,5% агара, охлажденного до  $45^{\circ}\text{C}$ . Смеси выливают на поверхность питательного агара в 2—3 чашки Петри, где они застывают в виде тонкого слоя, в котором неподвижно фиксированы бактерии. Незараженные бактерии, размножаясь, образуют сплошной рост на поверхности агара.

В результате лизиса инфицированных фагом клеток на сплошном бактериальном «газоне» появляются четко очерченные очаги — стерильные пятна (рис. 42). Число этих пятен соответствует количеству жизнеспособных (инфекционных) фаговых частиц в засеянной смеси. Исходя из него, можно вычислить количество пятнообразующих единиц на



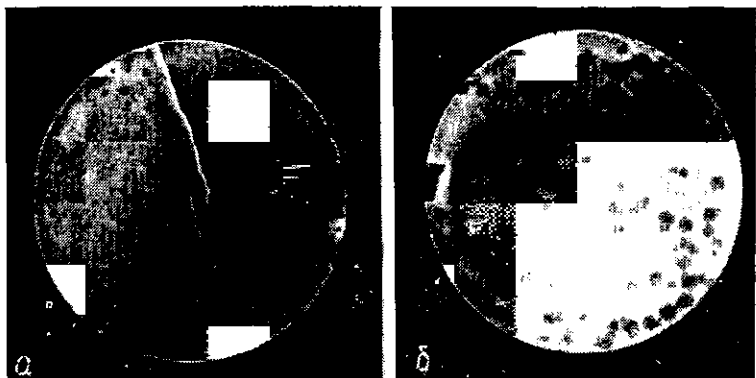


Рис. 42. Негативные колонии (стерильные пятна) бактериофагов.  
 а — пятна фагов T<sub>1</sub>; б — пятна фага T<sub>2</sub>.

единицу объема исходной суспензии фага. Эта величина, характеризующая концентрацию суспензии фага, называется титром бактериофага (табл. 6).

Таблица 6  
 Результаты титрования фага по методу Грациа

Номер исследуемых проб	Число стерильных пятен фага, полученных при посевах проб в разведениях			Число фаговых частиц в 1 мл
	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	
1	370	42	3	8,6×10 <sup>7</sup>
2	463	50	6	1,0×10 <sup>8</sup>
3	37	4	0	7,7×10 <sup>6</sup>

**Определение спектра литического действия фага.** Чашку с мяско-пептонным агаром делят на квадраты по числу испытуемых бактериальных культур. На каждый квадрат петлей наносят каплю соответствующей бульонной культуры и распределяют ее по агару. Затем на каждый квадрат наносят по одной капле испытуемого фага петлей или пастеровской пипеткой.

После суточной инкубации в термостате просматривают чашку, отмечая те квадраты, где имеется сплошной лизис бактерий или стерильные пятна на бактериальном «газоне».

**Фаготипирование бактерий.** Испытуемую суточную бульонную культуру бактерий в количестве 0,5 мл вносят в пробирку с расплавленным и охлажденным до 45° С 0,7% мясо-пептонным агаром, перемешивают и равномерно распределяют по поверхности 2% мясо-пептонного агара в чашке Петри. После застывания агара чашку слегка подсушивают в термостате, затем делят на квадраты, на которые пастеровской пипеткой наносят по одной капле различных фагов. После суточной инкубации просматривают чашку, отмечая те квадраты, в которых имеется лизис бактерий. Фаготип бактериальной культуры определяется тем типом фага, который вызывает ее лизис.

**Определение лизогении.** Исследуемую бульонную культуру центрифугируют для отделения фага от бактерий. В том случае, если бактерии спонтанно продуцируют фаг, он будет содержаться в надосадочной жидкости. Для выявления фага надосадочную жидкость засевают на «газон» индикаторной (чувствительной) бактериальной культуры, на котором образуются очаги лизиса — стерильные пятна.

Во многих случаях исследуемую бактериальную культуру предварительно подвергают ультрафиолетовому облучению для индукции содержащегося в ней профага.

### Контрольные вопросы

1. Методы культивирования и обнаружения риккетсий и хламидий. Почему риккетсии и хламидии не растут на искусственных питательных средах?

2. Стадии и типы взаимодействия вируса с клеткой хозяина и их основные особенности.

3. Пути проникновения вируса в клетку хозяина. Как происходит дезинтеграция («раздевание») вируса в клетке хозяина и какие ферменты участвуют в этом процессе?

4. Как доказать инфекционность вирусной нуклеиновой кислоты?

5. Особенности биосинтеза нуклеиновых кислот и белков у РНК- и ДНК-содержащих вирусов?

6. Как происходит выход разных вирусов из клетки хозяина?

7. Какие ферменты содержат некоторые вирусы? Их происхождение и роль в процессе взаимодействия с клеткой хозяина.

8. Что такое виrogenия? Приведите пример вирусов, способных к виrogenии. Чем виrogenия отличается от латентного вирусносительства?

9. Методы культивирования вирусов. Какова причина облигатного паразитизма вирусов? От чего зависит выбор того или иного метода культивирования вируса?

10. Строение куриного эмбриона и способы его заражения. В чем состоят преимущества и недостатки метода культивирования вирусов в курином эмбрионе?

11. Классификация тканевых культур и основные этапы их получения. В чем преимущества и недостатки различных тканевых культур, применяемых в вирусологической практике?

12. Преимущества и недостатки метода культивирования вирусов в организме лабораторных животных.

13. Методы индикации вирусов при культивировании в тканевых культурах, в курином эмбрионе, в организме лабораторных животных.

14. Механизм и применение реакций гемагглютинации и гемадсорбции.

15. Структура фагов.

16. Основные стадии взаимодействия фага с клеткой хозяина.

17. Типы взаимодействия фага с бактериальной клеткой. Какие фаги называются умеренными и вирулентными?

18. Какие бактерии называются лизогенными? Их свойства и методы обнаружения.

19. Что такое фаговая (лизогенная) конверсия?

20. Почему фаги были избраны в качестве модели для изучения различных вопросов молекулярной генетики и общей вирусологии?

21. Методы выделения и титрования фагов из объектов внешней среды и организма человека.

22. Для чего используют фаги в медицинской практике?

!

## МИКРООРГАНИЗМЫ И ВНЕШНЯЯ СРЕДА

Микроорганизмы распространены повсюду: в воздухе, воде, почве, на поверхности кожи и слизистых, в ротовой полости и кишечнике людей и животных. Болезнетворные микробы, обитающие в организме, могут попасть во внешнюю среду и циркулировать там в течение некоторого времени, а затем вновь попадают в организмы животных или человека, вызывая инфекционные заболевания. Однако такие микроорганизмы составляют ничтожное меньшинство по сравнению с полезными сапрофитами, которые участвуют в круговороте веществ в природе.

Под воздействием самых разнообразных факторов внешней среды микроорганизмы погибают или могут изменять свои свойства. При этом в зависимости от конкретных условий среды, положительные наследственно закрепленные изменения могут привести к выживанию вида, а отрицательные — к его вымиранию.

В данном разделе студенты знакомятся с микрофлорой и с основными методами бактериологического исследования воздуха, воды, почвы и организма людей, а также с методами определения чувствительности бактерий к антибиотикам и генетического анализа бактерий.

### Тема 10. САНИТАРНО-БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### Программа двух занятий

1. Микрофлора внешней среды и методы санитарно-бактериологического исследования воздуха, воды и почвы.
2. Микрофлора организма человека.

#### Микрофлора воздуха, воды и почвы

Количественное содержание микроорганизмов в воздухе и их состав могут колебаться в зависимости от степени загрязненности воздуха частицами пыли или капельками жидкости. Эти мелкие частицы, содержащие микроорганизмы и взвешенные в газовой среде, формируют разные фазы микробного аэрозоля. Видовой состав микрофлоры открытого воздушного

бассейна в определенной степени отражает почвенную микрофлору, а воздух закрытых помещений — микрофлору организмов людей и животных, находящихся в этих помещениях. Некоторые микроорганизмы могут находиться в воздухе в течение более или менее длительного времени, сохраняя жизнеспособность.

Наиболее постоянно в открытом воздушном бассейне присутствуют пигментные бактерии (желтая сарцина, палочка чудесной крови и др.), споры бактерий и грибов, которые наиболее устойчивы к действию прямого солнечного света и высушивания. В воздухе закрытых помещений обнаруживаются гемолитические стрептококки, иногда и другие патогенные бактерии (микобактерии туберкулеза, дифтерийная палочка, стрептококк, палочка коклюша и др.), вирусы (возбудители гриппа и др.).

О микробном загрязнении воздуха судят по микробному числу — количеству микробов, содержащихся в 1 м<sup>3</sup> воздуха.

При санитарно-бактериологической оценке воздуха закрытых помещений особое внимание обращают на содержание в 1 м<sup>3</sup> воздуха  $\alpha$ - и  $\beta$ -гемолитических стрептококков, которые являются показателями загрязнения воздуха микрофлорой верхних дыхательных путей человека.

Хотя официальных стандартов чистоты воздуха не разработано, у нас в стране приняты примерные показатели, исходя из которых оценивают степень микробного загрязнения воздуха жилых помещений (табл. 7).

Таблица 7

Критерии для оценки воздуха жилых помещений  
(число микроорганизмов в 1 м<sup>3</sup> воздуха, по А. П. Шафиру)

Оценка воздуха	Летний режим		Зимний режим	
	всего микроорганизмов	зеленящий и гемолитический стрептококки	всего микроорганизмов	зеленящий и гемолитический стрептококки
Чистый	$\leq 1\ 500$	$\leq 16$	$\leq 4\ 500$	$\leq 36$
Загрязненный	$> 2\ 500$	$> 36$	$> 7\ 000$	$> 124$

Почва — основной резервуар микроорганизмов в природе. Постоянными обитателями почвы являются азотфиксирующие, нитрифицирующие, денитрифицирующие, гнилостные бактерии, актиномицеты, грибы, дрожжи, водоросли и про-

стейшие. Максимальное количество микроорганизмов содержится в почве на глубине 5—20 см (около 10 млрд. на 1 г почвы).

Для патогенных бактерий почва не является средой обитания, поскольку они быстро погибают в результате воздействия неблагоприятных факторов внешней среды и микробов-антагонистов. Однако споры возбудителей сибирской язвы, столбняка, газовой гангрены, ботулизма и других могут сохраняться в почве годами. Неспоровые бактерии сохраняют свою жизнеспособность в почве около 5 мес. По наличию в почве *E. coli* и *Cl. perfringens* — постоянных обитателей кишечника человека и животных судят о ее фекальном загрязнении и продолжительности этого процесса.

В воде содержатся флюоресцирующие, пигментные, серо- и железобактерии, спорообразующие бактерии, грибы, водные вибрионы и спириллы. В водоемах, загрязненных испражнениями людей и животных, могут содержаться кишечная палочка, протей, гноеродные кокки, возбудители кишечных инфекций, а также сибиреязвенные бациллы, туляремийные бактерии, лептоспиры, энтеровирусы.

По наличию в воде *E. coli* судят о ее загрязненности испражнениями. Выбор кишечной палочки в качестве санитарно-показательного микроорганизма обусловлен: 1) постоянным присутствием ее в кишечнике человека и животных, 2) неспособностью размножаться в воде и почве, 3) совпадением сроков выживания во внешней среде кишечной палочки и возбудителей брюшного тифа и дизентерии. Таким образом присутствие и количество кишечной палочки в воде характеризуют степень загрязненности ее фекалиями.

Для общей количественной оценки микрофлоры почвы и воды определяют микробное число — количество микробов, содержащихся в 1 г почвы или в 1 мл воды.

Для санитарно-бактериологической оценки воды определяют ее коли-титр — то наименьшее по объему количество воды, в котором обнаруживается присутствие кишечной палочки. Другим показателем загрязнения воды фекалиями является коли-индекс, указывающий на количество кишечных палочек в 1 л воды. По существующему санитарному законодательству для питьевой воды коли-титр должен быть не менее 300 мл, коли-индекс — не более 3, микробное число не должно превышать 100, а для питьевой воды крупных городов коли-титр должен быть не менее 500 мл.

Для санитарно-бактериологической оценки почвы определяют ее коли-титр и перфриягенс-титр — наименьшее весо-

вое количество почвы, в котором обнаруживаются кишечные палочки или *Cl. perfringens*.

Официальные нормативы для санитарной оценки почвы по микробным показателям отсутствуют. На практике пользуются схемами, разработанными в Институте общей и коммунальной гигиены АМН СССР (табл. 8, 9).

Таблица 8

Схема оценки санитарного состояния подзолистых почв

Виды почв	Микробное число, млн.	
	в незагрязненных почвах	в загрязненных почвах
Канализованных домовладений	< 2	> 2
Неканализованных домовладений	< 2	> 2
Садов и парков	< 5	> 5
Территорий промышленных предприятий	< 2	> 2
Полей	< 1,5	> 1,5

Таблица 9

Схема санитарной оценки почвы по коли-титру и перфрингенс-титру

Оценка почв	Титр кишечной палочки	Титр клостридий перфрингенс
Незагрязненная	1 г и выше	0,1 г и выше
Слабозагрязненная	0,1—0,01	0,01—0,001
Умеренно загрязненная	0,001—0,001	0,001—0,0001
Сильно загрязненная	0,001 и ниже	0,0001 и ниже

Одновременное обнаружение в почве *E. coli* и *Cl. perfringens* свидетельствует о свежем, эпидемиологически опасном фекальном загрязнении.

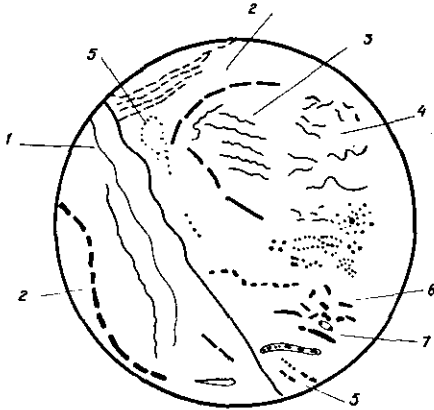
### Микрофлора организма человека

Микрофлора организма человека довольно разнообразна. Она включает бактерии, спирохеты, микоплазмы, вирусы, грибы, дрожжи и другие микроорганизмы.

Количественный и качественный состав микрофлоры кожи, слизистых и полостей человеческого организма являются

Рис. 43. Микрофлора зубного налета.

1 — *Leptotrix*; 2 — *B. maximus buccalis*; 3 — *Borrelia buccalis*; 4 — *Treponema microdentium*; 5 — *Diplostreptococcus*; 6 — *Diplococcus*; 7 — *B. fasiforme*.



характерными и относительно стабильными, хотя наблюдаются колебания в зависимости от возраста, условий труда и быта.

На коже открытых частей тела часто встречаются микроорганизмы, отражающие микрофлору воздуха и тех предметов, с которыми человек соприкасается. На коже находятся различные кокки (стафилококки, стрептококки, сарцины), дифтеронды, споровые бациллы. Обильна микрофлора ротовой полости, где имеются благоприятные условия для ее развития (наличие питательных веществ, постоянная температура, влажность и т. д.): грамположительные *Leptothrix buccalis* (длинные тонкие нити), *B. maximus buccalis* (толстые палочки), диплококки, стрептококки, а также грамотрицательные бактерии, вибрионы и спирохеты, как *Borrelia buccalis* (грубая, крупная) и *Treponema microdentium* (более тонкая и изящная, напоминающая возбудителя сифилиса), а также микоплазмы, вирусы, грибы и дрожжи. Значительное количество микроорганизмов, в том числе патогенных, содержится в кариозных зубах (рис. 43).

Микрофлора разных отделов желудочно-кишечного тракта неодинакова в качественном и количественном отношении. В желудке и тонком кишечнике встречаются лишь отдельные, случайные микроорганизмы. Наиболее богата микрофлора толстого кишечника. У грудных детей она представлена молочнокислыми бактериями. У взрослых наиболее многочисленными обитателями толстого кишечника являются анаэробы: бактероиды-неспоровые грамотрицательные палочки (*Bacteroides fragilis* и др.) и споровые грамположительные



палочки (*Cl. perfringens*, *Cl. putrificus*, *Cl. sporogenes*), осуществляющие гнилостные процессы. Постоянным, но не самым многочисленным обитателем кишечника является кишечная палочка. В кишечнике здоровых людей содержатся также энтерококки, иногда встречаются энтеровирусы, аденовирусы, а также фаги.

В верхних дыхательных путях обитают разные кокки (дипло- и стрептококки), дифтероиды, а также могут быть обнаружены аденовирусы, микоплазмы; в 50% случаев в носоглотке здоровых людей встречается гемолитический стафилококк.

Наружные мочеполовые органы также содержат микробы, среди которых чаще всего встречаются ацидофильная, грамположительная палочка Дедерлейна на слизистой влагалища и кислотоупорная *Mycobacterium smegmatis*.

### Демонстрация

1. Микрофлора воздуха, воды и почвы (чашки с колониями).
2. Методы определения микробного числа и коли-титра воды.
3. Ускоренный метод определения коли-индекса воды.
4. Определение микробного числа воздуха при помощи прибора Кротова и методом осаждения по Коху.
5. Методы определения перфрингенс-титра и коли-титра почвы.

### Задание студентам для выполнения лабораторной работы

1. Произвести оценку санитарно-бактериологического состояния воздуха, воды, почвы по результатам следующих опытов:
  - а) определение микробного числа воздуха;
  - б) определение микробного числа водопроводной воды и воды открытых водоемов;
  - в) определения бродильного титра и коли-индекса воды;
  - г) определения микробного числа, перфрингенс-титра и коли-титра почвы.
2. Определить состав микрофлоры организма человека: а) зубного налета, слизистой зева, фекалий (при использовании ориентировочного бактериоскопического метода исследования), б) кожи лица, рук (при использовании бактериологического метода исследования).

## Методические указания

### Определение микробного числа воздуха

Количественные микробиологические методы исследования воздуха основаны на принципах осаждения (седиментации), аспирации или фильтрации.

а. Метод Коха используется для ориентировочного определения микробного числа воздуха. Чашку Петри с мясо-

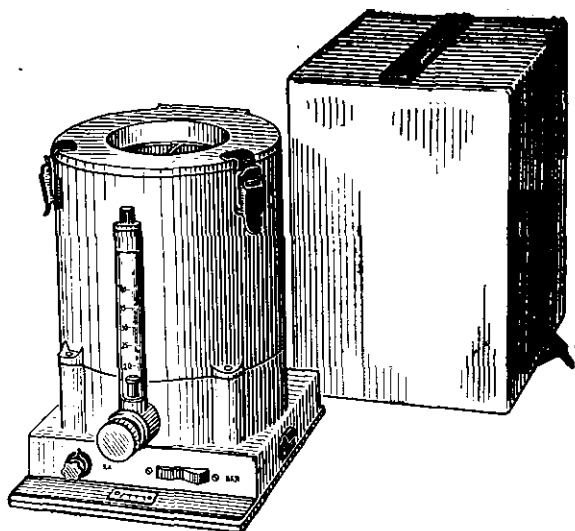


Рис. 44. Аппарат Кротова для бактериологического исследования воздуха.

пептонным агаром оставляют открытой в течение 5—10 мин. Затем ее закрывают и инкубируют при 37°C в течение 2 сут. Результаты учитывают путем подсчета числа выросших колоний, исходя из того, что на площадь чашки 100 см<sup>2</sup> в течение 5 мин оседают микробы, содержащиеся в 10 л воздуха. Определение микробного числа воздуха производят по формуле Омелянского:

$$x = \frac{a \cdot 100 \cdot 1000 \cdot 5}{b \cdot 10 \cdot t},$$

где  $x$  — количество микробов в 1 м<sup>3</sup> воздуха;  $a$  — количество колоний на питательном агаре в чашке Петри;  $b$  — площадь чашки Петри (лг<sup>2</sup>);  $t$  — время, в течение которого чашка была открыта, в мин; 5 — время по расчету Омелянского; 10 — объем воздуха, из которого происходит оседание микробов; 100 — площадь см<sup>2</sup>, на которую происходит оседание микробов; 1000 — искомый объем воздуха в л.

б. Метод Кротова является более точным количественным методом определения микробного числа воздуха с помощью специального прибора (рис. 44).

Расчет микробного числа производят по формуле:

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

где  $a$  — количество микробных колоний, выросших на чашке Петри;  $v$  — объем пропущенного через прибор воздуха в л; 1000 — искомый объем воздуха в л.

При определении общего микробного числа воздуха используют мясо-пептонный агар; для выделения зеленеющего стрептококка — кровяной агар с добавлением генцианового фиолетового (среда Гарро); для обнаружения в воздухе патогенных микробов — соответствующие элективные питательные среды.

### Определение микробного числа воды

Водопроводную воду засевают в объеме 1 мл, воду открытых водоемов — в объемах 1, 0,1, 0,01 мл. Все пробы вносят в стерильные чашки Петри, после чего их заливают расплавленным и остуженным до 45°C мясо-пептонным агаром и тщательно размешивают, вращая на столе. Посевы инкубируют при 37°C в течение 1—2 сут, а затем подсчитывают количество выросших на поверхности и в глубине среды колоний и вычисляют микробное число воды.

### Определение коли-титра и коли-индекса воды

При ориентировочном исследовании ограничиваются определением бродильного титра воды (наименьшего объема воды, при засеве которого происходит сбраживание углевода), полагая, что он соответствует коли-титру.

Воду открытых водоемов в объемах 100, 10, 1 и 0,1 мл засевают в среду Эйкмана (1% пептонная вода с 0,5% NaCl индикатор Андреде 0,5% глюкозы и поплавок). Для посевов больших количеств воды (100 и 10 мл) используют концентрированную среду Эйкмана, содержащую десятикратные концентрации указанных веществ, так как в очень разбавленной среде кишечная палочка не вырастет.

Для исследования водопроводной воды сеют 4 пробы по 100 мл и 10 проб по 10 мл в концентрированную среду Эйкмана. Посевы инкубируют в течение суток при 37°C. Определение бродильного титра производят по наличию пузырьков газа в поплавке. При исследовании водопроводной и вообще

питьевых вод из забродивших или помутневших проб делают высев на среду Эндо с последующей бактериоскопией и вторичной проверкой способности к газообразованию при 37°C при пересеве из колонии на среду Эйкмана. При положительных результатах определяют коли-титр и вычисляют коли-индекс. Например, при коли-титре воды 100 коли-индекс будет равен 10 ( $1000 : 100 = 10$ ).

Для прямого определения коли-индекса пользуются методом мембранных фильтров. Для этого используют воронку Зейтца с мембранным фильтром (см. с. 53), вмонтированную в колбу Бунзена, которая присоединяется к вакуум-насосу (см. рис. 32). Мембранные фильтры стерилизуют кипячением в дистиллированной воде. Строго определенный объем исследуемой воды фильтруют через мембранный фильтр, который затем помещают на поверхность среды Эндо в чашку Петри. Посевы инкубируют при 37°C в течение суток (рис. 45). Затем из 2—3 колоний красного цвета (типичных для кишечной палочки) готовят мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют; остатки этих колоний засевают в пробирку со средой Эйкмана, инкубируют при 37°C в течение суток. При наличии газообразования подсчитывают количество красных колоний на фильтре и определяют коли-индекс, из значения которого вычисляют коли-титр. Например, если коли-индекс равен 5, то коли-титр будет равен 200 ( $1000 : 5 = 200$ ).

### Определение микробного числа почвы

Почву берут стерильным ножом на глубине 10—15 см и помещают в стерильную банку. В лаборатории делают навеску почвы, из которой вначале готовят водную суспензию, а затем ее разведения  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ . Из двух последних разведений по 0,1 мл смешивают с 4 мл 0,7% расплавленного и остуженного до 45°C мясо-пептонного агара и выливают на чашки Петри с 2% мясо-пептонным агаром. Посевы инкубируют при 37°C. Затем подсчитывают количество выросших колоний и вычисляют микробное число.

### Определение коли-титра и перфрингенс-титра почвы

Различные разведения почвенной суспензии засевают в пробирки со средой Кесслера (1% пептонная вода с добавлением 5% желчи, 0,25% лактозы и гевцианового фиолетового для подавления роста грамположительных бактерий). Посевы

инкубируют при 37°C в течение суток. Коли-титр обычно определяют по забродившей пробе в пробирке с посевом максимального разведения почвенной суспензии.

Для определения перфрингенс-титра различные разведения почвенной суспензии засевают в пробирку со стерильным обезжиренным молоком или железосульфитной средой Вильсона — Блера, которую предварительно расплавляют и остужают до 45°C. Посевы инкубируют при 37°C в течение 24—48 ч, после чего учитывают результаты по свертыванию молока или по образованию черных колоний *Cl. perfringens* в агаровом столбике среды Вильсона — Блера. Из колоний делают мазки, окрашивают их по Граму, микроскопируют и вычисляют перфрингенс-титр.

### Изучение микрофлоры организма человека

Для изучения состава микрофлоры готовят мазки из зубного налета, со слизистой зева, окрашивают их по Граму и микроскопируют. С кожи лица и рук делают смывы стерильным ватным тампоном, смоченным в изотоническом растворе хлорида натрия. Этим же тампоном делают посев на мясо-пептонный агар в чашках Петри. Кроме того, отдельный тампон после смыва с кожи рук помещают в среду Эйкмана для обнаружения *E. coli*. Ориентировочную идентификацию микроорганизмов проводят по характеру выросших колоний и морфологии клеток в мазках, окрашенных по Граму. Отмечают характер роста в среде Эйкмана, обращая внимание на газообразование.

#### Контрольные вопросы

1. Микрофлора полости рта, респираторного тракта, желудочно-кишечного тракта, кожи, конъюнктивы глаза, урогениталий.
2. Какое значение имеет нормальная микрофлора для макроорганизма?
3. Что такое дисбактериоз и причины его возникновения?
4. Микрофлора воздуха, воды, почвы.
5. Какой микроб является санитарно-показательным для воздушной среды? Почему?
6. Методы санитарно-бактериологического исследования воздуха.
7. Какой микроб является санитарно-показательным для воды? Почему?
8. Методы санитарно-бактериологического исследования воды. Определение коли-титра и коли-индекса воды.
9. Какие микробы являются санитарно-показательными для почвы? Почему?
10. Методы определения коли-титра и перфрингенс-титра почвы.

## Тема 11. ДЕЙСТВИЕ ФИЗИЧЕСКИХ И ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА МИКРООРГАНИЗМЫ

### Программа занятия

1. Антибактериальное действие высокой температуры, лучистой энергии, высушивания и других физических факторов.
2. Антибактериальное действие химических веществ.

Микроорганизмы, находящиеся во внешней среде, подвергаются воздействию самых разнообразных физических и химических факторов.

К физическим факторам, оказывающим губительное действие на микробы, относятся высокие температуры (см. с. 51), лучистая энергия, ультразвук, высушивание и др.

Лучистая энергия в виде электромагнитных волн различной длины вызывает разнообразные физические и биохимические эффекты. Губительное действие на микроорганизмы оказывают ультрафиолетовые лучи с длиной волны 230—280 нм, ионизирующая радиация (особенно отрицательно заряженные ионы в концентрации  $5 \times 10^4$  в  $1 \text{ см}^3$  воздуха).

Высушивание оказывает губительное действие на многие микроорганизмы. Однако споры, а также вегетативные формы некоторых бактерий довольно устойчивы к высушиванию и легко могут переноситься в воздушном аэрозоле с частицами пыли. Высушивание используют для сохранения мяса, рыбы, овощей, фруктов. Высушивание быстрозамороженных микробных взвесей в вакууме (метод лиофильной сушки) является надежным методом сохранения жизнеспособности микроорганизмов и широко применяется для их консервации в лабораторных условиях.

Некоторые химические соединения оказывают губительное действие на подавляющее большинство микроорганизмов. Этиловый спирт ( $70^\circ\text{C}$ ) вызывает коагуляцию белков; фенолы, крезолы, нейтральные мыла, вещества, понижающие поверхностное натяжение (детергенты), нарушают регулируемую функцию цитоплазматической мембраны; соли тяжелых металлов (меди, серебра, ртути и др.) в низких концентрациях действуют как сильные ферментные яды, вызывая олигодинамическое действие.

Перечисленные соединения используются в медицинской практике в качестве антисептиков для дезинфекции разных материалов, помещений и т. д. К наиболее распространенным антисептикам относятся галогены и их производные (7% спиртовой раствор йода, 0,5—5% водные растворы хлорной извести, 3—5% растворы хлорамина); соли тяжелых метал-

лов (0,1% растворы сулемы, 1% раствор  $\text{AgNO}_3$ , растворы медного купороса), 3—5% растворы фенола или карболовой кислоты; этиловый спирт (70°), 1% раствор формалина; 1—2% раствор лизола. Выбор антисептика и его концентраций зависит от материала, подлежащего дезинфекции.

#### Задание студентам для выполнения лабораторной работы

1. Определить по готовым посевам антибактериальное действие УФ-лучей в отношении стафилококка и кишечной палочки.

2. Определить по готовым посевам антибактериальное действие фенола, перманганата калия, хлорамина и других антисептиков в отношении стафилококка и кишечной палочки.

Сделать соответствующие заключения.

#### Методические указания

**Изучение антибактериального действия УФ-лучей.** Суспензию стафилококка или кишечной палочки в изотоническом растворе хлорида натрия в объеме 1 мл помещают в стерильное часовое стекло и облучают лампой БУВ-30 в течение 15 мин на расстоянии 10—20 см от центра лампы. Облученную и необлученную (контрольную) суспензии бактерий засевают на мясо-пептонный бульон и инкубируют при 37°С в течение 16—24 ч, после чего отмечают отсутствие помутнения среды, связанное с гибелью облученной культуры бактерий, при наличии роста (помутнения) в контроле.

Для изучения антибактериального действия химических веществ (антисептиков) диски из фильтровальной бумаги смачивают растворами исследуемых веществ и помещают на поверхность мясо-пептонного агара в чашке Петри, засеянной («газоном») культурой стафилококка или кишечной палочки. Чашки инкубируют в течение суток при 37°С. Об антибактериальном действии исследуемых веществ судят по зонам задержки роста бактерий, образующихся вокруг фильтровальных бумажек.

#### Контрольные вопросы

1. Механизм антибактериального действия УФ-лучей.
2. Какие вещества относят к детергентам? Механизм их антибактериального действия.
3. В чем заключается метод лиофильной сушки и его практическое применение?
4. Для чего применяют УФ-облучение, формальдегид и детергенты?
5. Какое действие оказывает температура на микроорганизмы? Подразделение микробов по их отношению к температуре.
6. Действие физических и химических факторов на вирусы.

## Тема 12. СИМБИОЗ И АНТАГОНИЗМ МИКРОБОВ. АНТИБИОТИКИ. БАКТЕРИОЦИНОГЕНИЯ

### Программа двух занятий

1. Симбиотические и антагонистические взаимоотношения между микроорганизмами.
2. Антибиотики и методы определения их антибактериального действия.
3. Бактериоциногенция и методы ее изучения.

Во внешней среде различные микроорганизмы обитают в ассоциациях (биоценозах). В этих условиях взаимоотношения между ними могут проявляться в разных формах. Антагонистические взаимоотношения между микробами проявляются в угнетении роста одного микроба другим, что в конечном счете может привести к его гибели. Микробы-антагонисты широко распространены в природе. К ним принадлежат многие бактерии, грибы, актиномицеты.

Обнаружить микробы-антагонисты можно по образованию вокруг их колоний зон угнетения роста чувствительных бактерий. При этом диаметр зоны отражает степень активности микроба-антагониста.

Антагонистические свойства микроорганизмов могут быть обусловлены разными механизмами: высокой интенсивностью размножения, способностью резко изменять рН среды, выделением токсических продуктов метаболизма, протеолитических ферментов, образованием антибиотических веществ, бактериоцинов и др.

Антибиотиками называются вещества микробного или животного происхождения, избирательно подавляющие жизнеспособность микроорганизмов. Антимикробные вещества, образуемые растениями, называют фитонцидами. Среди микроорганизмов продуцентами антибиотиков являются актиномицеты, грибы и бактерии.

Антибиотики в основном обладают бактериостатическим действием, препятствуя размножению микроорганизмов, что нередко приводит и к бактерицидному эффекту (табл. 10).

Активность антибиотиков выражают в единицах действия (ЕД). Для определения активности разных антибиотиков используют соответствующие эталонные штаммы бактерий определенных видов: *Staphylococcus aureus*, *Bac. subtilis*, *E. coli*, *Bac. cereus* и др. Практически у многих антибиотиков биологическая активность 1 мкг сухого вещества соответствует 1 ЕД (стрептомицин, тетрациклин, канамицин, эритромицин и др.); 1 мг нистатина содержит около 2500 ЕД; для пеницил-



лина 1 ЕД равняется 0,6 мкг. В настоящее время общепринято выражать активность многих антибиотиков количеством единиц активного вещества в 1 мг препарата.

Эффективность антибиотикотерапии определяется главным образом степенью чувствительности бактерий к применяемому антибиотику. Увеличивающаяся с каждым годом циркуляция антибиотикорезистентных форм бактерий в значительной мере снижает ее возможности. Резистентность бактериальных клеток к антибиотическим препаратам контролируется генами, локализованными на хромосоме или чаще всего в R-плазмидах (эписомах), ответственных за множественную устойчивость бактерий к антибиотикам и сульфаниламидам. R-плазмиды содержатся в цитоплазме антибиотикорезистентных бактерий и сравнительно легко передаются к чувствительным бактериям, принадлежащим к разным видам и родам (например, R-плазмиды *E. coli* при конъюгации — шигеллам и сальмонеллам).

Резистентность бактерий к антибиотикам обусловлена различными механизмами. Она часто связана с их способностью синтезировать ферменты, разрушающие определенные антибиотические вещества. Так, у большинства пенициллинорезистентных форм стафилококков обнаружена пенициллиназа ( $\beta$ -лактамаза), которая расщепляет  $\beta$ -лактамное кольцо в молекуле пенициллина, в результате чего образуется неактивная пенициллановая кислота. Аминоглюкозидные антибиотики (стрептомицин, неомицин, канамицин и др.), левомецетин также инактивируются соответствующими ферментами, образование которых контролируется R-плазмидами.

Часто антибиотики играют роль селективного фактора при воздействии на бактериальную популяцию, состоящую из чувствительных и резистентных клеток. При этом, задерживая размножение чувствительных клеток, они способствуют накоплению резистентных клеток в популяции бактерий, что приводит к рецидивам и другим осложнениям при антибиотикотерапии различных заболеваний.

Бактериоциногией называется способность бактериальных клеток продуцировать специфические антибактериальные вещества — бактериоцины, подавляющие жизнедеятельность бактериальных клеток других штаммов того же вида или филогенетически родственных видов. Эта способность определяется специальной плазмидой — бактериоциногенным фактором, который локализуется в цитоплазме. Бактериоцины продуцируются отдельными клетками данной популяции, которые при этом погибают. Остальные клетки

Наименование антибиотика	Продуцент	Химическая природа
Пенициллин	<i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Penicillium notatum</i> и др.	Гетероциклические соединения сложного состава с $\beta$ -лактамовым и тиазалидиновым кольцами
Циклосерин	<i>Streptomyces lavendulae</i>	Производное D-4-амино-3-изоксазолидинола
Стрептомицин	<i>Streptomyces griseus</i>	Аминоглюкозидное соединение основного характера
Неомицин, мономицин, канамицин, гентамицин	<i>Streptomyces fradiae</i> , <i>Actinomyces circulatus</i> , <i>Streptomyces kanamycetius</i>	Аминоглюкозидное соединение
Левомецетин (хлорамфеникол)	<i>Streptomyces venezuelae</i>	D-трео-1-(п-нитрофенил)-2-дихлорацетиламино-1,3-пропандиол
Тетрациклины: хлортетрациклин, морфоциклин и др.	<i>Streptomyces aureofaciens</i> , <i>Streptomyces rimosus</i> и др.	Тетрабензолы с различными радикалами
Эритромицин, олеандомицин	<i>Streptomyces erythraeus</i> , <i>Streptomyces antibioticus</i>	Макролиды. Состоят из макроциклического лактонного кольца, связанного с одним или несколькими углеводными остатками
Нистатин, леворин	<i>Streptomyces noursei</i> , <i>Actinomyces levoris</i>	Полиеновые соединения ациклического строения

## ных антибиотиков

Чувствительные микроорганизмы	Механизм противомикробного действия
Гноеродные кокки, грамположительные бактерии, трепонемы, боррелии, хламидии (возбудитель орнитоза)	Блокируют ферменты (транспептидазу муреина и $\beta$ -аланин-карбоксипептидазу), которые связывают между собой пептидными мостиками углеводные цепи в гликопептидном (муреиновом) слое клеточной стенки
Грамположительные и кислотоупорные бактерии, риккетсии, хламидии	Действуют на ферменты аланина, что приводит к нарушению образования пептидных мостиков в гликопептидном слое клеточной стенки
Туберкулезные микобактерии, грамотрицательные (в том числе возбудители чумы, бруцеллеза) и грамположительные бактерии	Фиксируясь на 30S субъединицах рибосом, изменяет их конформацию, что приводит к неправильному считыванию кодонов иРНК антикодонами тРНК и нарушению синтеза полипептидной цепи
Грамположительные и многие грамотрицательные бактерии и некоторые простейшие	Реагируют с 30S субъединицами рибосом, нарушая образование комплекса рибосома — аминоктил-тРНК-иРНК, в результате чего прекращается синтез полипептидной цепи
Грамположительные и некоторые грамотрицательные бактерии, риккетсии, хламидии	Реагируют с 50S субъединицами рибосом, препятствуя их связыванию с N-концевыми участками аминоктил-тРНК, что ингибирует образование пептидной связи между аминокислотами в полипептидной цепи
Грамположительные и многие грамотрицательные бактерии, лептоспиры, риккетсии, хламидии, микоплазмы	Фиксируясь на 50S субъединицах рибосом, препятствуют включению в них аминоктил-тРНК, что приводит к нарушению синтеза полипептида
Грамположительные и некоторые грамотрицательные бактерии	Фиксируясь на 50S субъединицах рибосом, блокируют перенос аминокислот от тРНК к рибосоме, в результате чего прекращается наращивание полипептидной цепи
Дрожжеподобные грибы рода <i>Candida</i> , простейшие (амебы, лейшмании, трихомонасы)	Реагируют с эргостеринами цитоплазматической мембраны грибов, нарушая их морфологическую структуру и функциональные свойства

этой популяции являются устойчивыми к действию гомологичных бактериоцинов. Обычно синтез бактериоцинов заторможен (репрессирован), однако под воздействием некоторых индуцирующих агентов (УФ-облучение и др.) он может быть дерепрессирован. Механизм противобактериальной активности бактериоцинов, по-видимому, связан с их первоначальным действием на цитоплазматическую мембрану клеток.

Бактериоцины продуцируют самые разнообразные бактерии.

Колицины, продуцируемые разными типами кишечной палочки, отличаются друг от друга по спектру чувствительных к ним бактерий. Колициногенные факторы, детерминирующие синтез различных колицинов, обозначают буквами латинского алфавита (col A, col B и т. д.). Определение типа колициногенного фактора бактерий (т. е. колициногенотипирование бактерий) позволяет маркировать бактерии одного и того же вида (серотипа), что может иметь эпидемиологическое значение при установлении источника инфекции.

### Демонстрация

1. Метод определения антагонистической активности микробных культур.

#### Задание студентам для выполнения лабораторной работы

1. Провести исследование по определению чувствительности стафилококка к различным антибиотикам (методом дисков).

2. По результатам поставленных опытов определить: а) бактериостатическую дозу пенициллина для различных бактериальных культур (методом серийных разведений); б) наличие col-факторов у различных штаммов *E. coli*; в) колициногенотип исследуемой культуры *E. coli*.

### Методические указания

**Определение антагонистических свойств микробов.** Исследуемый микроб-антагонист засевают в центре чашки Петри на мясо-пептонном агаре в виде узкой полоски, перпендикулярно к которой наносят различные бактериальные культуры. Посевы инкубируют в термостате, после чего учитывают результаты по отсутствию роста бактерий в непосредственной близости от микроба-антагониста.

Антагонистические свойства медленно растущих грибов и актиномицетов устанавливают после их выращивания в течение нескольких суток на одной половине мясо-пептонного агара в чашке Петри, затем вторую половину чашки залива-

ют расплавленной и остуженной агаровой средой, элективной для тест-бактерий, которые засевают в виде полоски вплотную к краю колонии гриба. Результаты опытов учитывают так же, как и в предыдущем случае.

**Качественный метод определения чувствительности бактерий к антибиотикам (метод дисков).** Бумажные диски, пропитанные определенными антибиотиками, помещают на поверхность мясо-пептонного агара в чашки Петри, предварительно засеянного «газоном» исследуемой бактериальной культуры. Посевы инкубируют в течение 16—24 ч, после чего учитывают результаты опыта по образованию светлых зон задержки роста бактерий. По диаметру этих зон ориентировочно судят о чувствительности бактерий к антибиотикам. Так, зоны диаметром до 15 мм указывают на слабую, до 25 мм — на среднюю и более 25 мм — на сравнительно высокую чувствительность исследуемого микроорганизма к антибиотику (рис. 46).

**Количественный метод определения чувствительности бактерий к антибиотикам.** Данный метод считается наиболее точным для количественного определения чувствительности бактерий к антибиотикам. Основной раствор антибиотика, содержащий, например, 100 ЕД/мл, готовят с помощью буферного раствора или специального растворителя. Серийные разведения препарата готовят в пробирках, содержащих 1 мл мясо-пептонного бульона. В 1-ю пробирку вносят 1 мл исходного раствора препарата, после чего готовят серию (ряд) последовательных разведений препарата от 50 до 0,1 ЕД/мл в равных объемах питательной среды. Затем в каждую пробирку вносят 0,1 мл испытуемой бактериальной суспензии, густотой 1 млрд/мл по оптическому стандарту. Одновременно ставят контроли — бактерий (1 мл мясо-пептонного бульона + 0,1 мл суспензии бактерий) и антибиотика (мясо-пептонный бульон + антибиотик). Посевы инкубируют в течение 18—24 ч, после чего отмечают результаты — отсутствие помутнения среды свидетельствует о задержке роста бактерий в присутствии данной концентрации препарата (табл. 11). Бактериостатической дозой называется наименьшая концентрация антибиотика, в присутствии которой угнетается видимый рост бактерий.

Для определения бактерицидного действия препарата дополнительно производят высевы петлей из пробирок при отсутствии видимого роста бактерий на чашки Петри с плотной питательной средой, не содержащей антибиотика. Наименьшая концентрация антибиотика, вызывающая полную гибель

Схема количественного определения чувствительности бактерий к антибиотикам методом серийных разведений

Ингредиенты	Пробирки											
	1-я	2-я	3-я	4-я	5-я	6-я	7-я	8-я	9-я	10-я	11-я конт- роль бакте- рий	12-я конт- роль анти- био- тика
Объем мясо-пептонного бульона, мл	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Антибиотик (основной раствор, содержащий 100 ЕД/мл)	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Приготовление серийных разведений	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1*	—	—
Концентрация антибиотика ЕД/мл	50	25	12,5	6,2	3,1	1,6	0,8	0,4	0,2	0,1	—	50
Взвесь бактерий, мл	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	—

Инкубация в термостате при 37°С в течение 18—24 ч

Результат

\* 1 мл удаляют для сохранения одинакового объема во всех пробирках.

испытуемых бактерий, называется бактерицидной дозой.

**Определение колициногенных факторов.** Исследуемые бактериальные культуры кишечных палочек засевают уколом в мясо-пептонный агар на чашках Петри (по 7—8 посевов на одну чашку). Посевы инкубируют при 37°C в течение 24—48 ч. Затем бактерии убивают парами хлороформа. После этого по поверхности агара распределяют 3 мл расплавленного и остуженного до 45°C 0,7% мясо-пептонного агара, смешанного с 0,1 мл 4-часовой бульонной индикаторной культурой. Через 18—24 ч после инкубирования посевов при 37°C вокруг колоний исследуемых культур, обладающих бактериоциногенной активностью, появляются зоны подавления роста индикаторного штамма.

**Методика определения колициногенотипа.** В мясо-пептонный агар в чашке Петри уколом засевают штаммы эталонных бактерий с известным колициногенотипом. Посевы инкубируют при 37°C в течение 24—48 ч, затем бактерии убивают парами хлороформа. После удаления хлороформа по поверхности агара распределяют 3 мл расплавленного и охлажденного до 45°C 0,7% мясо-пептонного агара, смешанного с 0,1 мл 4-часовой бульонной исследуемой культуры *E. coli*. Через 18—24 ч после инкубирования посевов при 37°C отмечают результаты опыта по наличию или отсутствию роста исследуемой культуры вокруг эталонных штаммов. Исследуемая культура даст рост лишь в том случае, если ее колициногенотип совпадает с колициногенотипом эталонной культуры, в другом случае рост будет подавлен.

### Контрольные вопросы

1. Антагонизм среди микробов и механизм этого явления. Какие методы выявления микробного антагонизма известны?
2. Классификация антибиотиков по их происхождению, механизму действия и спектру действия.
3. Назовите антибиотики, действующие на синтез клеточной стенки, синтез белка, синтез нуклеиновых кислот, на цитоплазматическую мембрану.
4. Особенности ингибирования в бактериальных клетках синтеза белка стрептомицином, тетрациклином, левомицетином.
5. Основные механизмы формирования антибиотикоустойчивых форм бактерий и роль антибиотиков в этом процессе.
6. Основные механизмы резистентности бактерий к антибиотикам.
7. Какие генетические элементы контролируют устойчивость бактерий к антибиотикам? В чем различие плазмидной и хромосомной устойчивости бактерий к антибиотикам?
8. Способы передачи лекарственной устойчивости от резистентных бактерий к чувствительным.

9. Как определить антибактериальный спектр действия антибиотика? Приведите примеры антибиотиков широкого и узкого спектра действия.

10. Методы определения чувствительности бактерий к антибиотикам.

11. Что принято за единицу активности антибиотиков?

12. Понятие о химиотерапевтическом индексе. Механизм действия сульфаниламидов, препаратов гидразид-изоникотиновой кислоты (ГИНК), препаратов мышьяка?

13. Что такое бактериоцины. Их химический состав и механизм действия.

14. В чем заключается метод колициногенотипирования бактерий и его практическое применение?

### Тема 13. ГЕНЕТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ

Сравнительная простота, доступность и высокие аналитические возможности микробиологических методов изучения изменчивости и механизмов передачи наследственной информации сделали бактерии и вирусы прекрасной моделью для решения кардинальных проблем общей и молекулярной генетики.

Изменчивость микроорганизмов может быть обусловлена модификациями, мутациями и рекомбинациями.

**Модификация** — это не наследуемые фенотипические изменения, которые возникают при воздействии на бактериальную культуру различных факторов. Модификации в отличие от мутаций затрагивают большое число клеток бактериальной популяции, у которых появляются однотипные изменения. В некоторых случаях приобретенный признак может наследоваться в течение некоторого времени после окончания действия фактора, вызвавшего его образование. Однако в конечном итоге он утрачивается в потомстве.

К модификациям относятся нестабильные L-формы бактерий, некоторые лекарственно-устойчивые бактерии и др. Модификации возникают и у вирусов. В этом случае они контролируются клеткой хозяина, зараженной вирусом.

**Мутации** характеризуются структурными изменениями в геноме, затрагивающими один ген или группу генов. Чаще всего мутации являются редкими событиями, которые проявляются в единичных бактериальных клетках среди миллионов других представителей той же популяции бактерий. В результате мутаций могут изменяться самые разнообразные признаки микроорганизмов. Эти изменения касаются: 1) морфологических структур бактериальной клетки — утраты способности к образованию капсулы, жгутиков, клеточной стен-



ки (у стабильных L-форм); 2) сочетанных изменений формы колоний, антигенных, вирулентных и других признаков при S→R мутациях; 3) биохимических признаков у ауксотрофных мутантов, связанных с нарушениями в метаболических путях синтеза отдельных аминокислот, ростовых факторов и других жизненно важных соединений; 4) приобретения бактериями лекарственной устойчивости, устойчивости к фагам и т. д.

Мутации являются наследуемыми изменениями, которые в ходе отбора приводят к накоплению наиболее приспособленных к данным условиям форм или к нарушению слаженности работы отдельных генов и гибели клеток.

Рекомбинациями называются процессы обмена генетическим материалом между двумя бактериальными клетками. Поскольку клетка реципиента воспринимает большее или меньшее количество генов донора, рекомбинантные клетки не являются полноценными зиготами, а представляют собой мерозиготы, содержащие хромосому реципиента, в которую включаются лишь отдельные фрагменты хромосомы донора. Рекомбинации у бактерий могут происходить в результате: а) трансформации — проникновения отдельных фрагментов хромосомы (ДНК) донора в клетку реципиента без непосредственного контакта между бактериальными клетками; б) трансдукции — переноса фрагментов хромосомы донора в клетку реципиента с помощью умеренного фага; в) конъюгации — переноса части хромосомы донора в клетку реципиента при непосредственном контакте между двумя бактериальными клетками.

Рекомбинации между вирусами возможны в том случае, когда две родственные вирусные частицы инфицируют одну и ту же клетку хозяина.

### Программа двух занятий

1. Модификации у бактерий и методика их выявления.
2. Мутации у бактерий и методика их выявления.
3. Изучение генетических рекомбинаций у бактерий в опытах трансформации, трансдукции и конъюгации.

### Демонстрация

S- и R-формы колоний *E. coli* и других бактерий.

### Задание студентам для выполнения лабораторной работы

1. Определить подвижность *Proteus vulgaris* после воздействия фенола и сделать заключение о механизме выявленных изменений.

2. Определить механизм образования стрептомицинорезистентных форм ( $Str^r$ ) культуры *E. coli* по данным флюктуационного опыта Луриа и Дельбрюка.

3. Определить частоту образования трансформантов (рекомбинантов) по данным опыта трансформации признака  $Str^r$  (резистентности к стрептомицину) у *Bac. subtilis*.

4. Определить частоту образования трансдуктантов *E. coli lac<sup>+</sup>* по данным опыта трансдукции  $\beta$ -галактозидазного оперона фагом  $\lambda$  dgal.

5. Определить частоту образования рекомбинантов *E. coli. K 12 leu<sup>+</sup>, Str<sup>r</sup>* по данным опыта конъюгации.

## Методические указания

**Постановка опыта для выяснения механизма действия фенола на подвижность бактерий.** Культуру *Proteus vulgaris* засевают в две пробирки с мясо-пептонным бульоном, в одну из которых был предварительно внесен 1% раствор фенола. После суточной инкубации при 37°C определяют подвижность протей в препаратах, приготовленных из обеих пробирок. Неподвижную культуру протей из пробирки со средой с фенолом пересевают в пробирку с мясо-пептонным бульоном и инкубируют в течение 18—20 ч. На следующем занятии определяют реверсию утраченного признака (подвижности) и делают заключение о модификационном характере изменчивости.

**Постановка флюктуационного опыта Луриа и Дельбрюка.** Флюктуационный опыт (тест) применяется для выявления частоты спонтанных мутаций, которые могут появиться в бактериальной популяции без предварительного воздействия каких-либо агентов (фагов, антибиотиков и т. д.). Для определения числа стрептомициноустойчивых ( $Str^r$ ) мутантов в культуре *E. coli* ее засевают одновременно в одну пробирку с 10 мл мясо-пептонного бульона и в 10 пробирок по 1 мл мясо-пептонного бульона так, чтобы в каждой пробирке содержалось примерно 100—1000 клеток. После суточной инкубации посевов из каждой пробы делают высевы на чашки с мясо-пептонным агаром, содержащим 100 ЕД стрептомицина. Пробы из 1-й пробирки («общей» культуры) в объеме по 0,1 мл сеют на 10 чашек, пробы из 10 пробирок («независимых» культур) — на отдельную чашку каждую. Таким образом, всего засевают 20 чашек, которые инкубируют в течение суток (рис. 47).

На агаре могут вырасти колонии только из тех бактериальных клеток, которые резистентны к 100 ЕД стрептомицина,

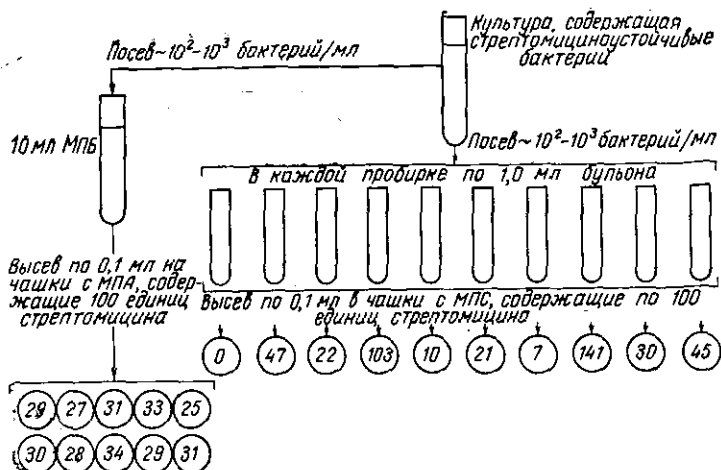


Рис. 47. Схема постановки опыта флюктуации Лурья и Дельбрюка. Цифрами обозначено количество стрептомициноустойчивых колоний на чашках.

В том случае, если бы стрептомицинорезистентные бактерии образовались в течение суточного контакта с антибиотиком, то число колоний на всех чашках было бы примерно одинаковым. Тогда следовало бы сделать вывод об адапционном механизме устойчивости исследуемой культуры к стрептомицину.

Если же число колоний на чашках, выросших при высевах каждой из 10 «независимых» культур, значительно отличается друг от друга, то это свидетельствует не о возникновении, а о предсуществовании мутантных клеток в исследуемой популяции бактерий. Данный вывод подтверждается тем, что мутации являются редким событием и могут проявиться только в некоторых (а не во всех) «независимых» культурах. Значительные колебания (флюктуации) числа мутантных клеток в разных «независимых» культурах обусловлены временем возникновения мутаций. Культура, в которой мутация произошла задолго до высева на чашки, будет содержать большое число устойчивых клеток и наоборот. При высевах из «общей» культуры такие флюктуации не смогут проявиться, так как мутанты, независимо от момента их возникновения, будут равномерно распределены во всей популяции бульонной культуры.

**Постановка опыта трансформации.** Реципиент: *Vac. subtilis Str<sup>s</sup>* (чувствительная к стрептомицину). Донор: раствор ДНК, выделенный из сенной палочки *Str<sup>r</sup>* (резистентной к стрептомицину). Селективная среда: мясо-пептонный агар, содержащий 100 ЕД/мл стрептомицина.

К 1 мл предварительно выращенной на мясо-пептонном бульоне культуры сенной палочки добавляют 1 мкг ДНК донора в 1 мл раствора. Смесь инкубируют при 37°C в течение 30 мин. Затем в пробирку вносят 0,1 мг/мл раствора ДНК-азы в 0,5 М растворе хлорида магния для разрушения ДНК, не проникшей в бактериальные клетки. После 5-минутной инкубации 0,2 мл смеси высевают на селективную среду со стрептомицином в чашки Петри. Для определения концентрации клеток реципиентного штамма высевают культуру реципиента на среду без стрептомицина (рис. 48), а в качестве контроля ее сеют на среду со стрептомицином. Посевы инкубируют при 37°C и на следующий день учитывают результаты опыта по числу выросших колоний на разных средах. После подсчета числа колоний вычисляют частоту трансформации по отношению числа рекомбинантов (трансформантов) к числу клеток реципиентного штамма. Например, при высеве 0,2 мл смеси культуры реципиента с ДНК на среду со стрептомицином выросло 130 колоний. При высеве 0,2 мл культуры реципиентного штамма, разведенного  $10^{-5}$ , на среду без стрептомицина выросло 170 колоний. При этом подразумевается, что каждая колония образована одной клеткой. Частота трансформации в данном случае будет равна:

$$\frac{6,5 \times 10^2}{8,5 \times 10^7} = 0,76 \times 10^{-5}.$$

**Постановка опыта специфической трансдукции.** Реципиент: культура *E. coli lac<sup>-</sup>*. Фаг ламбда- $\lambda$  dgal, несущий  $\beta$ -галактозидазный оперон (gal), контролирующей ферментацию лактозы. Поскольку данный оперон замещает в геноме фага  $\lambda$  часть его собственных генов, фаг становится дефектным и обозначается буквой d. В качестве селективной среды используется среда Эндо.

Для постановки опыта к 1 мл 3-часовой бульонной культуры реципиента добавляют 1 мл фага  $\lambda$  dgal в концентрации  $10^6$ — $10^7$  частиц/мл. Смесь инкубируют при 37°C в течение 60 мин, после чего высевают по 0,1 мл на чашки со средой Эндо и равномерно распределяют шпателем по поверхности агара. В качестве контроля реципиентную культуру также

высевают на среду Эндо. Посевы инкубируют до следующего дня (рис. 49).

После подсчета числа колоний на чашках определяют частоту трансдукции по отношению числа клеток трансдуктантов, обнаруженных на всех чашках, к числу клеток реципиентного штамма.

Например, после посева 0,1 мл смеси в разведении  $10^{-6}$  на чашках выросло 138, 170, 160 бесцветных колоний реципиентного штамма. На первой и последней чашках обнаружены пять и одна колония трансдуктантов красного цвета (см. рис. 49). Следовательно отношение числа выросших колоний трансдуктантов к числу колоний реципиентного штамма будет равно:

$$\frac{6}{468} = 1,3 \times 10^{-2}.$$

**Постановка опыта конъюгации.** Донор: культура *E. coli* K12 Hfr, leu<sup>+</sup>, Str<sup>r</sup>. Реципиент: культура *E. coli* K12 F<sup>-</sup> leu<sup>-</sup>, Str<sup>r</sup>. Селективная среда для выделения рекомбинантов: синтетическая минимальная среда (содержащая  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 6,8 г,  $\text{MgSO}_4$  — 0,1 г,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  — 1 г,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  — 0,001 г,  $\text{FeSO}_4$  — 0,0005 г, глюкозу — 2 г, стрептомицин — 200 ЕД/мл и дистиллированную воду — 1 л).

Для постановки опыта: к 2 мл 3-часовой бульонной культуры реципиента добавляют 1 мл бульонной культуры донора. Посевы инкубируют при 37°C в течение 30 мин. Затем готовят разведения смеси  $10^{-2}$ — $10^{-3}$  и высевают по 0,1 мл на селективную плотную среду в чашки Петри, на которой могут вырасти только колонии рекомбинантов. В качестве контролей на ту же среду засевают культуры донора и реципиента, которые не будут расти на данной среде, так как первая чувствительна к стрептомицину, а вторая ауксотрофна по лейцину (рис. 50).

Кроме того, культуру донорского штамма высевают на селективную среду без стрептомицина, а культуру реципиентного штамма — на полную среду (мясо-пептонный бульон) со стрептомицином для определения числа жизнеспособных клеток. Все посевы инкубируют до последующего дня при 37°C.

После подсчета числа выросших колоний определяют частоту рекомбинаций, исходя из отношения количества рекомбинантов к числу реципиентных клеток. Например, после посева 0,1 мл смеси в разведении  $10^{-2}$  выросло 150 колоний, а

после посева 0,1 мл культуры реципиента выросло 75/колоний. Следовательно, частота рекомбинации будет равна:

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

### Контрольные вопросы

1. Дайте определение понятиям: генотип и фенотип микроорганизмов. Что представляют собой генетические детерминанты бактерий и вирусов?

2. Какой фрагмент ДНК называют кодоном? Почему генетический код называют триплетным и вырожденным?

3. Что представляют собой процессы транскрипции и трансляции? Какова функция оперона и гена регулятора?

4. Каким образом регулируются функции структурных генов у бактерий?

5. Чем отличается бактериальная хромосома от хромосом животных и растительных клеток?

6. Дайте определение мутациям. Чем отличаются мутации от других форм изменчивости микроорганизмов?

7. Классификация мутаций по происхождению, молекулярным механизмам и последствиям для бактериальной клетки.

8. Какие мутации называют прямыми, обратными, супрессорными и механизм их возникновения? Какие мутации приводят к наибольшим и наименьшим по протяженности изменениям в ДНК?

9. Всегда ли мутация проявляется в фенотипе? Каков механизм спонтанных мутаций?

10. Как происходят процессы репарации в бактериальной клетке? К каким последствиям приводят ошибки в этом процессе?

11. Дайте характеристику модификационной изменчивости у бактерий. Какие признаки бактерий подвергаются модификациям?

12. Что такое плазмиды (эписомы) бактерий? Их локализация, химический состав и функциональная роль. Какие известны плазмиды?

13. Что такое рекомбинации? Какие формы рекомбинации известны у бактерий?

14. Основные этапы трансформации у бактерий. Что такое состояние компетентности клеток реципиентов?

15. Основные этапы трансдукции. В чем отличие трансдукции общего типа от специфической трансдукции?

16. Основные этапы конъюгации. Какие клетки называют F<sup>-</sup>, F<sup>+</sup> и Hfr?

## ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ УЧЕНИЯ ОБ ИНФЕКЦИИ И ИММУНИТЕТЕ

В данном разделе описаны сложные процессы взаимодействия микроба-паразита с организмом хозяина, характер которых определяется биологическими свойствами возбудителя, состоянием и реактивностью макроорганизма и той средой, в которой происходит контакт между ними.

При изучении иммунитета основное внимание обращено на ознакомление студентов с иммунологическими (серологическими) реакциями, применяющимися при лабораторной диагностике инфекционных и неинфекционных заболеваний, и с методами приготовления специфических диагностических, лечебных и профилактических препаратов. Изучение вопросов инфекции и иммунитета закладывает базу для понимания студентами патогенеза инфекционных заболеваний.

### ИНФЕКЦИЯ

Инфекция — это совокупность всех биологических явлений и процессов, возникающих и развивающихся в организме при внедрении и размножении в нем микробов, способных вызвать нарушение постоянства внутренней среды организма, его нормальных физиологических функций. (В. Д. Тимakov, 1973). Микроорганизмы, способные проникать, размножаться в тканях макроорганизма и вызывать заболевание, называются патогенными. Патогенность — это потенциальная, генетически детерминированная способность микробов вызывать инфекционный процесс в организме хозяина. Для каждого вида патогенных микробов характерны определенные факторы патогенности, обеспечивающие его заразительность и инвазивность, распространение в тканях, выживаемость и размножение, а также повреждающее действие на макроорганизм. К ним относятся структурные элементы микробной клетки (например, капсула, клеточная стенка), ферментные системы, нарушающие целостность некоторых тканей макроорганизма (гиалуронидаза, лецитовителлаза, коллагеназа, плазмокоагулаза, нейраминидаза и др.), бактериальные эндо- и экзотоксины. Степень выраженности факторов патогенности у конкретных штаммов обуславливает их ви-

рулентность, у бактерий, продуцирующих экзотоксины, — токсигенность. Вирулентность — это количественная характеристика степени патогенности данного штамма микроорганизма в отношении животных определенного вида при стандартных условиях заражения. Ее можно рассматривать как фенотипическое проявление генотипа патогенного микроорганизма.

## Тема 14. ПАТОГЕННОСТЬ И ВИРУЛЕНТНОСТЬ МИКРОБОВ. ТОКСИНЫ

### Программа двух занятий

1. Методы экспериментального заражения и иммунизации животных.
2. Бактериологическое исследование трупов павших животных.
3. Изучение факторов патогенности и вирулентности микробов.
4. Методы определения силы токсина.

### Задание студентам для выполнения лабораторной работы

#### Занятие 1-е

1. Заразить белую мышь подкожно суточной бульонной культурой испытуемых бактерий.
2. Посеять культуру стафилококка на среды для изучения факторов патогенности.
3. Поставить дермопекротическую пробу.
4. Определить силу экзотоксина в опыте на белых мышах.
5. Провести внутривенно иммунизацию кролика убитой вакциной для получения иммунопной сыворотки (первое введение антигена).

#### Занятие 2-е

1. Произвести бактериологическое исследование трупов белых мышей, павших после заражения. Определить присутствие возбудителя в органах и тканях, отметить наличие капсулообразования. Сделать заключение о форме инфекции и возможных причинах гибели животного.
2. Отметить результаты посева стафилококка на питательные среды и сделать соответствующее заключение.
3. Отметить результаты дермопекротической пробы на кролике.
4. Провести иммунизацию кролика убитой вакциной — второе введение антигена.

### Методические указания

Экспериментальное заражение животных. Инфекционный процесс может быть искусственно воспроизведен путем экспериментального заражения лабораторных животных: кроликов, морских свинок, белых мышей, белых крыс и др.



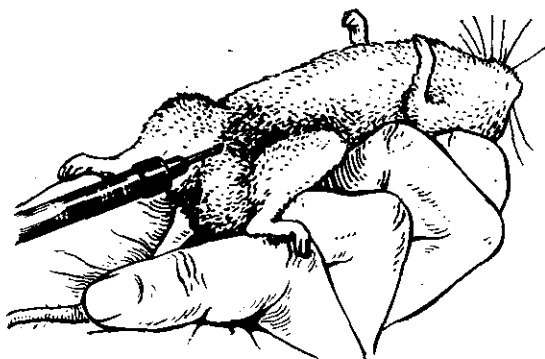


Рис. 51. Внутрибрюшинное заражение белой мыши.

Экспериментальное заражение животных производится с различными целями: 1) изучения патогенности и вирулентности микроорганизмов; 2) выделения чистой культуры возбудителя из различных материалов; 3) испытания лечебного действия химиотерапевтических препаратов; 4) воспроизведения экспериментальной инфекции и др.

Заражают животных накожно, внутрикожно, подкожно, внутримышечно, внутривенно, перорально, интраназально, внутритрахеально, интрацеребрально и внутрибрюшинно. Перед началом опыта животных отбирают, взвешивают и маркируют. При заражении мышь берут за хвост, опускают на стол, туловище быстро прижимают к столу двумя пальцами и, скользя ими по спине, захватывают кожу над головой; мышь фиксируют в левой руке в растянутом состоянии. Взвесь микробов в изотоническом растворе хлорида натрия определенной густоты набирают в шприц через иглу. Шприц держат, как писчее перо, в правой руке.

При подкожном заражении иглу вводят в кожную складку на спине или у корня хвоста и медленно вводят содержимое шприца под кожу. Затем иглу быстро извлекают, прикрыв место инъекции ватой, смоченной спиртом.

При внутрибрюшинном заражении животное фиксируют головой вниз, чтобы кишечник переместился к диафрагме. В левой нижней трети живота делают прокол кожи, держа иглу под острым углом, затем переводят шприц в положение, перпендикулярное брюшной стенке, толчкообразным движением прокалывают брюшину и вводят содержимое шприца (рис. 51).

Инструменты до заражения и после него стерилизуют кипячением.

**Бактериологическое исследование трупов животных (белых мышей).** Целью бактериологического исследования трупа является обнаружение микроба, вызвавшего гибель животного, определение места его локализации в организме и выделение чистой культуры возбудителя. Вскрытие производят сразу после гибели животного, соблюдая правила асептики, чтобы избежать загрязнения посторонними микробами. Мышь помещают брюшком вверх на марлю, смоченную дезинфицирующим раствором, поверх резиновой прокладки, и прикрепляют булавками за лапки. Тщательно обрабатывают кожу дезинфицирующим раствором. Вскрытие производят стерильными инструментами. Начиная с продольного разреза кожи по прямой линии от нижней челюсти до лобка, ее осторожно отсекают в стороны, делая разрезы к лапкам. Отмечают состояние подкожной клетчатки и лимфатических узлов, при необходимости делают из них мазки-отпечатки и посевы. Для вскрытия грудной полости делают поперечный разрез под мечевидным отростком и два продольных разреза через ребра параллельно грудице. Откидывают вырезанный лоскут и осматривают органы грудной полости, отмечая в протоколе наличие экссудата (рис. 52).

Для посева крови из сердца участок его поверхности прижигают раскаленным кончиком пинцета и вводят капилляр стерильной пастеровской пипетки в полость сердца. Затем каплю крови из пипетки выдувают в пробирку со средой и на предметное стекло для приготовления мазка. Из ткани легких готовят мазки-отпечатки и делают посевы. Брюшную полость вскрывают продольным разрезом брюшины ножницами, стараясь не задеть кишечник. Осматривают органы брюшной полости, отмечая в протоколе наличие экссудата, величину, цвет и консистенцию печени, селезенки, надпочечников, мезентериальных лимфатических узлов. При необходимости делают посевы из тех же органов на питательные среды. Для приготовления мазков-отпечатков вырезают из печени, селезенки, почек небольшие кусочки ткани, берут их пинцетом и прикасаются к предметному стеклу поверхностью разреза. Мазки-отпечатки фиксируют в жидком фиксаторе и окрашивают метиленовым синим. При микроскопии отмечают присутствие микроба-возбудителя в различных органах и тканях.

Результаты посевов учитывают на следующий день после инкубации в термостате. Данные вскрытия трупа протоколи-

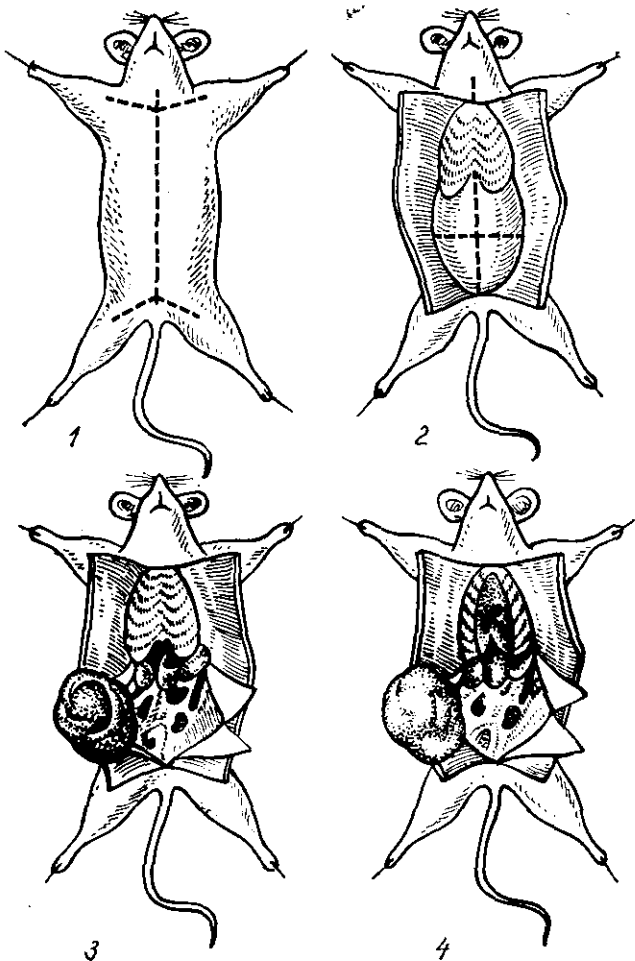
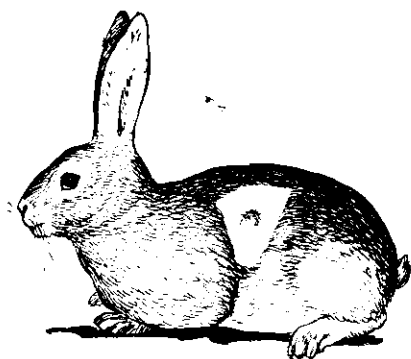


Рис. 52. Вскрытие мыши.

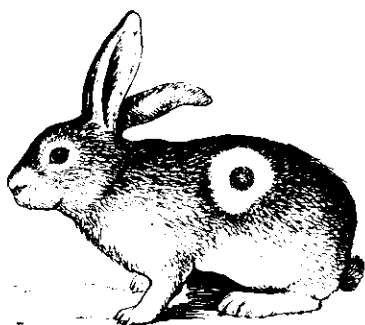
1 — дезинфекция, разрезы кожи; 2 — отслаивание кожи от подкожной клетчатки и мускулатуры; 3 — вскрытие брюшной полости; 4 — вскрытие грудной полости.

руются. Труп животного после вскрытия подлежит уничтожению.

**Определение ферментов патогенных микробов.** Патогенные свойства микробов можно определить по обнаружению вырабатываемых микробами экзоферментов — факторов пато-



а



б

Рис. 53. Дермонекротическая проба.  
а — отрицательная реакция; б — положительная.

культуру и инкубируют 15 мин при  $37^{\circ}\text{C}$ . Затем добавляют 2—3 капли крепкой уксусной кислоты. В пробирках, где выделяется гиалуронидаза, не происходит образования плотного комочка слизи.

Выявление гемолитической активности бактерий определяют путем посева испытуемой культуры в чашку Петри с кровяным агаром. Посев производится таким образом, чтобы получить рост изолированных колоний. Чашки инкубируют в термостате при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение суток. В положительном случае вокруг колоний образуются зоны гемолиза.

Дермонекротическая проба производится путем внутрикожного введения кролику 0,2 мл бульонной испытуемой культуры при помощи туберкулинового шприца с тонкой иглой (рис. 53). Через 2—3 сут на месте введения образуются очаги некроза.

генности: плазмокоагулазы, гиалуронидазы и др. Для выявления плазмокоагулазы испытуемую культуру засевают в 0,2 мл стерильной цитратной кроличьей или человеческой плазмы и инкубируют при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 2—5 ч. В случае выработки плазмокоагулазы происходит свертывание плазмы, в контроле плазма остается жидкой.

Определение гиалуронидазы основано на способности гидролизовать гиалуроновую кислоту, после чего последняя теряет способность давать с уксусной кислотой сгусток муцина. В пробирки с субстратом, содержащим гиалуроновую кислоту, засевают суточную испытуемую

**Определение силы токсина.** Силу токсина или самого возбудителя выражают величиной летальных доз, т. е. наименьшими дозами возбудителя или токсина, вызывающими гибель 95% (*dosis letalis minima* —  $D_{lm}$ ), 100% (*dosis certae letalis* —  $D_{cl}$ ) или 50% ( $LD_{50}$ ) экспериментальных животных. Принято считать наиболее точным определение 50% летальной ( $LD_{50}$ ) или 50% инфицирующей ( $ID_{50}$ ) доз. Все условия определения вирулентности ( $LD_{50}$ ) в лабораторной практике строго стандартизируют: вид, пол, вес животных, условия содержания, полноценность питания и др.

Ряд десятикратных разведений токсина (или культуры бактерий) вводят нескольким группам животных. Через определенный срок отмечают количество погибших животных в каждой группе (табл. 12) и производят расчет  $LD_{50}$  по формуле Кербера:

$$\lg LD_{50} = \lg D_N - S(\Sigma L_1 - 0,5),$$

где  $S$  — логарифм отношения каждой последующей дозы к предыдущей;  $L_1$  — отношение числа животных, погибших от данной дозы, к общему числу животных в группе;  $\Sigma L_1$  — сумма значений  $L_1$ , найденных для всех испытанных доз;  $N$  — общее число испытанных доз (разведений);  $D_N$  — максимальная из испытанных доз.

Таблица 12

Определение силы токсина в опыте на животных (пример)

Доза токсина, мл	$10^{-2}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$
Погибло (из 6 животных на дозу)	6	6	6	6	4	2
	1,00	1,00	1,00	1,00	0,67	0,33

Расчет:  $\Sigma L_1 = 4,0$ ;  $D_N = 10^{-8}$ ;  $\lg D_N = -8$ ; кратность разведения = 10, отсюда  $S = \lg 10 = 1$ .

По формуле:  $\lg LD_{50} = -8 - 1,0 \times (4,0 - 0,5) = -6,5$

$$LD_{50} = \text{anti } \lg(-6,5) = 3 \times 10^{-7}.$$

При проведении цикла иммунизации кролика убитой вакциной для получения иммунной сыворотки взвесь убитых бактерий (1 млрд. микробных тел в 1 мл) вводят в краевую вену уха кролика 3 раза с интервалами в 6 дней. Через

7 дней после последнего введения антигена у кролика берут кровь, из которой готовят сыворотку и титруют для выявления в ней антител.

### Контрольные вопросы

1. Что такое инфекция и инфекционное заболевание?
2. Дайте определение понятиям: патогенность и вирулентность микробов.
3. Методы определения вирулентности микробов. Каким образом можно изменить вирулентность?
4. Инвазивность и агрессивность микробов. Какими факторами обеспечиваются эти признаки? Перечислите факторы (признаки, тесты) патогенности микробов ферментативной природы.
5. Какие виды микробов продуцируют экзотоксины? Их химическая природа, основные свойства и определение активности. Получение анатоксинов.
6. Какие виды микробов образуют эндотоксины? Их химическая природа, основные свойства.
7. Дайте определение смешанной, вторичной инфекции, суперинфекции, реинфекции, рецидива. Приведите примеры.
8. Дайте определение латентной инфекции, бактерионосительства, аутоинфекции. Приведите примеры.
9. Что такое бактериемия, септицемия, сепсис, септикопиемия, токсемия? Как можно отличить бактериемию от септицемии при бактериологическом исследовании трупа?
10. Методы, способы и цели экспериментального заражения животных.

### ИММУНИТЕТ

Иммунитет — это совокупность процессов и механизмов, обеспечивающих охрану постоянства внутренней среды организма от всех генетически чужеродных элементов экзогенного или эндогенного происхождения: микроорганизмов, белков, чужеродных клеток и тканей, аутоантигенов и других в течение жизни индивидуума. Иммунологическую функцию выполняет специализированная система клеток, тканей и органов — «иммунная система организма». Функцией иммунной системы является распознавание генетически чужеродных субстанций (антигенов) и специфическое реагирование на них, т. е. обеспечение «иммунного ответа» («иммунологической реактивности»). Этим определяется специфический приобретенный иммунитет.

Сопrotивляемость организма инфекциям, его защита от микроорганизмов зависят не только от способности развивать иммунный ответ, но и от физиологических неспецифических факторов иммунитета, к которым относятся непроницаемость кожных и слизистых покровов, бактерицидность секретов

различных желез, кислотность желудочного сока, присутствие в крови и других жидкостях организма таких белковых и ферментных систем, как лизоцим, комплемент, пропердин, количество и активность фагоцитирующих клеток в крови и тканях. Фагоцитоз — это комплекс процессов, которые позволяют клеткам захватывать и переваривать (разрушать) чужеродные частицы, в том числе микроорганизмы. Фагоцитарной способностью обладают микрофаги-гранулоциты крови и клетки мононуклеарной фагоцитарной системы: моноциты крови и тканевые макрофаги.

Фагоцитоз в иммунном организме усиливается специфическими антителами — опсонинами, которые сенсibilизируют микробов, подготавливая их к фагоцитозу. Усиление фагоцитоза возбудителя в присутствии иммунной сыворотки (или сыворотки больного) настолько закономерно, что легло в основу диагностической опsono-фагоцитарной реакции.

## Тема 15. ФАГОЦИТОЗ

### Программа занятия

1. Изучение стадий фагоцитоза и фагоцитирующих клеток в опыте фагоцитоза *in vivo* (в организме подопытного животного).
2. Определение фагоцитарных показателей и опсонического индекса в опыте *in vitro* (в исследуемой крови человека).

### Демонстрация

Препарат, приготовленный из тканевой культуры макрофагов с фагоцитированными бактериями.

### Задание студентам для выполнения лабораторной работы

1. Учесть результаты посева из трупа белой мыши, сделанного на прошлом занятии, и дать соответствующее заключение.
2. Заразить белую мышь внутрибрюшинно взвесью стафилококка для изучения явления фагоцитоза *in vivo*.  
Проанализировать защитную роль фагоцитоза *in vivo*.
3. Определить опсонический индекс на основании подсчета фагоцитарных показателей в готовых мазках, приготовленных ранее при постановке опsono-фагоцитарной реакции *in vitro*.
4. Провести иммунизацию кролика убитой вакциной (третье введение антигена).

### Методические указания

Постановка опыта фагоцитоза на белых мышках. За 2—4 ч до постановки опыта белым мышам вводят внутрибрюшинно до 2—3 мл стерильного мясо-пептонного бульона. Этим дости-

гается скопление в брюшной полости микро- и макрофагов, которое является результатом асептического воспаления и положительного хемотаксиса фагоцитов к пептону. Затем мыши вводят внутривнутрибрюшинно 1 мл 2-миллиардной взвеси культуры белого стафилококка. Через 10 мин и через 30 мин после заражения брюшную стенку мыши прокалывают концом тонко оттянутого капилляра пастеровской пипетки и быстро набирают в пипетку несколько капель экссудата. Из него готовят тонкие мазки на предметных стеклах, высушивают на воздухе, фиксируют в жидком фиксаторе и окрашивают раствором метилевого синего в течение 3—4 мин.

При микроскопии мазков отмечают наличие микрофагов (полиморфноядерных клеток) и макрофагов (мононуклеаров) с поглощенными стафилококками, окрашенными в интенсивно синий цвет на фоне светло-голубой цитоплазмы фагоцитов (рис. 54). Отмечают в препарате отдельные стадии фагоцитарного процесса (прилипание, поглощение, частичное переваривание).

**Опсонно-фагоцитарная реакция.** Принцип метода основывается на сравнении интенсивности фагоцитоза микробов лейкоцитами в присутствии нормальной и иммунной сывороток. В качестве тест-микроба при постановке опсонно-фагоцитарной реакции используют культуру возбудителя соответствующей инфекции.

В небольших пробирках готовят две смеси, каждая из которых содержит по три ингредиента: микроорганизмы, лейкоциты и сыворотку (испытуемую или контрольную). Смеси инкубируют в термостате при 37°C 15—30 мин, затем делают мазки, фиксируют в жидком фиксаторе и окрашивают по Романовскому — Гимзе.

При микроскопии мазок передвигают в одном направлении, подсчитывая число фагоцитированных бактерий не менее чем в 50 лейкоцитах и определяют среднее количество фагоцитированных бактерий на один лейкоцит — фагоцитарный показатель. После подсчета фагоцитарных показателей для испытуемой сыворотки больного и для нормальной (контрольной) сыворотки здорового определяют их отношение, которое характеризует величину опсонического индекса.

#### Контрольные вопросы

1. Дайте определение понятия «иммунитет». Какие известны виды иммунитета?
2. Перечислите факторы и механизмы неспецифического иммунитета.



3. Перечислите защитные механизмы, с которыми встречается патогенный микроб на пути своего проникновения в организм.

4. Какие существуют гуморальные факторы неспецифического иммунитета? Что такое лизоцим, каков механизм его антибактериального действия?

5. Дайте определение понятия «фагоцитоз». Какие клетки обладают фагоцитарной способностью? Стадии фагоцитарного процесса. Что такое незавершенный фагоцитоз?

6. Как определяются фагоцитарные показатели? Что такое опсонины? Реакция опсонизации. Определение опсонического индекса.

7. Основные механизмы неспецифического противовирусного иммунитета.

## Тема 16. ПРИОБРЕТЕННЫЙ ИММУНИТЕТ.

### РЕАКЦИИ ИММУНИТЕТА (СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ)

Приобретенный, специфический иммунитет — это **резистентность организма к определенным инфекционным агентам или их токсинам, приобретенная индивидуумом в течение жизни. Приобретенный иммунитет формируется в результате иммунологической перестройки организма в ответ на попадание или введение антигена при инфекционном заболевании, искусственной иммунизации вакцинами или апатоксинами или при введении иммунных сывороток.**

**Антигены** — это вещества, несущие признаки генетически чужеродной информации, способные вызывать в организме специфические иммунологические реакции: выработку специфических антител, формирование клеточной гиперчувствительности, иммунологической памяти или иммунологической толерантности.

Другим основным свойством антигенов является их способность специфически реагировать с образовавшимися антителами *in vivo* и *in vitro*.

**Антитела** — это специфические иммуноглобулины, синтезируемые иммунокомпетентными клетками лимфоидной ткани в ответ на введение в организм антигена и обладающие способностью специфически взаимодействовать с данным антигеном. Антитела накапливаются в сыворотке крови в результате перенесенной инфекции или искусственной иммунизации. Такая сыворотка называется **иммунной сывороткой**. Присутствие антител в сыворотке крови легко может быть выявлено при помощи иммунологических (серологических) реакций *in vitro*, основанных на способности антител специфически взаимодействовать с антигеном, индуцировавшим их образование. С этим связано широкое диагностическое применение серологических реакций.

## Программа 1-го занятия

1. Способы приготовления убитых вакцин.
2. Получение агглютинирующих и лечебно-профилактических иммунных сывороток.
3. Методы постановки и оценки кожно-аллергических проб.

**Вакцинами** называют препараты, которые служат для создания искусственного активного иммунитета, и делят на живые, убитые и химические. Ж и в ы е вакцины — это микроорганизмы с ослабленной вирулентностью, например, вакцина БЦЖ, бруцеллезная, туляремиальная, чумная, полиомиелитная, оспенная, антирабическая и др. У б и т ы е вакцины содержат микроорганизмы, инактивированные температурой (гретая вакцина), химическими веществами (формалином, спиртом, фенолом) или другими способами. Примерами убитых вакцин являются вакцины против кишечных инфекций. Убитую аутовакцину приготавливают из штамма возбудителя, выделенного непосредственно от больного. Х и м и ч е с к и е вакцины содержат в своем составе антигены, экстрагированные из микробных клеток трихлоруксусной кислотой, кислотным гидролизом и другими методами. К химическим вакцинам относится брюшнотифозная вакцина, которая состоит из полных антигенов бактерий.

**Анатоксины** получают, добавляя к нативному экзотоксину 0,3—0,5% формалина и выдерживая смесь в термостате в течение 3—4 нед при 38—40°C. Анатоксины применяют для создания активного антитоксического иммунитета.

В зависимости от числа видов микроорганизмов (или антигенов), входящих в состав вакцины, различают моно-, ди-, три-, и тетравакцины. Вакцины, содержащие компоненты против нескольких инфекций, называются поливакцинами, или комбинированными (ассоциированными) вакцинами.

Многие вакцинные препараты готовят в адсорбированном виде, используя в качестве адсорбента гидроокись алюминия.

**Иммунные сыворотки** подразделяют на лечебно-профилактические и диагностические. К последним относятся агглютинирующие, преципитирующие и гемолитические. Для получения лечебно-профилактических сывороток гипериммунизируют лошадей. Сывороточные препараты получают также из крови иммунизированных или переболевших людей. Диагностические сыворотки получают путем иммунизации кроликов.

Лечебно-профилактические сыворотки в настоящее время подвергаются очистке от балластных белков и концентрации, или из них выделяются активные фракции, главным образом иммуноглобулины. Сила антитоксических сывороток выражается содержанием международных антитоксических единиц (МЕ) в 1 мл. 1 МЕ называют наименьшее количество сыворотки, которое нейтрализует определенное количество ДЛМ токсина для животных данного вида и данной массы. Титрование антитоксических сывороток проводят на животных (по Эрлиху и Ремеру) или *in vitro* в реакции флоккуляции (по Рамону).

Для повышения эффективности иммунизации вакцины и анатоксины вводятся с адъювантами. Адъюванты — группа веществ различного происхождения и разной химической природы, которые при введении в организм совместно с антигеном оказывают неспецифическое стимулирующее действие на иммуногенез. К адъювантам относятся гидрат окиси алюминия, алюминицево-калиевые квасцы, кальция хлорид, минеральные и животные масла, которые способны создавать «депо» антигена в организме.

**Аллергены** — это вещества, способные вызывать и выявлять состояние аллергии, т. е. повышенной чувствительности (сенсibilизации), в основе которой лежат реакции иммунитета. Повышенная чувствительность (гиперчувствительность) к определенному аллергену приобретается в результате первичного контакта с ним. Выявляется состояние сенсibilизации при повторном контакте с тем же аллергеном, что используется при постановке кожных аллергических проб с диагностической целью. Состояние инфекционной аллергии к тому или иному возбудителю может быть выявлено путем введения специфического микробного аллергена подкожно, внутрикожно или на слизистую оболочку глаза (у животных). При наличии специфической сенсibilизации возникает местная реакция (реакция гиперчувствительности замедленного типа), которая характеризуется развитием воспаления на месте введения антигена (гиперемией, отеком, инфильтрацией кожи). Бактериальные аллергены представляют собой взвесь микробных клеток или извлеченных из них различных активных фракций.

### Демонстрация

Различные виды вакцин, анатоксинов, иммунных сывороток, аллергенов.

**Задание студентам  
для выполнения лабораторной работы**

1. Приготовить стафилококковую аутовакцину.
2. Получить иммунную сыворотку крови кролика после проведенного цикла иммунизации.
3. Отметить результаты кожно-аллергической пробы, поставленной на предварительно сенсибилизированной морской свинке.

**Методические указания**

**Этапы приготовления стафилококковой аутовакцины.**

1. Посев стафилококка в пробирку со скошенным мясо-пептонным агаром.
2. Проверка чистоты выросшей культуры (микроскопия мазка).
3. Получение маточной взвеси микробных клеток путем смыва культуры 5 мл изотонического раствора хлорида натрия.
4. Прогревание микробной взвеси на водяной бане при 70—80°C в течение часа.
5. Контроль на стерильность (высев из прогретой взвеси на питательные среды).
6. Стандартизация вакцины оптическим методом. 1 мл прогретой микробной взвеси разводят мерным количеством стерильного изотонического раствора хлорида натрия, сравнивая ее мутность с мутностью оптического стандарта (1 млрд.). Остальной объем микробной взвеси разводят, добавляя соответствующее количество изотонического раствора хлорида натрия.

**Получение агглютинирующей сыворотки.** Из уха или сердца кролика на 7-й день после окончания иммунизации берут кровь, помещают в термостат при 37°C на 10—15 мин. После свертывания крови сгусток отслаивают от стенок пробирки стеклянной палочкой и выдерживают при 4°C в течение часа для лучшей ретракции сгустка и более полного отделения сыворотки. Затем сыворотку осторожно отсасывают пипеткой.

**Постановка и оценка кожно-аллергической пробы.** Для выявления специфической сенсибилизации при туберкулезе и других инфекционных заболеваниях ставят кожные аллергические пробы. При постановке пробы Манту с помощью туберкулинового шприца и специальной тонкой иглы внутрикожно вводят раствор туберкулина определенной концентрации. Реакцию учитывают через 24 и 48 ч, определяя степень ее выраженности: гиперемия и инфильтрат вокруг места

введения размером до 5 мм оценивают знаком «+», до 1 см — знаком «++»; больше 1 см, а также при наличии везикулы и лимфангоита — знаком «+++» (рис. 55).

### Программа 2-го занятия

1. Изучение реакции агглютинации: механизм, роль отдельных ингредиентов, диагностическое применение для определения титра специфических антител в сыворотке крови больных и идентификации вида микроорганизма.

2. Реакция пассивной (непрямой) гемагглютинация (РПГА) и реакция торможения пассивной гемагглютинации (РТПГА).

3. Метод выявления неполных антител (проба Кумбса).

**Реакция агглютинации** основана на взаимодействии антител с антигенными детерминантами, расположенными на поверхности бактерий и других корпускулярных частиц (первая, специфическая, невидимая фаза реакции), что приводит к их склеиванию и оседанию на дно пробирки в виде хлопьев, видимых невооруженным глазом. Эта вторая видимая фаза реакции протекает лишь в присутствии электролита в среде.

В лабораторной диагностике инфекционных заболеваний очень часто применяют реакцию агглютинации как для идентификации видов и типов бактерий по известной агглютинирующей сыворотке, так и для определения присутствия антител в сыворотке больного по известным антигенам (диагностикумам).

Количество агглютинирующих антител в иммунной сыворотке оценивается по титру — наибольшему разведению сыворотки, которое еще дает реакцию агглютинации со взвесью микробных клеток.

Кроме специфической агглютинации, может иметь место спонтанная или кислотная агглютинация, которые протекают в отсутствие иммунной сыворотки. Спонтанную агглютинацию дают R-формы бактерий, не образующие гомогенной взвеси в изотоническом растворе хлорида натрия и осаждающиеся в виде клеточных агрегатов. Кислотная агглютинация наступает при кислой реакции среды в результате снятия одноименного заряда с поверхности микробных клеток, что приводит к их склеиванию.

Реакция агглютинации внешне проявляется по-разному в зависимости от величины клеток (бактерий или риккетсий) и от вида участвующих в реакции антигенов (O или H).

При работе с растворимыми, мелкодисперсными антигенами применяют непрямую (пассивную) агглютинацию. Антиген предварительно адсорбируют на инертных частицах или

клетках, например на эритроцитах. Такие нагруженные антигеном эритроциты склеиваются под действием иммунной сыворотки, содержащей антитела к данному антигену (РПГА). Она отличается более высокой чувствительностью и позволяет выявлять сравнительно небольшие концентрации антител в исследуемых сыворотках.

При помощи реакций прямой и непрямой агглютинации определяют полные (бивалентные) антитела. Неполные (моновалентные, блокирующие) антитела не выявляются этими методами, так как, соединяясь с антигеном, блокируют его, но не могут вызвать агрегации частиц в крупные конгломераты. Для выявления неполных, например, антирезусных антител в исследуемой сыворотке используют специальную реакцию-пробу с антиглобулиновой сывороткой, которая получила название реакции Кумбса. Реакция проходит в два этапа: 1) фиксация на эритроцитах (резус+) неполных антиэритроцитарных антител, содержащихся в сыворотке крови, 2) обнаружение агглютинации эритроцитов при добавлении антиглобулиновой сыворотки, которая взаимодействует с фиксированными на эритроцитах неполными антителами.

#### Задание студентам для выполнения лабораторной работы

1. Поставить макроскопическую (развернутую) реакцию агглютинации для определения в сыворотке, полученной от кролика на предыдущем занятии, титра специфических антител.

2. Поставить ориентировочную реакцию агглютинации на стекле с целью определения вида микроба. Объяснить отрицательные результаты в контрольных пробах, исходя из необходимого сочетания ингредиентов, участвующих в реакции агглютинации.

3. Отметить результаты РПГА и РТПГА. Определить титр специфических антител в сыворотке крови по результатам РПГА. Отметить присутствие специфического антигена в исследуемом материале от больного по результатам РТПГА. Объяснить необходимость контролей в РПГА и РТПГА.

4. Отметить результаты реакции Кумбса. Определить титр неполных антирезусных антител в сыворотке беременной женщины. Объяснить, какие контроли должны сопровождать реакцию Кумбса.

#### Методические указания

**Титрование агглютинирующей сыворотки.** Техника постановки реакции агглютинации для определения титра антител указана в табл. 13 и на рис. 56.

Исходное основное разведение исследуемой сыворотки: 1 : 50 приготавливают, смешивая 0,1 мл сыворотки с 4,9 мл изотонического раствора хлорида натрия. 1 мл этого разведе-

## Титрование агглютинирующей сыворотки

Ингредиенты	Пробирки						
	1-я	2-я	3-я	4-я	5-я	конт- роль анти- гена	конт- роль сыво- ротки
Изотонический рас- твор хлорида нат- рия, мл	1	1	1	1	1	1	—
Исследуемая сыво- ротка в разведении 1:50, мл	1→	1→	1→	1→	1↓	—	1
Полученное разведе- ние сыворотки	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600		
Взвесь бактерий, кап- ли	2	2	2	2	2	2	—
Инкубация при 37° С в течение 2 ч с последующим выдерживанием при комнатной температуре до следующего дня							
Результаты							

Примечание. Стрелкой обозначен перенос смеси разведения сыворотки с изотоническим раствором хлорида натрия из пробирки в пробирку.

ния вносят только в 1-ю и контрольную (контроль сыворотки) пробирки. Из 1-й пробирки после перемешивания 1 мл переносят во 2-ю и так далее до 5-й пробирки, из которой отсасывают избыток сыворотки.

После добавления взвеси бактерий все пробирки встряхивают и выдерживают при 37°С 2 ч, затем оставляют при комнатной температуре до следующего дня. Учет результатов реакции агглютинации производят, оценивая последовательно каждую пробирку, начиная с контрольных при осторожном встряхивании.

Интенсивность реакции агглютинации отмечают следующими знаками: + + + + — полная агглютинация — хорошо выраженный осадок и полное просветление жидкости; + + + — неполная агглютинация с хорошо выраженным осадком и слабой опалесценцией жидкости; + + — частичная агглютинация с небольшим осадком, надосадочная жидкость мутная; + — очень небольшой осадок, жидкость

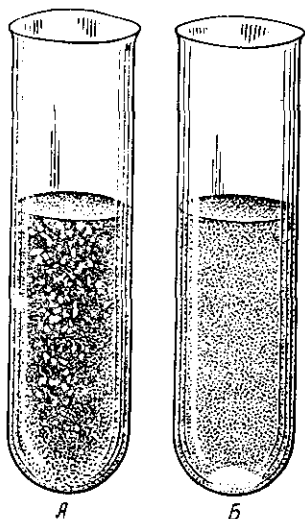


Рис. 56. Реакция агглютинации.

А — менее выраженная агглютинация; Б — выраженная агглютинация.

непрозрачна; — отсутствие агглютинации без осадка, жидкость равномерно мутная.

Реакцию учитывают как положительную при наличии отчетливой агглютинации (не менее ++ ) в опытной пробирке и отсутствии агглютинации в обеих контрольных пробирках. За титр сыворотки принимают последнее разведение сыворотки, в котором интенсивность агглютинации оценивается не менее чем ++.

Реакцию агглютинации на стекле ставят с диагностическими агглютинирующими сыворотками в разведениях 1 : 10, 1 : 20. На хорошо обезжиренное стекло наносят отдельно каплю изотонического раствора хлорида натрия для контроля. Затем в каждой капле размешивают небольшое количество культуры до получения гомогенной взвеси. Через 2—4 мин в капле с сывороткой появляются

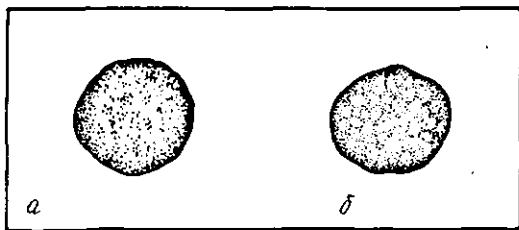


Рис. 57. Реакция агглютинация на стекле.

а — наличие агглютинации; б — отсутствие агглютинации.

хлопья, контрольная капля остается равномерно мутной (рис. 57).

**Реакция пассивной гемагглютинации.** Реакцию ставят для выявления специфических антител в сыворотке больного (рис. 58). Человеческие эритроциты 0-группы, предваритель-



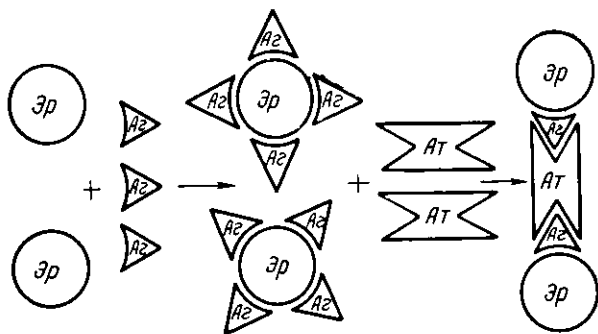


Рис. 58. Реакция пассивной гемагглютинации (схема).  
 Эр — эритроциты; Аг — антиген; Ат — антитело.

но обработанные раствором тапина в разведении 1 : 20 000 и нагруженные (сенсibilизированные) антигеном, вносят в лунки плексигласовой панели, в которых приготовлены разведения сыворотки больного. Результаты учитывают через 2 ч инкубации при 37°C. При отрицательном результате РПГА эритроциты оседают в виде компактной точки или толстого кольца, при положительном — оседают в виде ровного слоя клеток со складчатым или зазубренным краем (в виде зонтика). Контроли ингредиентов реакции: сенсibilизированные эритроциты с нормальной сывороткой или буферным раствором, несенсibilизированные эритроциты с исследуемой сывороткой. Кроме того, проводится контрольное титрование известной стандартной сыворотки к данному антигену.

Реакция торможения пассивной гемагглютинации ставится для выявления антигена в исследуемом материале на основании реакции с заведомо известной иммунной сывороткой. Постановка РТПГА производится в два этапа: 1) обработка заведомо известной иммунной сыворотки, взятой в рабочем разведении, исследуемым материалом с целью ее специфического истощения; 2) добавление эритроцитов, нагруженных гомологичным антигеном.

Отсутствие (торможение) гемагглютинации свидетельствует о наличии антигена в исследуемом материале (положительная РТПГА).

Реакцию Кумбса ставят для выявления неполных антител, в частности, к резус-антигену эритроцитов в сыворотке беременной женщины (также антитела появляются при беремен-

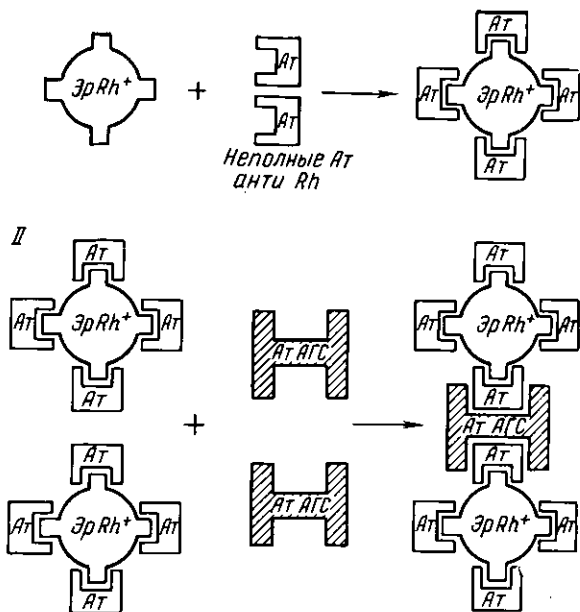


Рис. 59. Реакция Кумбса (схема).

ности резус-отрицательной матери резус-положительным плодом). Реакция (рис. 59) ставится в два этапа: I — к двукратным разведениям испытуемой сыворотки добавляют эритроциты, содержащие резус-антиген, и выдерживают при 37°C в течение 1—1½ ч. II — к тщательно отмытым после первого этапа эритроцитам с фиксированными на них антителами добавляют кроличью античеловеческую антиглобулиновую сыворотку (в заранее оттитрованном рабочем разведении). После инкубации в течение 30 мин при 37°C результаты реакции оценивают по наличию гемагглютинации (положительная реакция). Контроли ингредиентов реакции: 1) антиглобулиновая сыворотка + заведомо сенсibilизированные эритроциты; 2) нормальная сыворотка + эритроциты + антиглобулиновая сыворотка; 3) исследуемая сыворотка + эритроциты, не содержащие резус-антигена + антиглобулиновая сыворотка.

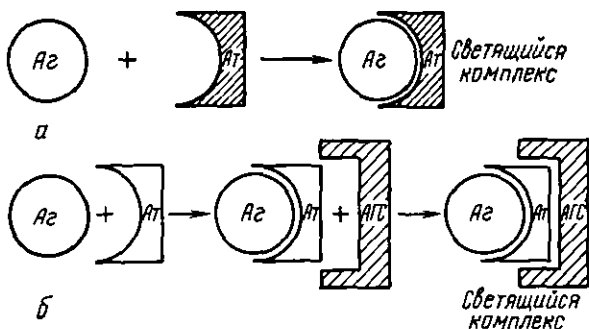


Рис. 60. Иммунофлюоресцентный метод Кунса (схема).  
 а — прямой метод; б — непрямой метод; Ag — антиген; At — антитело, AGS — антиглобулиновая сыворотка.

### Программа 3-го занятия

1. Реакция преципитации: механизм, варианты постановки (кольце-преципитация, преципитация в геле, иммуноэлектрофорез) и диагностическое применение.
2. Реакция нейтрализации токсина антитоксином: механизм, варианты постановки реакции *in vivo* и *in vitro* (реакция флоккуляции) и диагностическое применение.
3. Иммунофлюоресцентный метод Кунса.

Реакция преципитации характеризуется осаждением специфических комплексов мелкодисперсных антигенов специфическими антителами в присутствии электролита. Выпадение нерастворимого комплекса антиген — антитело в виде осадка наблюдается лишь при эквивалентных соотношениях ингредиентов. Образовавшийся комплекс может раствориться в избытке антигена или антител. Антиген должен иметь характер прозрачного коллоидного раствора.

В лабораторной диагностике инфекционных заболеваний реакция преципитации служит главным образом для выявления или идентификации антигена-преципитиногена — по известной преципитирующей сыворотке, содержащей антитела-преципитины.

**Иммунофлюоресцентный метод.** Обнаружение бактериальных и вирусных антигенов в инфицированных материалах, тканях животных и культурах ткани при помощи флюоресцирующих антител (сывороток) получило широкое применение в диагностической практике. Иммунофлюоресцентный метод является методом экспресс-диагностики, не уступая другим



Рис. 61. Иммунофлюоресцентный метод Кунса. Выявление вируса кори в клетках инфицированной им тканевой культуры.

серологическим реакциям по чувствительности и специфичности (рис. 60).

Приготовление флюоресцирующих сывороток основано на способности некоторых флюорохромов (например, изотиоцианата флюоресцеина) вступать в химическую связь с сывороточными белками без нарушения их иммунологической специфичности.

При прямом иммунофлюоресцентном методе Кунса специфические флюоресцирующие антитела, связавшиеся с микробными антигенами, образуют комплексы, которые светятся при люминесцентной микроскопии препаратов (рис. 61). Недостаток прямого метода Кунса состоит в необходимости приготовления широкого набора флюоресцирующих специфических сывороток против каждого изучаемого антигена.

Непрямой метод предусматривает использование одной флюоресцирующей сыворотки — антиглобулиновой, содержащей антитела против кроличьих глобулинов. Как правило, специфические иммунные сыворотки, используемые для идентификации возбудителей, являются кроличьими. Поэтому флюоресцирующая антиглобулиновая сыворотка реагирует с

любыми специфическими антителами (кроличьими глобулинами), которые при этом играют роль антигенов. Однако эти же кроличьи глобулины — специфические антитела — связываются только с гомологичными антигенами, на образовавшихся комплексах фиксируются флюоресцирующие антиглобулиновые антитела, делая их светящимися при люминесцентной микроскопии.

### Демонстрация

1. Иммунофлюоресцентный метод Кунса.
2. Иммуноэлектрофорезграммы.
3. Препараты: токсины, анатоксины, антитоксические сыворотки,

### Задание студентам для выполнения лабораторной работы

1. Отметить результаты титрования сыворотки, проведенного на предыдущем занятии, определить титр антител и объяснить отрицательные результаты в контрольных пробах, исходя из необходимого сочетания ингредиентов, участвующих в реакции агглютинации.

2. Поставить реакцию кольцепреципитации для определения природы антигена (гаптена) в исследуемом материале. Объяснить отрицательные результаты в контрольных пробирках.

3. Отметить результаты реакции преципитации в геле, поставленной с целью определения токсигенности дифтерийной палочки с помощью антитоксической сыворотки.

4. Отметить результаты реакции нейтрализации токсина антитоксином (реакции флоккуляции), поставленной для определения силы испытуемой антитоксической сыворотки по известному токсину. Рассчитать силу антитоксической сыворотки, исходя из результатов реакции.

### Методические указания

Реакция преципитации проводится с антигеном, извлеченным из исследуемых бактерий по методу Буавена.

Антиген (по Буавену) получают путем обработки отмытых микробных клеток трихлоруксусной кислотой с последующим осаждением антигена из жидкой фракции спиртом. В нем содержатся липополисахариды и протеиды бактериальной клеточной стенки. Отцентрифужированный и профильтрованный прозрачный антиген перед постановкой реакции разводят изотоническим раствором хлорида натрия не менее чем 1 : 1000.

Преципитирующие сыворотки изготавливаются производственными институтами путем гипериммунизации животных соответствующими антигенами.

Реакцию кольцепреципитации ставят в узких пробирках (диаметр 0,5 см), в которые разливают сыворотки (по 0,1 мл).

## Реакция преципитации

Ингредиенты, мл	Пробирки			
	1-я	2-я	3-я	4-я
Сыворотка против <i>S. typhi</i>	0,1	—	—	—
Сыворотка против <i>Sh. dysenteriae</i>	—	0,1	—	—
Нормальная сыворотка	—	—	0,1	—
Изотонический раствор хлорида натрия	—	—	—	0,1
Исследуемый антиген	0,1	0,1	0,1	0,1
Результаты				

Затем пастеровской пипеткой медленно по стенке, держа пробирку в наклонном положении, наслаивают по каплям раствор антигена (0,1 мл). Пробирки осторожно ставят в вертикальное положение (табл. 14).

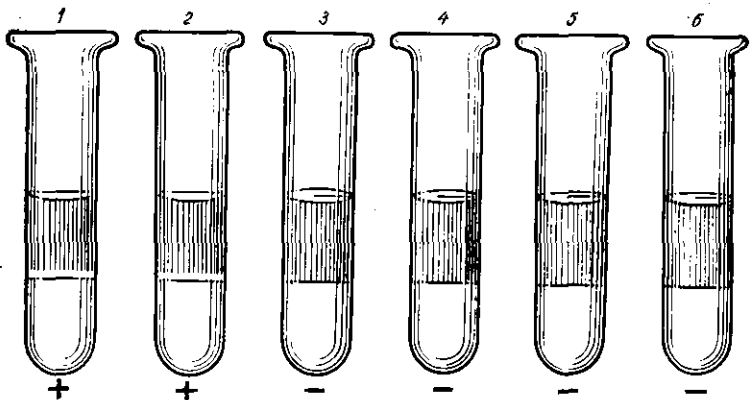


Рис. 62. Реакция преципитации.

1 — преципитирующая сыворотка + исследуемый антиген; 2 — преципитирующая сыворотка + известный специфический антиген; 3 — преципитирующая сыворотка + контрольный экстракт без антигена; 4 — преципитирующая сыворотка + изотонический раствор хлорида натрия; 5 — нормальная сыворотка + исследуемый антиген; 6 — нормальная сыворотка + контрольный экстракт без антигена.

Учет реакции производят через 1—2 мин. В случае положительной реакции в первой пробирке на границе между сывороткой и исследуемым антигеном появляется преципитат в виде белого кольца. В остальных (контрольных) пробирках преципитата не образуется (рис. 62).

**Реакция преципитации в геле (агаре).** Чашки заливают просветленным агаром, в котором вырезают несколько лунок на равном расстоянии друг от друга. В центральную лунку вносят сыворотку, содержащую антитела, в остальные — различные испытуемые антигены или один и тот же антиген в различных разведениях. Реагенты диффундируют в агар, в зонах оптимальных соотношений на месте встречи антигена и антител образуются мутные полосы (дуги) преципитации (рис. 63).

В случае постановки реакции преципитации с различными разведениями антигена можно установить титр преципитирующей сыворотки — максимальное разведение антигена, которое дает преципитацию с данной сывороткой.

Одна из разновидностей реакции преципитации в геле позволяет определять токсигенность дифтерийной палочки с помощью антитоксической сыворотки. Для этого в чашку Петри на мясо-пептонный агар (к которому добавляется лошадиная сыворотка, мальтоза, цистеин, необходимые для роста дифтерийной палочки) помещают полоску фильтровальной бумаги, пропитанную антитоксической противодифтерийной сывороткой, подсушивают и затем засевают испытуемыми культурами в виде штрихов, перпендикулярных к полоске бумаги, на расстоянии 0,6—0,8 см от ее края. В качестве контроля используют заведомо токсигенную культуру. Чашки инкубируют при 37°C в течение суток. При наличии токсигенной культуры в месте взаимодействия токсина с антитоксином образуются «усы», т. е. линии преципитации (рис. 64).

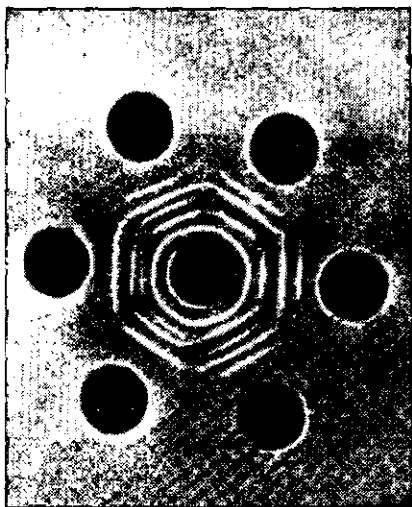


Рис. 63. Реакция преципитации в геле по Оухтерлони.

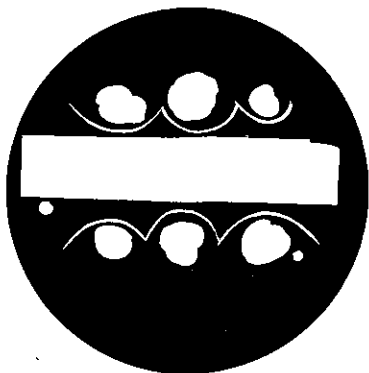


Рис. 64. Определение токсигенности дифтерийных бактерий в реакции преципитации в геле.

дуг, соответствующих индивидуальным системам антиген — антитело (см. рис. 63).

**Техника иммунофлюоресцентного метода.** На предметном стекле приготавливают мазок из испражнений больного колиэнтеритом, фиксируют его на пламени и обрабатывают специфической иммунной сывороткой. Для образования комплекса антиген — антитело препарат помещают во влажной камере в термостат при  $37^{\circ}\text{C}$  на 15 мин, после чего тщательно отмывают изотоническим раствором хлорида натрия от не связавшихся с антигеном антител.

Затем на препарат наносят флюоресцирующую антиглобулиновую сыворотку на 15 мин при  $37^{\circ}\text{C}$ . В результате связывания с фиксированными на антигене специфическими антителами образуются светящиеся комплексы антиген — антитело, которые обнаруживаются при помощи люминесцентного микроскопа МЛ-2 (см. с. 17).

**Реакция флоккуляции.** В результате взаимодействия токсина (или анатоксина) и антитоксической сыворотки наблюдается выпадение хлопьев флоккулята. Наиболее интенсивная и ранняя «инициальная» флоккуляция происходит в пробирке, где антиген и антитело встречаются в эквивалентных соотношениях. Реакция складывается из двух этапов:

1. По стандартной сыворотке устанавливают количество Lf (Limes flocculationis) в 1 мл токсина. Lf токсина определяется его количеством, которое дает «инициальную» флоккуляцию с 1 МЕ сыворотки. Установив силу токсина, приступают к определению силы сыворотки.

**Иммуноэлектрофорез.** Исследование проводится в два этапа: 1) электрофоретическое разделение исследуемого материала в геле; 2) иммунологический анализ. В геле параллельно оси миграции электрофоретических фракций вырезают траншеи, в которые вносят иммунную сыворотку, содержащую антитела к исследуемым антигенам. В случае реакции между антигенами и диффундирующими в гель антителами формируется преципитат в виде дискретных



## Реакция флоккуляции

Ингредиенты, мл	Пробирки						
	1-я	2-я	3-я	4-я	5-я	6-я	7-я
Токсин (содержащий 20 Лf в 1 мл)	2	2	2	2	2	2	—
Исследуемая сыворотка	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	—	0,6
Инкубация при 45° С в течение 30 мин							
Результаты по инициальной флоккуляции							

2. Известной силы токсин и испытуемую антитоксическую сыворотку разливают в пробирки в определенном объеме, как это показано в табл. 15.

Пробирки выдерживают в водяной бане при 45°С в течение 30 мин до выпадения хлопьев в одной из них. Инициальная флоккуляция проявляется в той пробирке, где количество Лf-токсина соответствует количеству международных единиц сыворотки. Например, если флоккуляция произошла в 3-й пробирке, значит в 0,4 мл сыворотки содержится 40 МЕ. Следовательно, в 1 мл сыворотки содержится  $40 : 0,4 = 100$  МЕ.

## Программа 4-го занятия

1. Реакция лизиса, гемолиза.

2. Реакция связывания комплемента (ГСК): механизм, роль отдельных ингредиентов, техника постановки и диагностическое применение.

В основе реакций лизиса, гемолиза, бактериолиза лежит взаимодействие трех компонентов: корпускулярного антигена (эритроцитов, микробных или других клеток), специфических антител иммунной сыворотки (гемолизинов, бактериолизинов), вызывающих сенсibilизацию антигена, и комплемента, который адсорбируется на комплексе антиген — антитело, вследствие чего наступает активация компонентов комплемента, которая приводит к лизису клеток.

Комплекмент — неспецифическая ферментная система, включающая 9 различных протеиновых фракций сыворотки крови. Он содержится в любой свежей сыворотке крови, но в

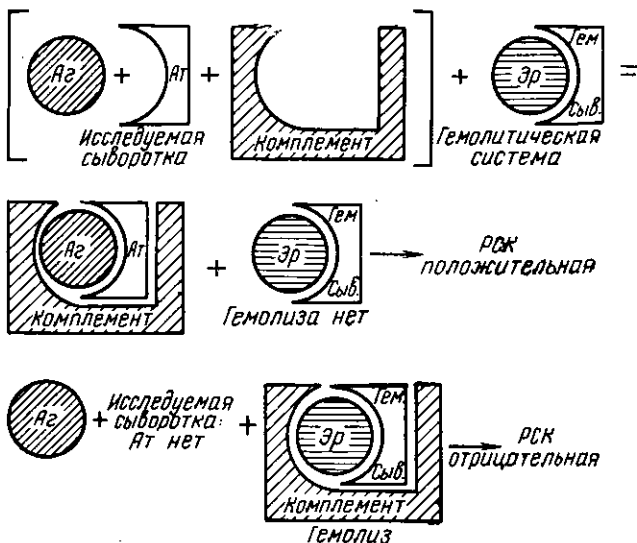


Рис. 65. Реакция связывания комплемента (схема).

*Ag* — антиген; *At* — антитело; *Эр* — эритроцит; Гем. сыв. — гемолитическая сыворотка.

наибольшем количестве его обнаруживают в сыворотке морских свинок, которую и используют для постановки иммунологических реакций. Комплемент термолабилен, полностью инактивируется при прогревании сыворотки в течение 30 мин при 56°C. Комплемент адсорбируется (фиксируется) на комплексе антиген — антитело. В одних случаях это проявляется реакцией лизиса, в других — не сопровождается никакими видимыми проявлениями. Последняя реакция называется реакцией связывания комплемента (РСК). Для установления результатов реакции вводят вспомогательную (индикаторную) гемолитическую систему, которая состоит из взвеси эритроцитов барана в изотоническом растворе хлорида натрия и гемолитической сыворотки. При наличии свободного комплемента происходит гемолиз эритроцитов. Отсутствие гемолиза свидетельствует о положительной РСК (рис. 65).

РСК отличается высокой чувствительностью и специфичностью и применяется для серодиагностики многих инфекционных заболеваний и идентификации бактерий, вирусов и других антигенов. Для постановки РСК необходимо точное определение количественных соотношений всех ингредиентов:

исследуемой сыворотки, антигена, комплемента, гемолитической сыворотки и эритроцитов барана. Поэтому постановке основного опыта предшествуют: титрование гемолитической сыворотки и выбор ее рабочего разведения, титрование комплемента и выбор его рабочей дозы.

### Задание студентам для выполнения лабораторной работы

1. Отметить результаты титрования комплемента и рассчитать рабочую дозу.

2. Отметить результаты титрования гемолитической сыворотки и рассчитать рабочее разведение для приготовления гемолитической системы.

3. Поставить РСК (первую и вторую фазы) для определения присутствия специфических антител в испытуемой сыворотке по известному антигену. Объяснить результаты контрольных проб и необходимость их постановки, исходя из механизма РСК.

### Методические указания

**Приготовление и титрование ингредиентов для РСК.**  
**Комплект.** Для определения титра и рабочей дозы производят титрование комплемента с помощью реакции гемолиза. Для этого свежую сыворотку морской свинки разводят изотоническим раствором хлорида натрия от 1 : 10 до 1 : 40, как показано в табл. 16. К 0,2 мл каждого разведения комплемента добавляют по 0,4 мл гемолитической системы (смесь равных объемов 3% суспензии эритроцитов в изотоническом растворе хлорида натрия и гемолитической сыворотки в разведении, соответствующем ее тройному титру, после 30-минутной инкубации).

Пробирки выдерживают при 37°C и через 30 мин определяют результаты титрования, отмечая то наибольшее разведение комплемента, которое вызывает полный лизис эритроцитов в присутствии гемолитической сыворотки, — титр комплемента. Рабочую дозу комплемента рассчитывают, исходя из титра комплемента, которая выше титра на 25%. Так, например, при титре комплемента 1:20 в качестве рабочей дозы берут его предыдущее разведение 1 : 15.

Антигены изготавливаются производственными институтами из взвесей убитых микробов, лизатов микробов, полных антигенов, гаптенных, экстрактов тканевых липидов.

Взвесь эритроцитов барана получают из дефибрирированной крови барана, отмывая эритроциты изотоническим

## Титрование комплемента

Ингредиенты, мл	Пробирки							
	1-я	2-я	3-я	4-я	5-я	6-я	7-я	8-я
Комплемент разведения 1:50	0,3	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	—
Изотонический раствор хлорида натрия	0,3	0,4	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,2
Количество смеси, удаляемое из пробирок	0,4	0,4	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	—
Получаемые раз- ведения комп- лемента	1:10	1:15	1:20	1:25	1:30	1:35	1:40	—
Гемолитическая система	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Инкубация при 37° С в течение 30 мин								
Результаты								

раствором хлорида натрия до полной прозрачности надосадочной жидкости. Приготавливают 3% взвесь эритроцитов в изотоническом растворе хлорида натрия.

Гемолитическая сыворотка приготавливается в производственных институтах путем 3—4-кратной внутривенной иммунизации кроликов 50% взвесью бараньих эритроцитов. Полученную сыворотку инактивируют нагреванием при 56°С. На этикетке ампулы обозначен титр сыворотки — ее максимальное разведение, которое обеспечивает полный лизис 3% взвеси эритроцитов в присутствии комплемента при 37°С в течение часа. Титр сыворотки должен быть не ниже 1:1200 (рис. 66). Для РСК в качестве рабочей дозы берут гемолитическую сыворотку в тройном титре.

**Постановка основного опыта.** После установления титра и рабочих доз всех ингредиентов производят постановку основного опыта РСК (см. табл. 17). Испытуемую и контрольные сыворотки предварительно инактивируют (нагреванием при 56°С в течение 30 мин).

Стандартная схема постановки РСК предусматривает проведение первой фазы при 37°С в течение 30 мин. При поста-

## Основной опыт реакции связывания комплемента

Ингредиенты, мл	Пробирки						
	1-я	2-я	3-я	4-я	5-я	6-я	7-я
Испытуемая сы- воротка в раз- ведении 1:5	0,2	—	—	0,2	—	—	—
Положительная сыворотка	—	0,2	—	—	—	—	—
Отрицательная сыворотка	—	—	0,2	—	—	—	—
Антиген	0,2	0,2	0,2	—	0,2	—	—
Изотонический раствор хлори- да натрия	—	—	—	0,2	0,2	0,4	0,6
Комплемент (в рабочей дозе)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	—
Инкубация на холоде при 0—4°С в течение 18—20 ч или при 37°С в течение 30 мин							
Гемолитическая система	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Инкубация при 37°С в течение 20—30 мин							
Результаты							

новке РСК «на холоде» эту фазу проводят при 0—4°С в течение суток, при этом специфичность и чувствительность реакции значительно повышается. После добавления в каждую пробирку по 0,4 мл гемолитической системы пробирки встряхивают и выдерживают 20—30 мин при 37°С. Результаты опыта оценивают, отмечая наличие или отсутствие гемолиза во всех пробирках. Результат РСК учитывают по 1-й пробирке: реакцию считают положительной при полной задержке гемолиза, когда жидкость в пробирке бесцветна и эритроциты оседают на дно; отрицательной (—) — при полном лизисе эритроцитов, когда жидкость интенсивно окрашена («лаковая кровь»). Степень задержки гемолиза оценивается + + + +,

+++ , ++ или + в зависимости от интенсивности окраски жидкости и величины осадка эритроцитов на дне.

В качестве контролей во 2-й и 3-й пробирках учитывают реакцию с заведомо положительной и с заведомо отрицательной сыворотками; 4-я и 5-я пробирки служат для проверки антикомплементарности сыворотки и антигена; в 6-й и 7-й пробирках контролируется качество комплемента и гемолитической системы.

### Контрольные вопросы

1. Дайте определение понятию антиген и перечислите основные свойства антигенов. Что такое гаптен и чем он отличается от полного антигена? Что такое детерминантная группа и валентность антигена?

2. Какие известны антигены бактерий? Какими антигенами обладают вирусы?

3. Дайте определение понятию антитело. Современные представления о химической природе и структуре антител. Что такое активный центр антитела?

4. Классы иммуноглобулинов и их характеристики.

5. В каких органах, тканях и клетках организма образуются антитела? Что такое Т- и В-клетки, каковы их функции и формы взаимодействия в процессе иммуногенеза?

6. Какие медиаторы клеточного иммунитета (лимфокины) продуцируются и выделяются Т-клетками и в каких реакциях они выявляются?

7. В чем заключаются общие положения современных теорий иммуногенеза?

8. Аутоагрессивные состояния. Их профилактика и лечение. Что такое аутоантигены? Приведите примеры.

9. Иммунологическая толерантность, способы ее индукции и значение.

10. Каковы механизмы антимикробного иммунитета? По каким показателям оценивают антимикробный иммунитет?

11. Механизм и фазы реакции антиген — антитело.

12. Какие реакции называются серологическими и для чего они применяются?

13. Механизм, методические варианты, техника постановки и практическое применение реакции бактериальной агглютинации.

14. Механизм, техника постановки и практическое использование реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) и реакции торможения пассивной гемагглютинации (РТПГА).

15. Как узнать, являются ли антитела в сыворотке крови следствием перенесенного заболевания, вакцинации или диагностическим признаком текущей инфекции?

16. Что такое неполные антитела? Каковы методы их выявления?

17. Механизм, техника постановки и диагностические возможности пробы Кумбса.

18. Резус-конфликт новорожденных и его ранняя диагностика.

19. Механизм, техника постановки и диагностическое применение реакции преципитации.

20. С какими целями используют реакцию преципитации в судебной медицине, санитарной бактериологии и других дисциплинах?

21. В чем заключается прямой и непрямой иммунофлюоресцентный метод Кунса и возможности его диагностического применения?

22. Механизм антитоксического иммунитета. Приведите примеры заболеваний, для которых характерен антитоксический иммунитет.

23. Механизм реакций Шика и Дика и их применение.

24. Как получают антитоксические сыворотки? Методы титрования и единицы измерения их активности.

25. Механизмы, техника постановки и практическое применение реакции флоккуляции.

26. Механизм и диагностическое значение реакции связывания комплемента (РСК).

27. Механизм и методические варианты постановки реакции бактериолиза *in vitro* и *in vivo* (феномен Исаева—Пфейфера).

28. Виды вакцинных препаратов. Как готовят аутовакцины и в каких случаях их применяют?

29. Как получают иммунные диагностические сыворотки и для чего их применяют?

30. Как получают анатоксины, в каких единицах их дозируют и для чего применяют?

31. Что такое адъюванты? Какие вещества могут быть использованы в качестве адъювантов? Механизмы их действия.

32. Что такое гамма-глобулин? Какие гамма-глобулины используют для профилактики и лечения инфекционных заболеваний? Принципы их получения.

33. Дайте определение понятию «аллергия». Типы аллергии и их характеристика. В чем проявляется сенсibilизация и десенсibilизация организма?

34. Механизмы и проявления аллергических реакций немедленного и замедленного типа.

35. Кожно-аллергические пробы и их диагностическое значение.

36. Сывороточная болезнь и методы ее профилактики. Как предупредить анафилактический шок при повторном введении чужеродной сыворотки?

В данном разделе студенты изучают основные методы микробиологической диагностики важнейших инфекционных заболеваний человека.

1. **Микроскопический** метод исследования патологического материала применяется в случае возможности непосредственно обнаружить возбудителя. Достоверность микроскопического исследования в значительной мере повышается при использовании иммунофлюоресцентного метода, который обуславливает специфичность и высокую чувствительность.

2. **Бактериологический** метод, т. е. выделение чистой культуры возбудителя и его последующая идентификация по морфологическим, тинкториальным, культуральным, биохимическим и антигенным свойствам. Типирование бактерий осуществляется на основании их способности реагировать с определенными монорецепторными сыворотками (серотипирование), их чувствительности к специфическим фагам (фаготипирование). Бактериологическое исследование является наиболее достоверным. Однако оно не может быть успешно применено для диагностики всех инфекционных заболеваний и требует затраты сравнительно большого количества времени.

3. **Серологический** метод исследования — обнаружение специфических антител в сыворотке крови больного и изучение динамики антител в процессе болезни и в период реконвалесценции. Серологический метод широко применяется для диагностики заболеваний и особое значение приобретает при вирусных инфекциях в связи с большими трудностями, возникающими при выделении и идентификации вирусов.

4. **Метод биологических проб** — заражение патологическим материалом чувствительных к предполагаемому микроорганизму лабораторных животных для выделения чистой культуры возбудителя (главным образом бактерий и вирусов).



5. Метод кожных аллергических проб применяется для определения гиперчувствительности людей к различного рода антигенам (аллергенам) как микробной, так и немикробной природы.

При изучении частной медицинской микробиологии студенты прежде всего должны использовать приобретенные знания для оценки роли определенных микроорганизмов в этиопатогенезе соответствующих заболеваний.

Перечень и краткая характеристика диагностических препаратов, вакцин, иммуноглобулинов, химиотерапевтических препаратов, приведенные в конце темы, знакомят студентов с имеющимися специфическими средствами, которые могут быть использованы для диагностики, профилактики и лечения соответствующих инфекций.

## МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЯХ

При микробиологической диагностике бактериальных инфекций могут быть использованы все указанные методы исследования или часть из них. Выбор того или иного метода зависит от биологических особенностей возбудителя, его локализации в организме человека, периода заболевания и других факторов. Однако в любом случае наиболее достоверным является бактериологический метод, с помощью которого проводится выделение чистой культуры возбудителя и ее идентификация. Одновременное обнаружение антител к выделенному микроорганизму, установленное с помощью серологического исследования, подтверждает бактериологический диагноз.

Однако далеко не при всех бактериальных инфекциях удается в приемлемые сроки поставить бактериологический и серологический диагноз. Поэтому при некоторых заболеваниях нередко ограничиваются применением только бактериоскопического метода (гонорея, туберкулез и др.) или серологических реакций, иногда сочетая последние с постановкой кожно-аллергической пробы (бруцеллез, туляремия и др.).

### Тема 17. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ЗАБОЛЕВАНИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ ГНОЕРОДНЫМИ КОККАМИ

К гноеродным (пиогенным) коккам относятся стафилококки, стрептококки, пневмококки, менингококки, гонококки. Эти микроорганизмы вызывают воспалительные процессы различных тканей и органов, сопровождающиеся образованием гноя.

#### Программа трех занятий

1. Изучение схем микробиологических исследований при стафилококковых и стрептококковых инфекциях, пневмонии, цереброспинальном менингите и гонорее.

2. Бактериоскопическая, бактериологическая и серологическая диагностика заболеваний, вызываемых гноеродными кокками.

3. Диагностические и лечебно-профилактические препараты, применяемые при кокковых инфекциях.

## Демонстрация

1. Мазки из чистых культур стафилококков и стрептококков.
2. Стафилококки и стрептококки в мазках из гноя.
3. Забор тампоном материала из зева и посев на чашку с кровавым агаром.
4. Этапы бактериологического исследования при сепсисе.
5. Мазки из чистой культуры пневмококка и из мокроты больного крупозной пневмонией.
6. Рост культуры пневмококка на кровавом мясо-пептонном агаре.
7. Тесты дифференцирования культур пневмококка от  $\alpha$ -гемолитического (зеленящего) стрептококка.
8. Мазки из чистой культуры менингококка и из спинномозговой жидкости больного.
9. Тампон для взятия материала из высоких отделов носоглотки.
10. Рост культуры менингококка на сыровоточном агаре.
11. Мазки из чистой культуры гонококка и из гноя больного гонореей.
12. Международный набор стафилококковых фагов, стафилококковая аутовакцина, стафилококковый анатоксин, токсин Дика, типоспецифические пневмококковые сыворотки, гонококковый антиген, гонококковая вакцина.

### Задание студентам для выполнения лабораторной работы

#### З а н я т и е 1-е

1. Микробиологическое исследование гноя при подозрении на стафилококковую или стрептококковую инфекцию. Материал — гной из абсцесса и мазки, взятые тампоном из зева больного.

Бактериоскопическое исследование: приготовить, окрасить по Граму и микроскопировать мазки из гноя и отделяемого зева. Сделать заключение по полученным данным.

2. Бактериологическое исследование: отметить результаты готовых посевов гноя и мазков из зева на чашки с кровавым мясо-пептонным агаром:

а) описать колонии, обратить внимание на наличие или отсутствие гемолиза;

б) приготовить, окрасить по Граму и микроскопировать мазки из колоний;

в) пересеять одну из подозрительных колоний на скошенный мясо-пептонный агар и в сахарный мясо-пептонный бульон.

Наметить ход дальнейшего исследования для установления патогенности выделенных культур.

#### З а н я т и е 2-е

1. Продолжение микробиологического исследования гноя при подозрении на стафилококковую или стрептококковую инфекцию:

а) отметить характер роста культур, выделенных на сахарном мясо-пептонном бульоне и мясо-пептонном агаре.

б) приготовить, окрасить по Граму и микроскопировать мазки из выделенных культур;

в) определить наличие фермента плазмокоагулазы;

г) определить чувствительность стафилококка к антибиотикам по готовым посевам.

Сделать окончательное заключение о виде выделенной культуры, ее патогенности и чувствительности к антибиотикам на основании всех проведенных исследований.

### З а н я т и е 3-е

1. Микробиологическое исследование при подозрении на крупозную пневмонию:

а) вскрыть белую мышь, предварительно зараженную мокротой больного; сделать мазки-отпечатки из органов, окрасить и микроскопировать;

б) сделать посев крови из сердца на кровяной мясо-пептонный агар.

Сделать заключение по микроскопическому исследованию и демонстрации.

2. Серологическое исследование при подозрении на эпидемический цереброспинальный менингит. Материал — спинномозговая жидкость (ликвор).

Поставить реакцию преципитации для определения менингококкового антигена в ликворе больного.

Сделать заключение на основании полученных данных.

3. Микробиологические исследования при подозрении на гонорею.

1) Бактериоскопическое исследование. Материал — гной из уретры. Микроскопия готовых и окрашенных мазков (по Граму и метиленовым синим). Дать заключение. 2) Серологическая диагностика. Материал — сыворотка крови больного. Регистрация результатов реакции связывания комплемента Борде — Жапгу. Дать заключение.

### Микробиологическая диагностика стафилококковых инфекций

Стафилококки относятся к семейству Micrococcaceae, роду *Staphylococcus*, который включает три вида: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*. Подавляющее большинство патогенных стафилококков принадлежит к виду *Staphylococcus aureus*. Однако они встречаются и среди двух других видов: *Staphylococcus epidermidis* и *Staphylococcus saprophyticus*.

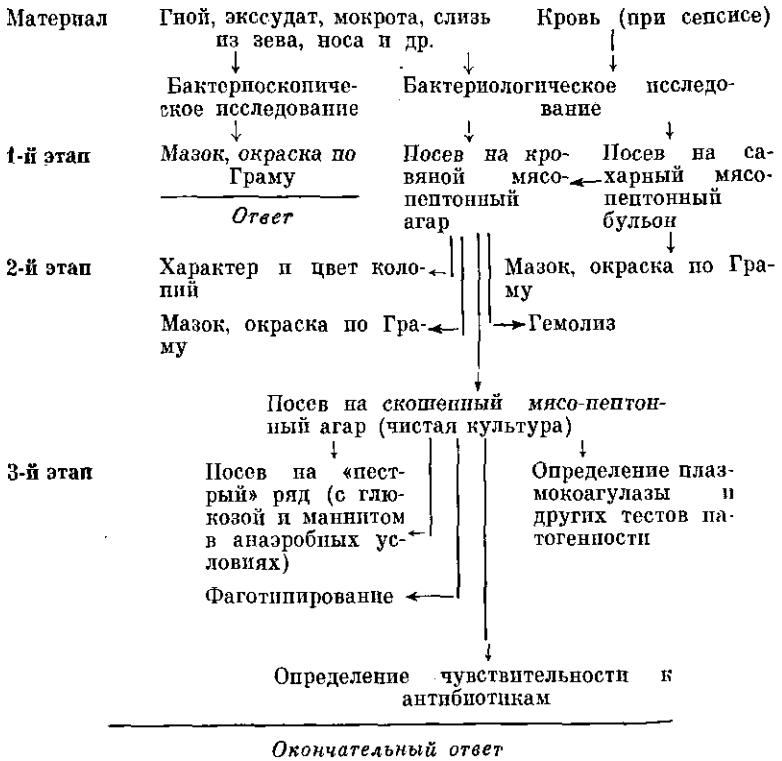
Стафилококки являются возбудителями гнойных воспалительных процессов и осложнений при соматических и хирургических заболеваниях, к которым следует отнести фурункулы, карбункулы, абсцессы, флегмоны, панариции, гидраденит, пневмонию, остеомиелит, сепсис и др. Стафилококки, образующие энтеротоксины в пищевых продуктах (сливках, кремах, кондитерских изделиях и др.), могут вызывать пищевую интоксикацию.

### Методические указания

Бактериоскопическое исследование (схема 2). Мазки для бактериоскопии готовят из гноя, экссудата или другого патологического материала и окрашивают по Граму. Наличие

## Схема 2

### Схема микробиологического исследования при стафилококковых инфекциях



грамположительных кокков (размерами 0,8—1 мкм), располагающихся группами, попарно или в виде коротких цепочек, позволяет поставить предварительный диагноз (рис. 67).

**Бактериологическое исследование.** Исследуемый материал засевают на кровяной агар или мясо-пептонный агар в чашки Петри. На 2-й день исследуют выросшие колонии, делают из них мазки и окрашивают по Граму. Колонии стафилококков имеют правильную выпуклую форму, гомогенную или мелкозернистую структуру. На кровяном агаре колонии гемолитических штаммов окружены зоной гемолиза (рис. 68). Для получения чистой культуры одну из них пересевают на скошенный мясо-пептонный агар. На нем *Staphylococcus aureus*

образует золотистый пигмент, а *Staphylococcus epidermidis* — белый пигмент.

Кровь от больного сепсисом засевают в сахарный бульон и посеы инкубируют при 37°C в течение 1—3 сут. Затем производят пересев на кровяной агар для выделения чистой культуры и ее идентификации.

Определение вида стафилококка проводят по ряду признаков (табл. 18).

Таблица 18

Отличительные признаки видов рода *Staphylococcus*

Признаки	Вид		
	<i>St. aureus</i>	<i>St. epidermidis</i>	<i>St. saprophyticus</i>
Образование плазмокоагулазы	+	—	—
» фосфатазы	+	—	—
Ферментация глюкозы	+	+	—
» маннита в анаэробных условиях	+	—	+
Альфа-токсин	+	—	—

Обозначения: + наличие признака, — отсутствие признака.

Для идентификации патогенных штаммов стафилококков от сапрофитических чаще всего определяют их способность образовывать плазмокоагулазу, вызывать гемолиз, ферментировать маннит в анаэробных условиях и вызывать некроз на коже кролика при дермонекротической пробе. В некоторых случаях определяют способность исследуемых штаммов продуцировать лецитовителлазу, гиалуронидазу, фибринолитический фермент.

**Биологическая проба.** При подозрении на пищевую интоксикацию стафилококковой природы необходимо определить наличие стафилококкового энтеротоксина в исследуемом материале. Для этого энтеротоксин экстрагируют изотоническим раствором хлорида натрия и энтерально заражают котят-сосунков. Через 30—60 мин у животных начинается рвота, появляется понос и иногда наступает летальный исход. В ряде случаев показано проведение бактериологического исследования для выделения чистой культуры стафилококка из остатков пищевых продуктов, рвотных масс больного, поскольку в указанных материалах наряду с энтеротоксином могут присутствовать жизнеспособные стафилококки. Для этого ис-

следуемый материал засевают на желточно-солевой агар. В его состав входит мясо-пептонный агар с 10% NaCl и 10—20% желточной взвеси. Преимущество данной среды перед мясо-пептонным агаром состоит в том, что на ней подавляется рост другой микрофлоры высокими концентрациями хлорида натрия. После инкубации посевов при 37°C в течение 20 ч просматривают выросшие колонии. К подозрительным относят те из них, которые окружены мутным венчиком, указывающим на образование бактериями лецитовителлазы. Из этих колоний получают чистые культуры и проверяют их способность образовывать энтеротоксин.

Для эпидемиологического анализа массовых стафилококковых заболеваний (внутрибольничных инфекций, пищевых отравлений) проводят фаготипирование выделенных из разных источников стафилококков и по идентичности фаготипов устанавливают источник инфекции. Один штамм патогенного стафилококка может лизироваться несколькими типами фагов, поэтому все типовые фаги (24) и штаммы патогенных стафилококков объединены в 4 группы. При фаготипировании используют критическое разведение фага, т. е. наивысшее разведение, лизирующее соответствующий штамм стафилококка.

Выделенные от больных патогенные штаммы стафилококка обязательно проверяются на чувствительность к антибиотикам (см. с. 101).

### **Микробиологическая диагностика стрептококковых инфекций**

Патогенные стрептококки — *Streptococcus pyogenes* относятся к семейству Streptococcaceae, роду Streptococcus. Они являются возбудителями ангины, сепсиса, хронического сепсиса, подострого септического эндокардита, рожистого воспаления, скарлатины и других различных гнойных процессов. Ряд заболеваний, вызываемых стрептококками, характеризуются хроническим течением, склонностью к рецидивам и с трудом излечиваются (ревматизм, эндокардиты и др.). Кроме того, имеются непатогенные стрептококки, которые сапрофитируют в полости рта и в кишечнике человека (энтерококки).

### **Методические указания**

**Бактериоскопическое исследование.** Мазки для первичной бактериоскопии готовят из патологического материала и окрашивают по Граму. Наличие грамположительных кокков (0,6—

1 мк), располагающихся в виде коротких цепочек, позволяет поставить предварительный диагноз.

**Бактериологическое исследование.** Материал засевают на кровяной мясо-пептонный агар. На следующий день изучают характер колоний и гемолиза, готовят мазки из колоний и окрашивают их по Граму. Для получения чистой культуры изолированную колонию пересевают в пробирку с сахарным мясо-пептонным бульоном.

Многие стрептококки образуют на кровяном агаре мелкие, диаметром 0,5—1 мм, мутные серовато-беловатого цвета колонии, окруженные зоной гемолиза. По характеру гемолиза стрептококки делят на:  $\beta$ -гемолитические стрептококки (*Str. haemolyticus*), формирующие мелкие колонии с большой, полностью прозрачной зоной гемолиза;  $\alpha$ -гемолитические зеленящие стрептококки (*Str. viridans*), образующие зону частичного гемолиза с зеленоватым окрашиванием вокруг колоний. К третьей группе относятся  $\gamma$ -стрептококки, не вызывающие гемолиза на кровяном агаре.

Наиболее патогенны  $\beta$ -гемолитические — *Str. pyogenes*, являющиеся возбудителями большинства стрептококковых инфекций.

Для более детальной характеристики их патогенных свойств определяют продукцию гиалуронидазы, фибринолизина и другие тесты патогенности.

На жидких средах стрептококки в отличие от стафилококков дают придонно-пристеночный рост в виде хлопьев или зерен, оставляя всю среду прозрачной. Особенности роста стрептококков на средах являются одним из дифференциальных признаков (схема 3).

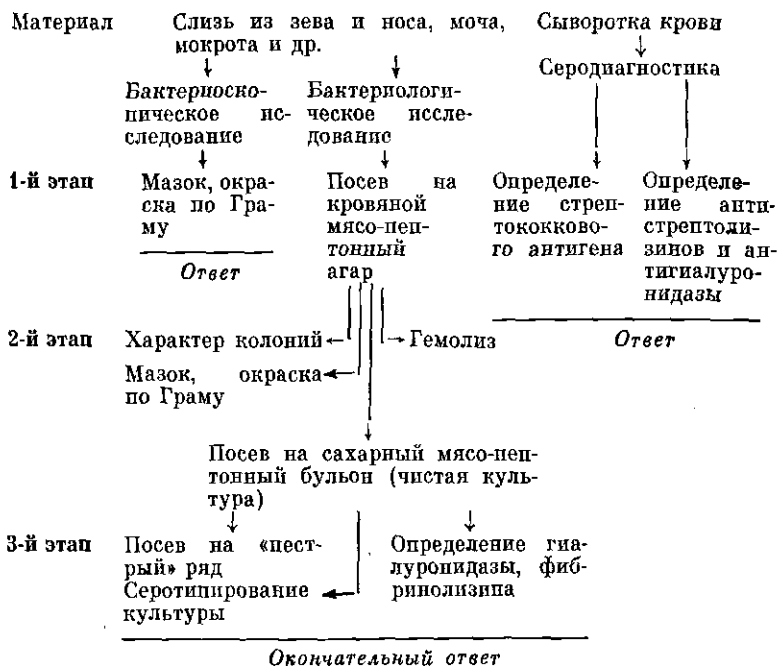
Исследование крови при подозрении на стрептококковый сепсис производят следующим образом: стерильно взятую кровь из вены в количестве 10 мл засевают на 100 мл сахарного или сывороточного бульона, а также на среду Китта — Тароцци. Посевы в течение 3—4 нед инкубируют при 37°C и периодически делают высевы на чашки с кровяным агаром для выделения чистой культуры. Заключительным этапом бактериологического исследования является идентификация выделенной культуры по биохимическим и антигенным свойствам.

По антигенной структуре все стрептококки делят на 17 серологических групп (A, B, C, D.....S). Групповую принадлежность стрептококков определяют в реакции преципитации с полисахаридным преципитином, выделенным из исследуемой культуры. Обычно пользуются сыворотками наибо-



### Схема 3

#### Схема микробиологического исследования при стрептококковых инфекциях<sup>1</sup>



<sup>1</sup> Бактериологическое исследование крови при сепсисе описано в тексте.

лее распространенных групп А, В, С, D. Большинство патогенных для человека β-гемолитических стрептококков относится к группе А. По содержанию типоспецифических антигенов протеиновой природы β-гемолитические стрептококки разделяются на серотипы, из которых 47 типов относятся к группе А. Серологический тип стрептококков определяют в реакции агглютинации.

**Серологическое исследование.** При разных нозологических формах стрептококковой инфекции с помощью РСК или реакции преципитации определяют наличие специфических антигенов в крови (иногда в моче) больного. Антитела (анти-О-стрептолизина, антигиалуронидаза) к соответствующим стрептококковым антигенам определяют главным образом для подтверждения диагноза ревматизма. Антистрептолизи-

новая реакция основана на нейтрализации способности О-стрептолизина растворять эритроциты при наличии в крови большого соответствующих антител. Реакцию ставят со стандартным сухим О-стрептолизинном.

Реакция Дика применяется для определения антитоксического иммунитета против эритрогенного токсина скарлатинозного стрептококка. Ставится с токсином Дика, представляющим собой экзотоксин скарлатинозного стрептококка.

### Микробиологическая диагностика пневмококковых инфекций

**Пневмококки** — *Streptococcus pneumoniae* — относятся к семейству Streptococcaceae, роду Streptococcus. Они являются возбудителями крупозной пневмонии, ползучей язвы роговицы, а также могут вызывать сепсис, ринит, отит, менингит и другие гнойно-воспалительные процессы.

#### Методические указания

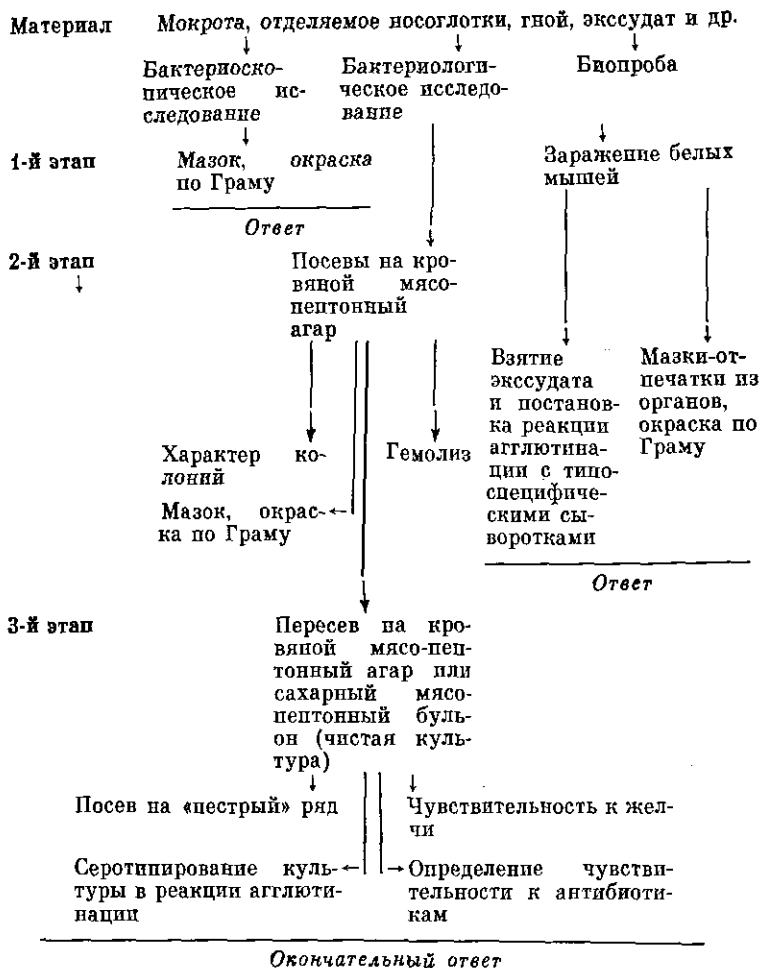
**Бактериоскопическое исследование.** Мазки для первичной бактериоскопии готовят из патологического материала (мокрота, гной, спинномозговая жидкость). Наличие в них грамположительных, несколько удлиненных, ланцетовидных диплококков (0,5—1,25 мкм), окруженных капсулой, позволяет поставить предварительный диагноз (рис. 69).

**Бактериологическое исследование.** Материал засевают на кровяной агар и одновременно на сахарный бульон (лучше с добавлением сыворотки или асцитической жидкости). Колонии пневмококков напоминают рост  $\alpha$ -гемолитических зеленящих стрептококков: мелкие, пежные, окруженные зеленоватой зоной и небольшим гемолизом. Из колоний делают мазки, окрашивают их по Граму и пересевают на кровяной агар или сывороточный бульон для выделения чистой культуры (схема 4). Для отличия от стрептококка проверяют отношение выделенной культуры к желчи, оптохину, а также ферментацию инулина (табл. 19).

При необходимости тип пневмококка устанавливают в реакции агглютинации с типоспецифическими сыворотками (из 80 известных типов в патологии человека основную роль играют пневмококки 1-го, 2-го и 3-го типов). Быстрым методом типирования пневмококков является реакция Нейфельда. Метод основан на феномене набухания капсул пневмококков под влиянием типоспецифических сывороток: реакцию ставят

### Схема 4

#### Схема микробиологического исследования при пневмококковых инфекциях



непосредственно с патологическим материалом без выделения культуры пневмококка, учитывая результаты в препаратах «висячая капля» под микроскопом.

**Биологическая проба.** Внутривентриально заражают белых мышей, высокочувствительных к пневмококковой инфекции.

## Дифференциальные признаки пневмококков и зеленящих стрептококков

Вид	Признак		
	ферментация инулина	растворяющее действие 10--40% раствора желчи	ингибирующее действие раствора оптохина 1 : 500 000
Пневмококки	+	+	+
Стрептококки	-	-	-

Обозначения те же, что и в табл. 18.

Пневмококк обнаруживают в мазках-отпечатках из органов. Делают посевы крови, выделяют и идентифицируют культуру.

## Микробиологическая диагностика цереброспинального менингита

Менингококки — *Neisseria meningitidis* относятся к семейству *Neisseriaceae*, роду *Neisseria*. Они являются возбудителями эпидемического цереброспинального менингита, а также вызывают назофарингиты и менингококцемии.

## Методические указания

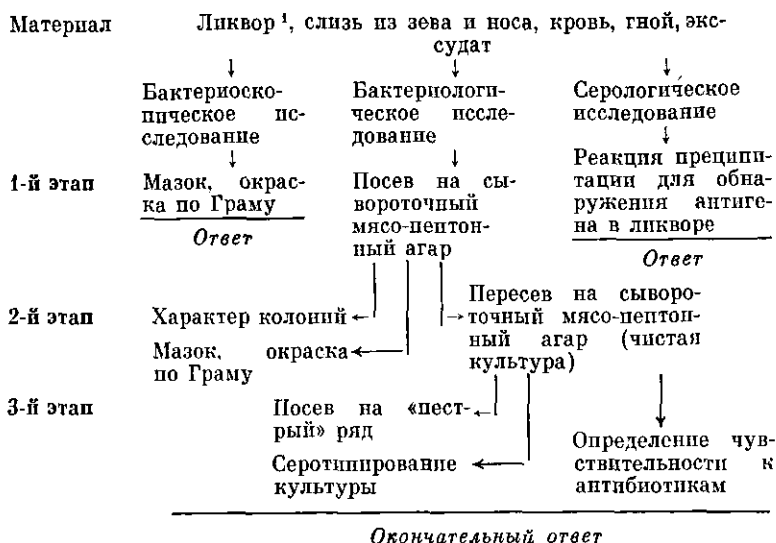
**Бактериоскопическое исследование.** Материал из верхних отделов носоглотки берут специальным тампоном. Из спинномозговой жидкости непосредственно приготавливают мазки, которые окрашивают по Граму. В положительном случае в мазках из патологического материала обнаруживают грамотрицательные диплококки бобовидной формы (0,6—1 мкм) обращенные вогнутой стороной друг к другу.

**Бактериологическое исследование.** Для получения чистой культуры материал засевают петлей на поверхность сывороточного мясо-пептонного агара. Колонии вырастают на 2-й день инкубации. В отличие от колоний стафилококков и стрептококков они являются более прозрачными (схема 5).

Кроме сывороточного мясо-пептонного агара, при диагностике менингита и обследовании на менингококковое бактерионосительство проводится высеивание на сывороточную среду с антибиотиком ристомицином.

## С х е м а 5

### Схема микробиологического исследования при менингококковой инфекции



<sup>1</sup> Ликвор разделяют на две части: одну центрифугируют и исследуют осадок, другую предварительно выдерживают при 37° С.

ном (125—150 ЕД/мл), который угнетает рост грамположительных кокков и тем самым облегчает выделение менингококка из исследуемого материала.

Подозрительные колонии пересевают на скошенные среды, выделяют и идентифицируют культуру по «пестрому» ряду. Менингококки ферментируют только глюкозу и мальтозу с образованием кислоты. Типируют менингококки в реакции агглютинации с типоспецифическими сыворотками (А, В, С, D). В СССР в основном встречаются серотипы А и В.

**Серологическое исследование.** Используется реакция преципитации для обнаружения менингококкового антигена в спинномозговой жидкости больного. Реакция ставится с эталонными типоспецифическими сыворотками.

### Микробиологическая диагностика гонорей

Гонококки — *Neisseria gonorrhoeae* относятся к семейству *Neisseriaceae*, роду *Neisseria* и являются возбудителями гонорей и бленнорей.

## Методические указания

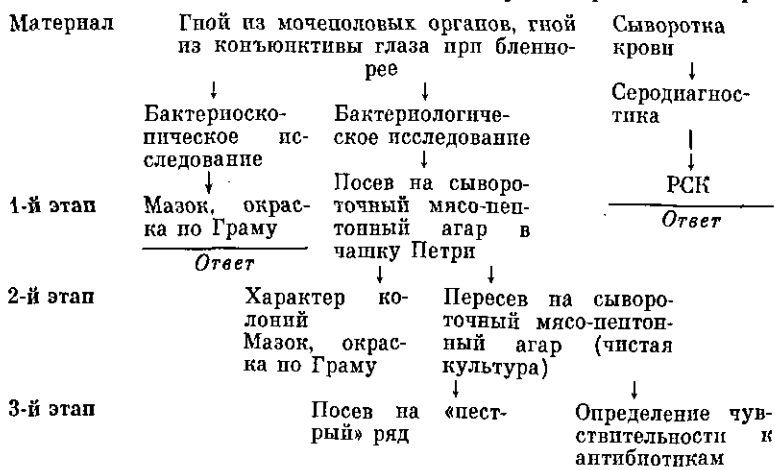
**Бактериоскопическое исследование.** В положительном случае в мазках из уретрального гноя обнаруживают грамотрицательные диплококки бобовидной формы (0,6—1 мкм). В остром периоде болезни они располагаются большими скоплениями внутри лейкоцитов — незавершенный фагоцитоз (рис. 70).

**Бактериологическое исследование.** Материал петлей сеют на чашки с сывороточным мясо-пептонным агаром или средой Бейли (приготавливается из экстракта бычьих сердец с добавлением пептона и агара). Посевы инкубируют в течение 1—3 сут. Колонии правильной формы, прозрачные, напоминают капли росы. Из подозрительных колоний готовят мазки и пересевают на скошенные асцитические среды для получения чистой культуры. В мазках из культур гонококки располагаются нетипично.

Выделенную культуру идентифицируют по характеру роста и биохимическим свойствам. Гонококк ферментирует только глюкозу до образования кислоты. Выделение чистой культуры проводят в сомнительных случаях при неясной картине бактериоскопии (схема 6).

Схема 6

Схема микробиологического исследования при гонорее и бленнорее



Окончательный ответ

**Серологическое исследование.** Ставят реакцию связывания комплемента Борде — Жапгу (см. с. 137) с гонококковым антигеном, представляющим собой убитую взвесь гонококков. Положительные результаты наблюдаются главным образом при хронической форме заболевания.

### **Диагностические, профилактические и лечебные препараты**

**Очищенный адсорбированный стафилококковый анатоксин.** Получают из нативного анатоксина путем осаждения его трихлоруксусной кислотой с дополнительной очисткой этиловым спиртом и адсорбцией гидроокисью алюминия. Препарат обладает высокими иммуногенными свойствами. Применяется для активной иммунизации против стафилококковых заболеваний.

**Стафилококковая вакцина.** Взвесь коагулазоположительных стафилококков, инактивированных нагреванием. Применяется для специфического лечения больных, страдающих хронической формой стафилококковой инфекции.

**Стафилококковый антифагин.** Экстракт из культур патогенных стафилококков, прогретых при 100°C и профильтрованных через бактериальные фильтры. В препарате содержатся термостабильные стафилококковые антигены, обладающие способностью стимулировать защитные реакции организма. Применяется для специфической иммунотерапии стафилококковых инфекций.

**Иммуноглобулин человеческий противостафилококковый.** Гамма-глобулиновая фракция сыворотки крови, содержащая стафилококковый антитоксин. Приготавливают из крови людей, иммунизированных стафилококковым адсорбированным анатоксином. Применяется для специфического лечения стафилококковых инфекций.

**Стафилококковый бактериофаг (жидкий).** Фильтрат фаголизата стафилококков. Применяется наружно, а также подкожно, внутривенно или внутримышечно для лечения и профилактики стафилококковых инфекций.

**Стафилококковые бактериофаги (международный набор)** применяются для фаготипирования стафилококков с целью установления источника инфекции и путей передачи.

**Токсин Дика.** Высокоочищенный эритрогенный токсин гемолитического стрептококка. Активность препарата измеряется в кожных дозах. Применяется для постановки внутривенно-

ной пробы Дика для определения антитоксического иммунитета у детей.

**Стрептококковый бактериофаг (жидкий).** Фильтрат фаголизата стрептококков. Применяется наружно или подкожно, внутрикожно и внутримышечно для лечения и профилактики стрептококковых инфекций.

**Сыворотки (противопневмококковые типоспецифические I, II, III типа)** применяются для типирования пневмококков.

**Гонококковый антиген.** Взвесь убитой культуры гонококка. Применяется для постановки РСК.

**Гонококковая вакцина.** Взвесь гонококков, убитых нагреванием. Применяется для вакцинотерапии хронической гонореи, а также для «провокации» при диагностике этого заболевания.

**Антибиотики и химиотерапевтические препараты:** пенициллин, бициллин, хлортетрациклин, окситетрациклин, неомицин, метициллин, оксациллин, сульфаниламиды.

### **Микробиологическая диагностика гнойных заболеваний, вызванных другими бактериями**

Возбудителями гнойных воспалительных процессов наряду с гноеродными кокками могут быть *Pseudomonas aeruginosa*, синегнойная палочка, и представители семейства кишечных бактерий — *E. coli* и *Proteus*.

Синегнойная палочка относится к семейству *Pseudomonadaceae*. Она встречается в кишечнике людей и животных, может быть выделена с поверхности кожных и слизистых покровов, а также из почвы, сточной и озерной воды и т. п. Вирулентные штаммы синегнойной палочки вызывают гнойные заболевания (отиты, пневмонии, менингоэнцефалиты, абсцессы), преимущественно у ослабленных людей.

Микробиологическая диагностика заболеваний, вызванных *Ps. aeruginosa*, проводится путем выделения чистой культуры этого микроба на мясо-пептонном агаре. В мазках из культуры видны мелкие грамотрицательные палочки. Они не образуют спор и окружены тонкой слизистой капсулой, подвижны. Наиболее характерным диагностическим признаком является их способность образовывать сине-зеленый пигмент, диффундирующий в агар и окрашивающий его в сине-зеленый цвет.

Бактериологическая диагностика гнойных заболеваний, вызванных *E. coli* и *Proteus*, осуществляется путем выделе-



Рис. 70. Гонококк в гное из уретры. Окраска по Граму (к стр. 158).

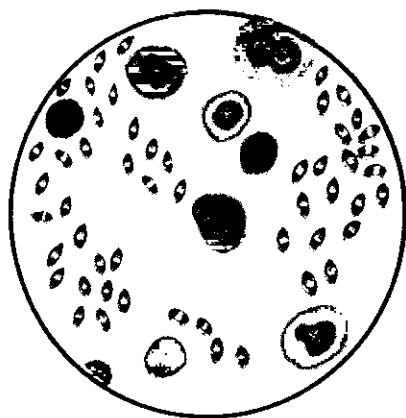
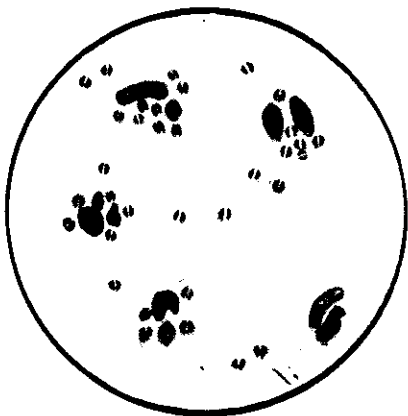
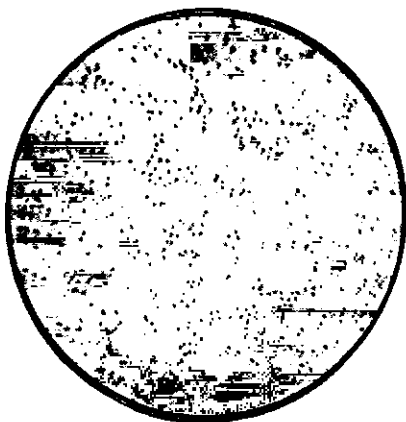


Рис. 71. Бактерии чумы в патологическом материале. Окраска метиленовым синим (к стр. 163).

Рис. 72. Бактерии туляремии (чистая культура). Окраска по Граму (к стр. 166).



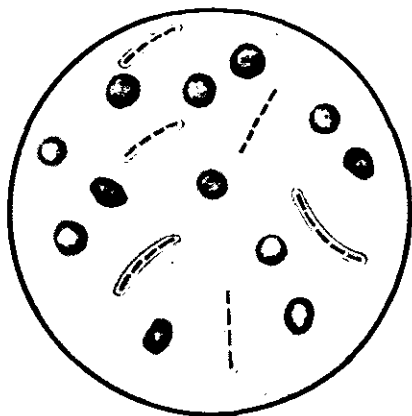
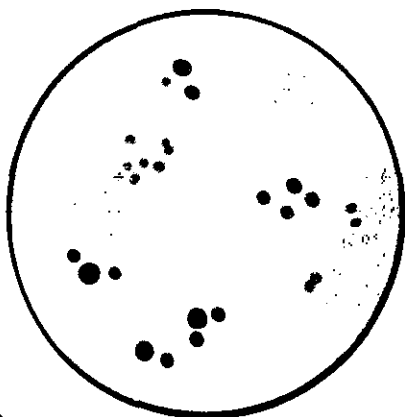
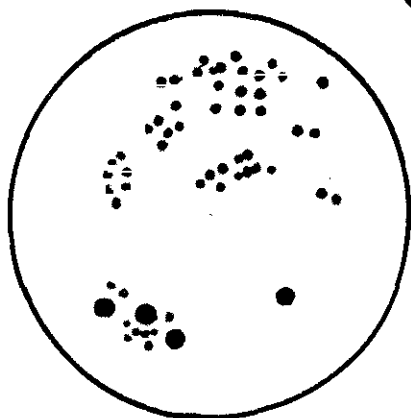


Рис. 73. Сибирязвенные  
 бациллы (к стр. 172).



*a*



*б*

Рис. 74. Рост бактерий се-  
 мейства *Enterobacteriaceae*  
 на дифференциально-диа-  
 гностических средах (к стр.  
 181).

*a* — колонии *E. coli* и *S. typhi*  
 на среде Эндо; *б* — колонии  
*E. coli* и *Sh. flexneri* на среде  
 Пловкерева.

Рис. 75. Холерный вибрион (чистая культура). Окраска по Граму (к стр. 198).

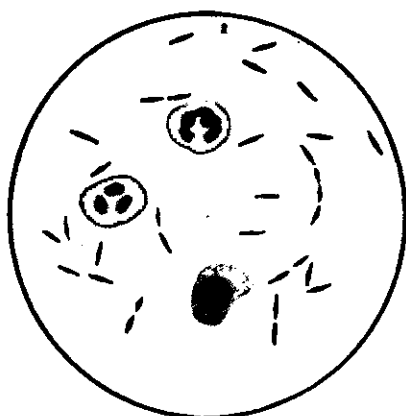
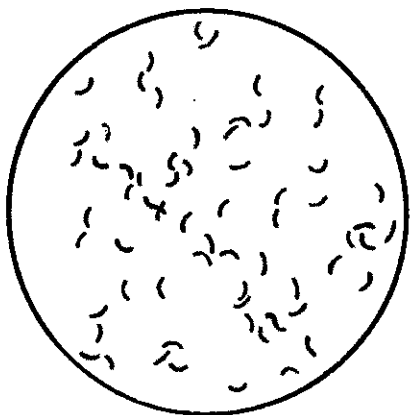
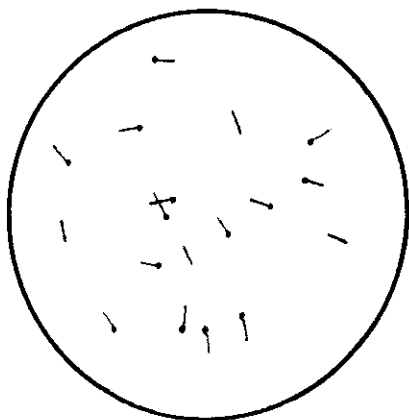


Рис. 76. *Cl. perfringens* в патологическом материале. Окраска по Граму (к стр. 203).

Рис. 77. *Cl. tetani* (чистая культура). Окраска по Ожешко (к стр. 206).



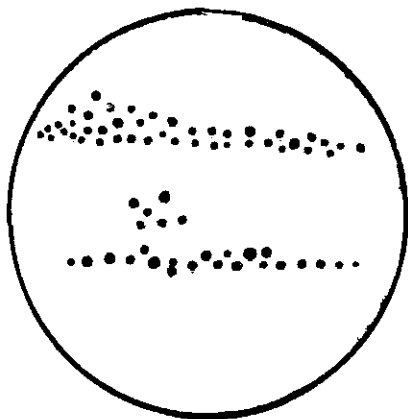


Рис. 78. Рост коринебактерий дифтерии на теллуритовой среде (к стр. 213).

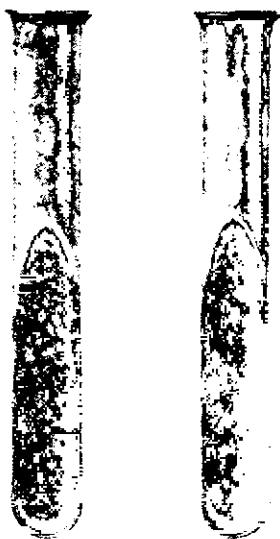


Рис. 79. Рост микобактерий туберкулеза на среде Левенштейна — Йенсена (к стр. 225).

Рис. 80. Микрокультура микобактерий туберкулеза. Окраска по Цилю — Нильсену (к стр. 225).

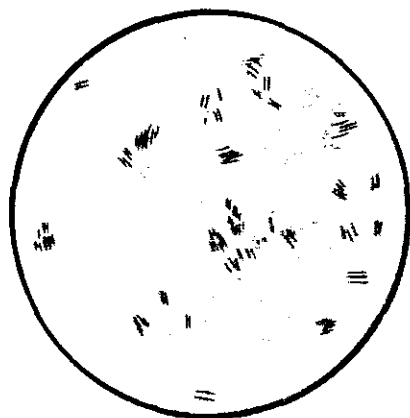
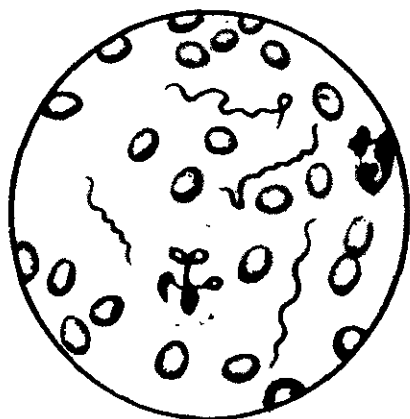
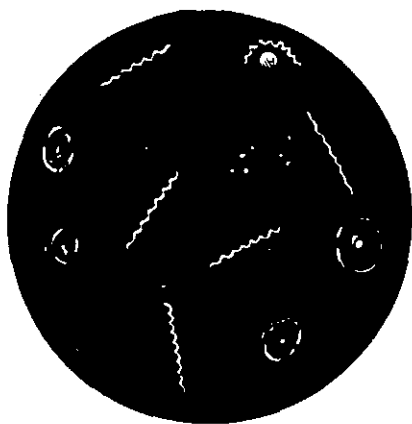


Рис. 81. Микобактерии лепры. Окраска по Цилю — Нильсену (к стр. 227).

Рис. 82. Боррелии возвратного тифа в крови больного. Окраска по Романовскому — Гимзе (к стр. 230).





а



б

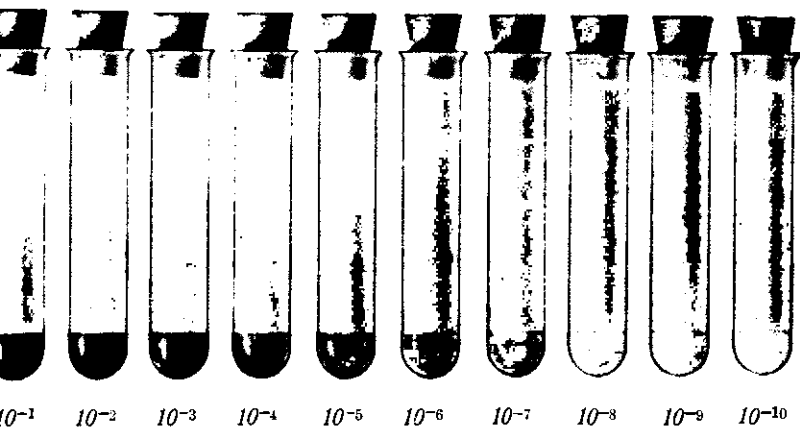
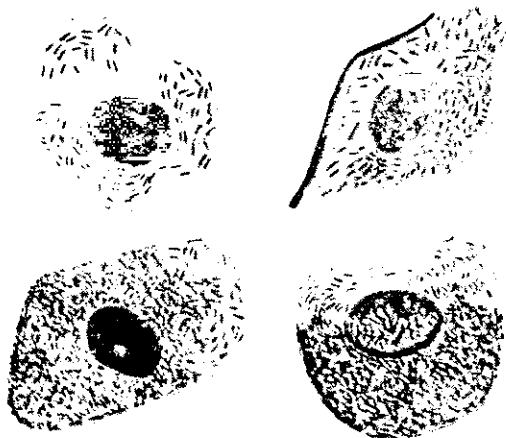
Рис. 83. Бледная трепонема (к стр. 231).

а — темнопольная микроскопия; б — окраска по Романовскому—Гимзе.

Рис. 85. Риккетсии Мухоморова в клетках влажной оболочки яйца свинки. Окраска карболовым фуксином и метиленовым синим (к стр. 240).



Рис. 89. Титрование вируса полиомелита методом цветной пробы. Разведения вируса (от  $10^{-1}$  до  $10^{-10}$ ) и суспензию клеток соединяют в равных объемах в пробирках. Через несколько дней наблюдают ступенчатую шкалу окрашивания среды от красной до желтой (к стр. 257).



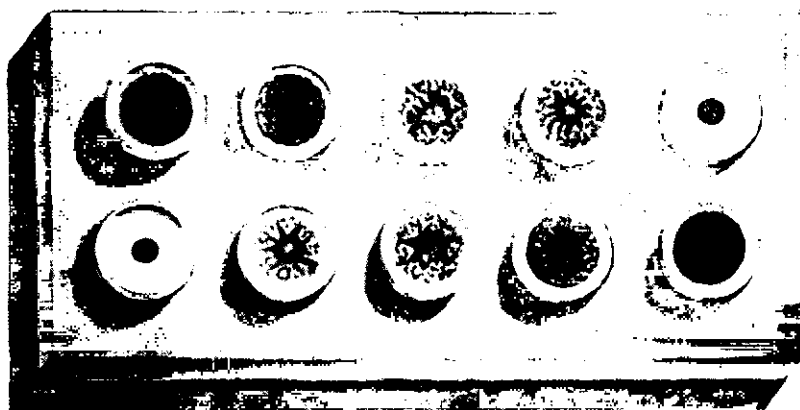


Рис. 92. Титрование вируса гриппа в реакции гемагглютинации куриных эритроцитов (к стр. 267).



Рис. 93. Тельца Бабеша — Негри в нейронах аммонова рога на срезе головного мозга человека. Окраска по Романовскому — Гимзе (к стр. 271).



ния чистых культур бактерий на среде Эндо и мясо-пептонном агаре соответственно и их последующей идентификации (с. 189).

### Контрольные вопросы

1. Назовите микроорганизмы, вызывающие гнойные инфекции.
2. Каким образом проводится забор патологического материала для микробиологических исследований при гнойных инфекциях и как он доставляется в лабораторию?
3. В чем заключаются принципы микробиологической диагностики гнойных инфекций?
4. Роль стафилококков в патологии человека. Особенности патогенеза и иммунитета при стафилококковых инфекциях.
5. Биологические признаки стафилококков. Какие из них используются для идентификации стафилококков?
6. Какие токсические вещества образуют стафилококки?
7. Дайте характеристику методам, применяемым для микробиологической диагностики стафилококковой инфекции, и тестам, используемым для определения патогенности стафилококков.
8. Каким образом определяют источник инфекции при внутрибольничных вспышках стафилококковой инфекции и при стафилококковых пищевых отравлениях?
9. Как проводят микробиологическую диагностику пищевых отравлений, вызываемых стафилококками?
10. Биологические признаки стрептококков и их отличия от других грамотрицательных кокков.
11. Классификация стрептококков. С помощью каких реакций можно определить групповую и типовую принадлежность стрептококков?
12. Дайте характеристику методам, применяемым для микробиологической диагностики стрептококковых инфекций.
13. Какие исследования проводят при подозрении на сепсис, вызванный стафилококками или стрептококками?
14. Патогенетические особенности и характер иммунитета при стрептококковой инфекции.
15. Какой тип стрептококка образует экзотоксин? Как получают и с какой целью применяют токсин Дика?
16. Биологические признаки пневмококков.
17. Какие кокки напоминают по своим признакам пневмококк и по каким тестам проводится их дифференцировка?
18. Методы выделения из патологического материала и идентификация культуры пневмококка. Какие реакции используются для их типирования?
19. В каких случаях используют биологический метод выделения пневмококка и в чем он заключается?
20. Биологические признаки менингококков и их отличие от гонококков.
21. Какие материалы исследуют при подозрении на заболевание эпидемическим цереброспинальным менингитом и при носительстве менингококков?
22. В чем заключается серологическое исследование при менингите?
23. Патогенетические особенности и характер иммунитета при менингите.

24. Биологические признаки гонококков.

25. Какой метод преимущественно применяется для микробиологической диагностики гонореи и его оценка?

26. Как и в каких случаях проводится серодиагностика гонореи?

27. Патогенетические особенности и характер иммунитета при гонорее.

28. Какие препараты используют для профилактики и лечения инфекций, вызванных патогенными кокками?

29. Профилактика бленнореи у новорожденных.

30. Получение и применение гоновакцины.

## Тема 18. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ЗООНОЗНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Возбудители зоонозных инфекций — чумы, туляремии, бруцеллеза, сибирской язвы и других заболеваний — передаются человеку от животных и отличаются чрезвычайно высокой контагиозностью. Поэтому их выделили в группу возбудителей особо опасных инфекций, работа с которыми проводится с обязательным соблюдением режима безопасности в специальных лабораториях. Бактерии чумы, туляремии и бруцеллеза относятся к различным семействам.

Основные методы, применяемые для микробиологической диагностики зоонозных инфекций, приведены в табл. 20 и на схемах 7, 8, 9, 10.

### Программа занятия

1. Изучение схем микробиологической диагностики чумы, туляремии, бруцеллеза, сибирской язвы.

2. Бактериологические и серологические исследования при зоонозных инфекциях.

3. Диагностические, профилактические и лечебные препараты, применяемые при зоонозных инфекциях.

### Демонстрация

1. Мазки, приготовленные из органов зараженных животных и чистых культур *I. pestis*, *Fr. tularensis*, *Br. melitensis*, *Bac. anthracis*.

2. Рост *Bac. anthracis* на питательных средах.

3. Реакция Хеддльсона для серодиагностики бруцеллеза.

4. Бруцеллезный и туляремийный диагностикумы, преципитирующая сибиреязвенная сыворотка, сибиреязвенные бактериофаги, бруцеллин, тулярин, антраксин, чумная живая сухая вакцина, туляремийная живая сухая кожная вакцина, бруцеллезные вакцины, сибиреязвенная живая сухая вакцина (СТИ), противосибиреязвенный глобулин, антибиотики.

### Задание студентам для выполнения лабораторной работы

1. Микробиологическое исследование при чуме. Материал для исследования — гной из бубона, органы грызунов с подозрением на чумную инфекцию. Микроскопировать готовые мазки; поставить

предварительный диагноз. Наметить ход дальнейшего исследования с учетом использования тестов для дифференцирования возбудителя чумы от бактерий псевдотуберкулеза грызунов.

2. Серологическая диагностика туляремии.

Материал для исследования — сыворотка крови больного с подозрением на туляремию. Провести учет результатов реакции агглютинации с парными сыворотками. Сделать заключение.

3. Серологическая диагностика бруцеллеза.

Материал для исследования — сыворотка крови больного с подозрением на бруцеллез. Провести учет результатов реакции агглютинации Райта. Сделать заключение.

4. Микробиологическое исследование при сибирской язве.

Материал для исследования — экссудат из кожного карбункула, шерсть животного.

а) Микроскопировать готовый препарат; поставить предварительный диагноз. Наметить ход бактериологического исследования.

б) Определить наличие сибиреязвенного антигена в исследуемой шерсти.

### Микробиологическая диагностика чумы

Возбудитель чумы — *Yersinia pestis*<sup>1</sup> содержится в естественных условиях у грызунов и нередко вызывает у них смертельную инфекцию.

Исключительное значение приобретает выделение культур чумных бактерий от больных людей, так как первые случаи заболевания нуждаются в бактериологическом подтверждении для своевременного принятия эффективных противоэпидемических мер (схема 7).

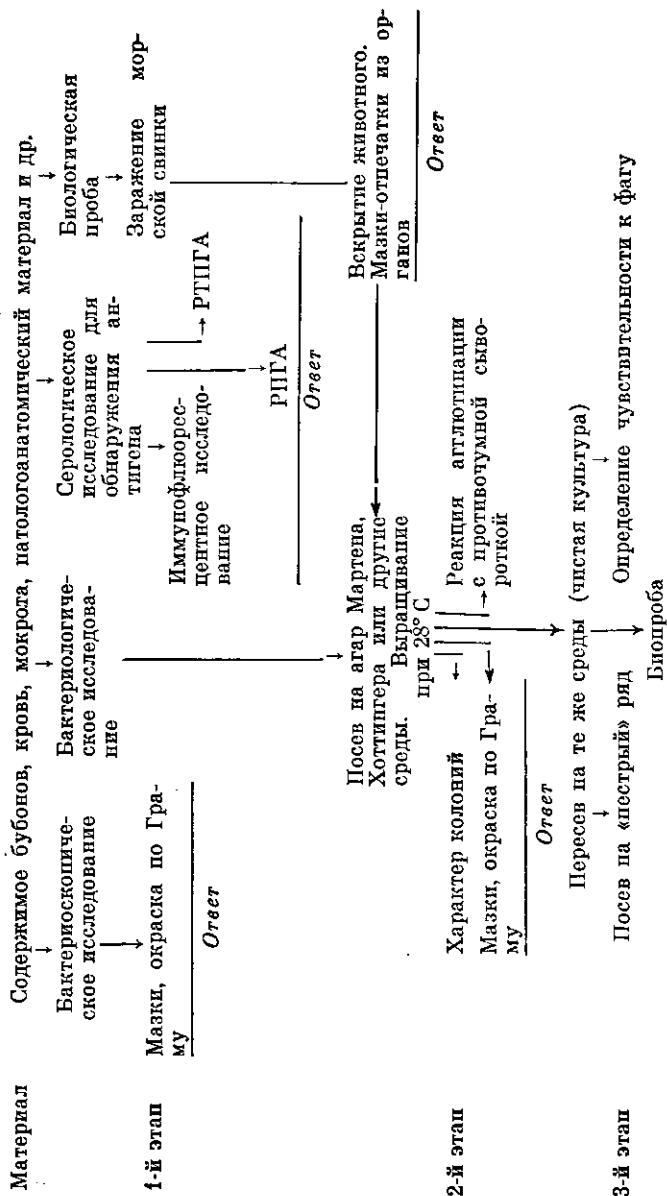
### Методические указания

**Бактериоскопическое исследование.** В мазках из органов животных и патологического материала чумная палочка (0,5×1,7 мкм) имеет овоидную форму, окружена нежной капсулой, грамтрицательна, окрашивается биполярно, полиморфна (рис. 71).

**Бактериологическое исследование.** Исследуемый материал засевают на чашки с питательным агаром. Посевы инкубируют при 25—28°C. Первичное изучение посевов производят через 10—12 ч. К этому сроку могут появиться колонии в виде «батистового платочка», которые образуют вирулентные R-формы микроба. Маловирулентные и авирулентные бактерии формируют S-формы колоний.

<sup>1</sup> *Yersinia pestis* относится к семейству Enterobacteriaceae, роду *Yersinia*, в который включена группа бактерий геморрагических септициемий, вызывающих заболевания у различных животных.

## Схема микробиологического исследования при чуме



Окончательный ответ

Идентификацию чистой культуры проводят по морфологии бактериальных клеток, характеру роста, антигенным и биохимическим свойствам, чувствительности к специфическому бактериофагу и биопробе.

На бульоне бактерии чумы образуют пленку со спускающимися нитями, напоминающими сталактиты. Они разлагают глюкозу, галактозу, арабинозу, мальтозу, ксилозу, маннит до кислоты. Индола не образуют, желатину не разжижают.

В случае исследования материала, взятого от погибших грызунов, проводится дифференциальная диагностика с палочкой ложного туберкулеза грызунов *Iersinia pseudotuberculosis* (табл. 20).

Т а б л и ц а 20

Дифференциально-диагностические признаки возбудителей чумы и псевдотуберкулеза

Признаки	<i>I. pestis</i>	<i>I. pseudotuberculosis</i>
Подвижность	—	+ при 20°C
Рост на голодном (без пептона) 3% агаре	—	+
Фибринолитические свойства	+	—
Ферментация:		
рамнозы	—	+
адонита	—	+
Уреазная активность	—	+
Лизис фагом:		
чумным	+	—
псевдотуберкулезным	—	+
Наличие бактериоциногенных (пестинногенных) факторов	+	—

Обозначения те же, что и в табл. 18.

**Биопроба.** Проводится для выделения чистой культуры из материала, загрязненного посторонней микрофлорой. Наиболее чувствительными лабораторными животными являются морские свинки, которым материал вводят подкожно. Внутрибрюшинно материал вводят в том случае, если он не загрязнен другими бактериями. Загнивший материал втирают морской свинке в выбритый участок кожи в области живота. После гибели животных (на 3—7-й день, в зависимости от способа введения) делают вскрытие, описывают патологические изменения в органах и производят бактериологическое исследование (см. схему 7).

**Ускоренные методы лабораторной диагностики.** 1. Методы ускоренного обнаружения возбудителя чумы с помощью специфического бактериофага, основанные на свойстве чумного фага быстро (в течение 30—40 мин) размножаться в присутствии возбудителя чумы.

2. Иммунофлюоресцентный метод позволяет обнаружить присутствие возбудителя в патологическом материале, воде, пищевых продуктах, эктопаразитах. Для обнаружения и идентификации возбудителя в препаратах из исследуемого материала используют: люминесцирующие видоспецифические противочумные антитела или люминесцирующие противокапсульные и противосоматические антитела.

3. Реакция торможения пассивной гемагглютинации (РТПГА) используется для обнаружения антигенов бактерий чумы в исследуемом материале с помощью стандартной противочумной сыворотки.

### **Микробиологическая диагностика туляремии**

Возбудитель туляремии — *F. tularensis* относится к роду *Francisella*. В естественных условиях встречается у грызунов, вызывая у них смертельную инфекцию. Для диагностики туляремии у людей обычно применяют кожно-аллергическую пробу и серологические реакции.

Микробиологическая диагностика проводится в специальных лабораториях путем заражения лабораторных животных, так как непосредственное выделение возбудителя на питательных средах из крови или другого материала, взятого у больных людей, удается крайне редко (схема 8).

### **Методические указания**

**Бактериоскопическое исследование.** Бактерии туляремии представляют собой очень мелкие (0,3—0,5 мкм) кокко-бактериальные формы. В мазках из органов преобладают палочковидные формы. Спор не образуют, имеют небольшую капсулу, неподвижны, грамтрицательны, иногда выражена биполярная окраска, полиморфны (рис. 72).

**Биологическая проба и бактериологическое исследование.** Данный метод применяется для выделения чистой культуры бактерий туляремии. Наиболее чувствительными животными являются белые мыши и морские свинки, которые заболевают со смертельным исходом даже при подкожном введении



единичных бактерий. Выделение бактерий туляремии проводят на свернутой яично-желточной среде, глюкозо-цистиновом кровяном агаре. Вирулентные штаммы образуют S-формы колоний — мелкие, гладкие, беловатого цвета с голубоватым оттенком.

Идентификацию чистой культуры проводят по морфологии бактериальных клеток, характеру роста, биохимическим и антигенным свойствам. Бактерии туляремии в отличие от бруцелл разлагают глюкозу, мальтозу и маннозу до кислоты. Биохимические свойства этих бактерий выявляются на специальной плотной среде с ограниченным содержанием белка.

**Серологическая диагностика.** Ставится реакция агглютинации с туляреминым диагностикумом по типу реакции Видаль (см. с. 188). Относительно позднее появление агглютининов в крови (на 2-й неделе болезни) затрудняет применение этой реакции для ранней диагностики, однако их длительное сохранение делает возможным ретроспективную диагностику. Диагностический титр реакции равен 1 : 100. Обязательно прослеживается нарастание титра антител (в парных сыворотках).

Наиболее чувствительным методом серологической диагностики туляремии является РПГА, которая бывает положительной в конце 1-й — начале 2-й недели заболевания. Титр сывороток в разгаре заболевания достигает разведений 1 : 1280—1 : 2560 и выше. Для ускоренной диагностики широко применяется кровяно-капельная реакция с тем же туляреминым диагностикумом. Кровь из пальца больного наносят на обезжиренное предметное стекло, добавляют каплю дистиллированной воды (для лизиса эритроцитов) и затем вносят каплю диагностикума, смешивают стеклянной палочкой.

**Кожно-аллергическая проба.** Выпускается два вида тулярина: один для внутрикожной пробы, другой для накожной.

Проба высокоспецифична и дает положительные результаты у больных людей, переболевших и вакцинированных. Поэтому учет реакции должен проводиться с осторожностью.

### Микробиологическая диагностика бруцеллеза

Возбудители бруцеллеза — бактерии рода бруцелла (*Brucella*). По происхождению и некоторым биологическим особенностям различают следующие виды: *Br. melitensis* — возбудитель бруцеллеза мелкого рогатого скота, *Br. abortus* — возбудитель бруцеллеза крупного рогатого скота, *Br. suis* —



возбудитель бруцеллеза у свиней. Все три вида патогенны для человека. Однако наиболее вирулентным является первый вид; *Bt. suis* вызывает спорадические случаи заболеваний.

Микробиологическая диагностика обычно проводится путем серологических исследований (реакция Райта и Хеддльсона). К выделению культур бруцелл прибегают сравнительно редко (схема 9).

### Методические указания

**Бактериологическое исследование.** Получение гемокультуры является основным методом бактериологической диагностики бруцеллеза. Для этого 5—10 мл крови, взятой из локтевой вены больного, засевают в два флакона с 50—100 мл печеночного бульона. Один из них, для выделения культур *Bt. melitensis*, инкубируют в обычных аэробных условиях, другой — для выделения первичной культуры *Bt. abortus* — в атмосфере с 10%  $\text{CO}_2$ . В первых генерациях бруцеллы растут очень медленно, поэтому посеvy выдерживают в термостате не менее месяца. Лабораторные культуры вырастают через 1—2 сут.

На агаре бруцеллы образуют бесцветные с перламутровым блеском колонии, в бульоне — помутнение и слизистый осадок. При этом в мазках, окрашенных по Граму, обнаруживаются мелкие (от 0,3—0,5 до 1,5 мкм) грамотрицательные кокко-бактериальные или более удлиненные формы. Они неподвижны, спор не имеют, в определенных условиях образуют видимую капсулу.

Большое значение для быстрой идентификации бруцелл имеет постановка реакции агглютинации со специфической агглютинирующей сывороткой на стекле и определение чувствительности к специфическому бактериофагу.

Все виды бруцелл не ферментируют углеводы. Их дифференцируют по образованию  $\text{H}_2\text{S}$ , чувствительности к  $\text{CO}_2$ , действию анилиновых красок (основного фуксина и тионина) и другим признакам.

**Серологическая диагностика.** Наиболее распространенным методом в лабораторной диагностике бруцеллеза является серологическое исследование. Чаще всего используют реакцию агглютинации Райта с бруцеллезным диагностикумом, которая ставится по типу реакции Видаля (см. с. 188). Реакция достаточно специфична. Положительные результаты отмечают спустя 1—2 нед после начала заболевания и сохраняют-



ся многие годы. Диагностический титр реакции равен 1 : 200. Наличие агглютинации при разведении сыворотки 1 : 50 считается сомнительным результатом.

Для ускоренной серодиагностики применяется реакция агглютинации Хеддльсона, которая ставится с неразведенной сывороткой больного и с концентрированным антигеном-диагностикумом, окрашенным синькой. Обезжиренное квадратное стекло размером 9×12 см делят на 5 квадратов, в которые микропипеткой наносят ингредиенты (табл. 21). Капли смешивают палочкой, начиная с минимальной дозы сыворотки. Стекло осторожно подогревают над пламенем до 37°C в течение 2 мин. При положительной реакции в первые минуты появляются ясные хлопья синего цвета. Реакция положительна при наличии агглютинации на ++.

Таблица 21

Постановка пластинчатой реакции агглютинации Хеддльсона

Ингредиенты, мл	Квадраты				
	1-й	2-й	3-й	4-й	5-й
Сыворотка	0,04	0,02	0,01	0,02	—
Диагностикум	0,03	0,03	0,03	—	0,03
Изотонический раствор хлорида натрия	—	—	—	0,03	0,03

Кроме того, для серодиагностики бруцеллеза используют РПГА, реакцию иммунофлюоресценции, РСК, опсоно-фагоцитарную реакцию, определение неполных антител и др. В поздние периоды заболевания процент положительных серологических реакций (агглютинации, РПГА и РСК) начинает снижаться и большее диагностическое значение приобретают кожно-аллергическая проба и реакция Кумбса.

**Биологическая проба** применяется для выделения чистой культуры из материала, загрязненного посторонней микрофлорой или содержащего небольшое количество бруцелл. Материал вводят морским свинкам или белым мышам подкожно в паховую область.

**Кожно-аллергическая проба (реакция Бюрне).** На ладонной поверхности предплечья внутрикожно вводят 0,1 мл бруцеллина. При наличии аллергии через 6—8 ч появляется гиперемия кожи и болезненная отечность (см. рис. 55).

Реакция специфична и появляется не только у больных и переболевших, но и у вакцинированных людей, в связи с чем ее диагностическая оценка должна производиться с осторожностью.

### Микробиологическая диагностика сибирской язвы

Возбудитель сибирской язвы — аэробная спорообразующая палочка *Bac. anthracis* относится к семейству *Bacillaceae*, роду *Bacillus*. Она вызывает заболевание у людей и животных. Споры *Bac. anthracis* могут сохраняться в почве в течение многих лет.

Наиболее достоверным методом микробиологической диагностики сибирской язвы является выделение и идентификация культуры возбудителя. Диагностическую ценность представляют также реакция термореципитации по Асколи и кожно-аллергическая проба (схема 10).

### Методические указания

**Бактериоскопическое исследование.** Первичная бактериоскопия дает возможность обнаружить сибиреязвенную палочку в патологическом материале и поставить ориентировочный диагноз. *Bac. anthracis* имеет характерную морфологию. Она представляет собой грамположительную, крупную (1—2 × 6—10 мкм), неподвижную стрептобациллу. Капсулу образует в организме и на белковой питательной среде (см. рис. 19, 73).

**Бактериологическое исследование.** Материал от больного засевают на чашку с мясо-пептонным агаром и чашку с кровяным агаром и в пробирку с мясо-пептонным бульоном.

В бульоне культура *Bac. anthracis* растет в виде хлопьевидного осадка; на агаре вирулентные штаммы образуют колонии в R-форме, имеющие под малым увеличением микроскопа вид «львиной гривы» или «голова медузы». Авирулентные или слабовирулентные бактерии образуют S-формы колоний. Сибиреязвенная палочка обладает сахаролитическими свойствами, не гемолизует эритроциты, медленно разжижает желатину (рост в виде елочки верхушкой вниз). Широкое распространение для идентификации сибиреязвенных бацилл нашла пенициллиновая проба, позволяющая обнаружить шары — «жемчужины», которые представляют собой сферопласты, образовавшиеся из стрептобацилл под действием пенициллина.



**Биологическая проба.** Исследуемый материал вводят подкожно лабораторным животным (белым мышам, морским свинкам или кроликам) одновременно с посевом на питательные среды. Животные находятся под наблюдением в течение 10 дней. Павших животных вскрывают, приготавливают мазки из крови и внутренних органов и делают посевы для выделения чистой культуры возбудителя.

Для выявления капсульных палочек в экссудате используют метод иммунофлюоресценции. Мазки из экссудата через 5—18 ч после заражения обрабатывают капсульной сибиреязвенной антисывороткой и флюоресцирующей антикроличьей сывороткой, меченной родамином. В препаратах, содержащих микробные клетки с капсулой, наблюдается характерное свечение возбудителя.

**Серологическое исследование.** Ставят реакцию термопреципитации по Асколл. Антиген (испытуемый термоэкстракт) для реакции приготавливают из исследуемого материала (шерсти, кожи, кусочков органов), которые измельчают и кипятят в пробирке с изотоническим раствором хлорида натрия в течение 10—15 мин, после чего фильтруют до полной прозрачности. Контрольный термоэкстракт готовят из того же материала, взятого у здорового животного (табл. 22).

Т а б л и ц а 22

Постановка реакции термопреципитации

Ингредиенты, мл	Пробирки контрольные				
	1-я	2-я	3-я	4-я	5-я
Сибиреязвенная преципитирующая сыворотка	0,3	—	0,3	0,3	0,3
Нормальная кроличья сыворотка	—	0,3	—	—	—
Осторожно наклонять по стенке пробирки					
Испытуемый термоэкстракт	0,3	0,3	—	—	—
Стандартный сибиреязвенный антиген	—	—	0,3	—	—
Контрольный нормальный термоэкстракт	—	—	—	0,3	—
Изотонический раствор хлорида натрия	—	—	—	—	0,3
Результаты					

**Кожно-аллергическая проба.** На внутреннюю поверхность предплечья внутрикожно вводят 0,1 мл антракспа. При наличии аллергии через 24 ч появляется гиперемия и инфильтрация кожи.

### Диагностические, профилактические и лечебные препараты

**Бруцеллезный диагностикум.** Взвесь убитых бруцелл, окрашенных анилиновым красителем (метиленовым синим) в синий цвет. Применяется для серологической диагностики бруцеллеза при постановки реакции агглютинации Райта и Хеддльсона.

**Туляреминый диагностикум.** Взвесь убитых бактерий туляремии. Применяется с диагностической целью для постановки реакции агглютинации.

**Преципитирующая сибирязвенная сыворотка.** Получена из крови кроликов, гипериммунизированных культурой сибирязвенных *бацилл*. Применяется с диагностической целью в реакции термопреципитации по Асколи для обнаружения сибирязвенного антигена в исследуемом материале.

**Чумной бактериофаг** применяется для идентификации возбудителя.

**Сибирязвенный бактериофаг** применяется с диагностической целью при дифференцировании возбудителя.

**Бруцеллин.** Фильтрат 3-недельных убитых нагреванием бульонных культур *Br. melitensis*, *Br. abortus* и *Br. suis*. Применяется для постановки кожно-аллергической пробы Бюрне.

**Тулярин.** Взвесь туляреминых бактерий (вакцинного штамма), убитых нагреванием. Применяется для постановки кожно-аллергической пробы.

**Антраксин.** Белково-полисахаридно-нуклеиновый комплекс, извлекаемый при гидролизе из сибирязвенных *бацилл*. Применяется для постановки кожно-аллергической пробы.

**Чумная живая сухая вакцина.** Высушенная живая культура чумных бактерий вакцинного штамма EV. Применяется для активной профилактики.

**Туляреминая живая сухая накожная вакцина.** Высушенная живая культура вакцинного штамма туляреминых бактерий. Применяется для активной специфической профилактики туляремии.

**Накожная сухая живая бруцеллезная профилактическая вакцина.** Взвесь вакцинного штамма *Br. abortus*. Применяется для активной специфической профилактики бруцеллеза.

**Бруцеллезная лечебная вакцина.** Взвесь убитых нагреванием бруцелл. Применяется с лечебной целью, способствует десенсибилизации организма при бруцеллезе.

**Сибиреязвенная живая сухая вакцина СТИ.** Названа в честь Санитарно-технического института, в котором она была впервые получена. Представляет собой высушенную взвесь живых спор вакцинного штамма сибиреязвенных бацилл. Применяется для активной иммунизации людей.

**Противосибиреязвенный глобулин.** Гамма-глобулиновая фракция сыворотки крови лошадей, гипериммунизированных живой сибиреязвенной вакциной и вирулентным штаммом возбудителя сибирской язвы. Применяется с профилактической и лечебной целью.

**Антибиотики:** стрептомицин, хлортетрациклин, окситетрациклин, левомицетин.

#### Контрольные вопросы

1. Какие заболевания относятся к зоонозным инфекциям? Пути их распространения.
2. Основные биологические признаки чумных бактерий. Дайте характеристику токсину, образуемому бактериями чумы.
3. Как происходит заражение чумой? Эпидемиологические и патогенетические особенности и характер иммунитета при чуме.
4. Бактериологическая диагностика чумы. На основании каких тестов идентифицируют культуру чумных бактерий?
5. В каких случаях возникает необходимость дифференцировать возбудителя чумы от возбудителя псевдотуберкулеза грызунов? Какие тесты используют для этого?
6. Как и с какой целью проводится биопроба при чуме и в чем ее преимущества по сравнению с другими методами?
7. Экспресс-диагностика чумы.
8. Какие методы используются для неспецифической профилактики чумы?
9. Препараты, применяемые для химиотерапии, специфической профилактики и лечения чумы.
10. Основные признаки бактерий туляремии.
11. Как происходит заражение туляремией? Патогенетические особенности и характер иммунитета при туляремии.
12. Какие методы используются для микробиологической диагностики туляремии у людей? Их общая характеристика и сравнительная оценка.
13. Как ставится и оценивается аллергическая проба при туляремии? Можно ли ее использовать при ранней диагностике заболевания?
14. Препараты, используемые для лечения и специфической профилактики туляремии.
15. Классификация бруцелл и их роль в патологии человека.
16. Основные биологические признаки бруцелл.
17. Патогенетические особенности и характер иммунитета при бруцеллезе.
18. Источники заражения и основные пути распространения бруцеллезной инфекции.



19. Препараты, используемые для химиотерапии, специфической терапии и профилактики бруцеллеза.

20. Биологические признаки *Бацилл сибирской язвы*. С какими свойствами связывают их патогенность?

21. Какие микроорганизмы относятся к антракоидам и их отличие от сибиреязвенных *бацилл*?

22. Как происходит заражение сибирской язвой? Патогенетические особенности и характер иммунитета при сибирской *язве*.

23. Методы лабораторной диагностики сибирской *язвы*.

24. Какая серологическая реакция применяется для обнаружения сибиреязвенного антигена? Как ставится эта реакция?

25. Какой препарат используется для специфической профилактики сибирской *язвы*? Его получение и характеристика.

## Тема 19. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Возбудителями кишечных инфекций у людей являются кишечные бактерии (энтеробактерии) — представители семейства *Enterobacteriaceae*. К ним относятся энтеропатогенные кишечные палочки (эшерихии), шигеллы, сальмонеллы, протей и другие, вызывающие различные по своему патогенезу и клинической картине инфекционные заболевания. Энтеробактерии являются обитателями кишечника и с фекалиями выделяются во внешнюю среду. Они представляют собой небольшие ( $0,5-0,8 \times 1,5-3$  мкм) грамотрицательные палочки, не образующие спор и выраженных капсул, которые хорошо растут на мясо-пептонных средах. Бактерии этого семейства отличаются по наличию жгутиков, биохимическим свойствам, антигенной структуре и ряду других признаков.

### Программа трех занятий

1. Изучение схем микробиологической диагностики колэнтеритов, пищевых отравлений, дизентерии, брюшного тифа, паратифозной инфекции.

2. Бактериологическая и серологическая диагностика кишечных инфекций.

3. Диагностические, профилактические и лечебные препараты, применяемые при кишечных инфекциях.

### Демонстрация

1. Мазки, приготовленные из чистых культур возбудителей кишечных инфекций: *E. coli*, *Sh. flexneri*, *Sh. sonnei*, *S. typhi*, *S. paratyphi A*, *S. schottmulleri*.

2. «Пестрые» ряды *E. coli*, *Sh. flexneri*, *Sh. sonnei*, *S. typhi*, *S. paratyphi A*, *S. schottmuelleri*.

3. Рост возбудителей кишечных инфекций на дифференциально-диагностических питательных средах: Эндо, Плоскирева, висмут-сульфитной среде и др.

4. Основные этапы бактериологического исследования при пищевых токсикоинфекциях, вызванных сальмонеллами и другими энтеробактериями.

5. Агглютинирующие сальмонеллезные, дизентерийные и ОВ-колизыворотки, брюшнотифозные монодиагностикумы, химическая поливакцина, спиртовая дизентерийная вакцина, поливалентные брюшнотифозный, сальмонеллезный, дизентерийный и коли-протейный бактериофаги, антибиотики и химиотерапевтические препараты.

### Задание студентам для выполнения лабораторной работы

#### З а н я т и е 1-е

1. Бактериологическая диагностика колиэнтерита. Материал для исследования — фекалии больного ребенка. 1-й этап: посеять фекалии на чашки со средой Эндо.

2. Бактериологическая диагностика дизентерии. Материал для исследования — фекалии больного. 1-й этап: посеять фекалии на чашки со средой Плоскирева.

3. Бактериологическая диагностика брюшного тифа. А. Выделение гемокультуры. Материал для исследования — кровь больного. 1-й этап: исследовать ранее полученную гемокультуру на среде Раппопорта: а) отметить характер роста, наличие или отсутствие газообразования; б) приготовить мазки, окрасить по Граму и микроскопировать; в) сделать пересевы в пробирку со средой Ресселя и на чашки со средой Эндо.

Б. Выделение копрокультуры. Материал для исследования — фекалии больного. 1-й этап: посеять фекалии в пробирку со средой Мюллера или с селенитовой средой и на чашки со средой Эндо.

Наметить план 2-го этапа бактериологического исследования при колиэнтерите, дизентерии и брюшном тифе.

#### З а н я т и е 2-е

1. Продолжение бактериологической диагностики колиэнтерита. 2-й этап: а) описать колонии, выросшие на среде Эндо; б) приготовить мазки, окрасить по Граму и микроскопировать; в) провести серологическую идентификацию выросших на среде Эндо колоний в реакции агглютинации на стекле с ОВ-агглютинирующими сыворотками.

Сделать заключение по проведенным исследованиям и наметить ход дальнейшего исследования для установления серотипа выделенной культуры.

2. Продолжение бактериологической диагностики дизентерии. 2-й этап: а) описать колонии, выросшие на среде Плоскирева; б) сделать пересев подозрительной (бесцветной) колонии со среды Плоскирева на среду Ресселя.

3. Продолжение бактериологической диагностики брюшного тифа. А. Выделение гемокультуры. 2-й этап: а) отметить характер роста гемокультуры на среде Ресселя и на чашке со средой Эндо; б) провести серологическую идентификацию выделенной на среде Ресселя гемокультуры в реакции агглютинации с агглютинирующими сыворотками. Сделать заключение по проведенным исследованиям.

Б. Выделение копрокультуры. 2-й этап: а) отметить характер роста на среде Эндо и Мюллера; б) пересеять подозрительную (бесцветную) колонию со среды Эндо в пробирку со средой Ресселя.

4. Серодиагностика брюшного тифа. Учесть результаты реакции Видала. На основании полученных данных поставить серологический диагноз и в положительном случае определить период заболевания брюшным тифом.

### З а н я т и е 3-е

1. Окончание бактериологической диагностики дизентерии. 3-й этап: а) отметить характер роста на среде Ресселя; б) провести серологическую идентификацию копрокультуры, выделенной на среде Ресселя, в реакции агглютинации на стекле с агглютинирующими сыворотками. Сделать окончательное заключение.

2. Окончание бактериологического исследования копрокультуры при брюшном тифе.

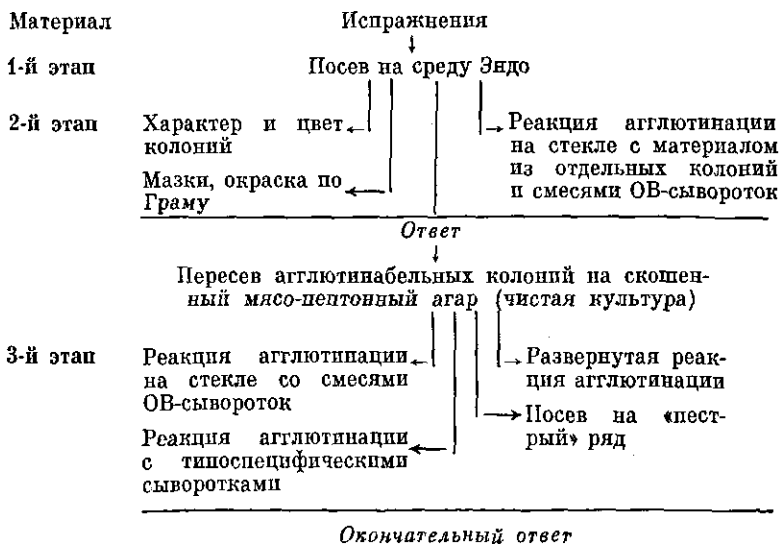
3-й этап: а) отметить характер роста на среде Ресселя; б) провести серологическую идентификацию копрокультуры, выделенной на среде Ресселя, в реакции агглютинации на стекле с агглютинирующими сыворотками. Сделать окончательное заключение.

### Микробиологическая диагностика колиэнтеритов и дизентериеподобных заболеваний

Колиэнтериты — острые кишечные заболевания детей раннего возраста, возбудителями которых являются эшерихии разных серогрупп (O26, O55, O111 и др.), отличающиеся друг

### С х е м а 11

#### Схема бактериологического исследования при колиэнтеритах и дизентериеподобных заболеваниях



от друга по своей антигенной структуре. Дизентериеподобные заболевания детей и взрослых вызываются эшерихиями, принадлежащими к другим серогруппам (O25, O112, O124 и др.).

Микробиологическая диагностика указанных инфекций производится исключительно с помощью бактериологического исследования (схема 11). Бактериоскопический и серологический методы не нашли при этих заболеваниях практического применения.

### Методические указания

**Бактериологическое исследование.** Испражнения ребенка засевают на чашки со средой Эндо, которые инкубируют при 37°C до следующего дня.

На второй день снимают петлей часть выросшей красной колонии кишечной палочки и ставят реакцию агглютинации на стекле со смесью ОВ-сывороток, содержащих антитела против наиболее распространенных серологических (антигенных) групп эшерихиопатогенных кишечных палочек. Так проверяют на агглютинабельность не менее 10 колоний с каждой чашки. При положительном результате ставят реакцию агглютинации с типовыми сыворотками (O26 : B6, O55 : B5, O111 : B4, O124 : B17 и др.) и дают предварительный ответ. Затем пересевают несколько агглютинабельных колоний на скошенный мясо-пептонный агар для получения чистых культур.

На 3-й день проверяют агглютинабельность чистых культур в реакции агглютинации на стекле со смесью ОВ-сывороток, а затем с отдельными ОВ-сыворотками. При положительном результате ставят развернутую реакцию агглютинации в пробирках с соответствующей ОВ-сывороткой. Для этого приготавливают два ряда разведений агглютинирующей ОВ-сыворотки. В пробирки 1-го ряда вносят живую исследуемую культуру *E. coli*, 2-го ряда — эту же культуру, предварительно прокипяченную на водяной бане в течение 2 ч. Использование в качестве антигена убитых нагреванием бактерий связано с наличием у живых К-антигена, который часто препятствует проявлению О-агглютинабельности.

### Микробиологическая диагностика дизентерии

Возбудителями бактериальной дизентерии является группа родственных микроорганизмов, относящихся к роду *Shigella*. Современная классификация шигелл представлена в табл. 23.

Советская и международная классификация  
бактерий рода *Shigella*

Под- группа	Вид	Серотип	Подтипы	Название видов и под- видов по советской клас- сификации 1962 г.
A	<i>Sh. dysenteriae</i>	1-й		<i>Sh. grigoriewashigae</i> (Григорьева — Шига)
		2-й		<i>Sh. stutzerischmitzii</i> (Штутцера — Шмит- ца)
		3—10-й	-	<i>Sh. large-sachsii</i> (Ларджа — Сакса)
B	<i>Sh. flexneri</i>	1-й	1a, 1b	<i>Sh. flexneri</i> (Флекснера)
		2-й	2a, 2b	
		3-й	3a, 3b, 3c	
		4-й	4a, 4b	
		5-й		
		6-й		<i>Sh. newcastle</i> (Ньюкастл)
C	<i>Sh. boydii</i>	1—15-й		<i>Sh. boydi</i> (Бойда)
D	<i>Sh. sonnei</i>			<i>Sh. sonnei</i> (Зонне)

Микробиологическая диагностика дизентерии проводится главным образом бактериологическим методом (схема 12).

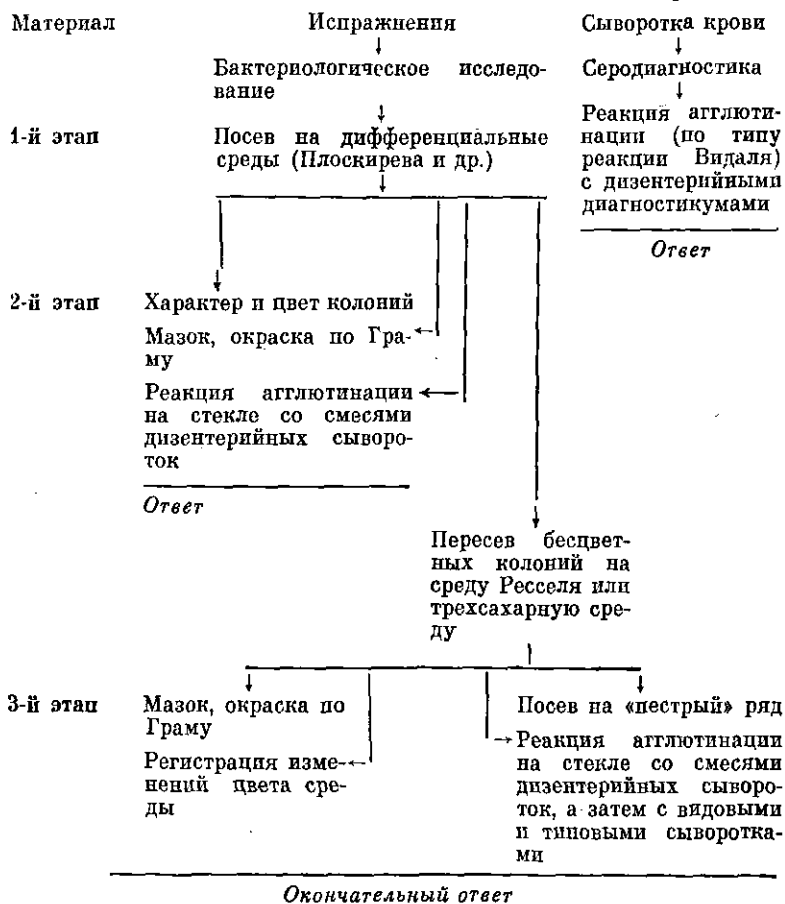
## Методические указания

**Бактериологическое исследование.** При наличии гнойных или слизисто-кровянистых комочков в исследуемых испражнениях выбирают петлей эти комочки слизи, промывают в 2—3 пробирках с изотоническим раствором хлорида натрия, после чего наносят на поверхность дифференциально-диагностической среды Плоскирева в чашку Петри и тщательно растирают шпателем (рис. 74).

На 2-й день отбирают прозрачные бесцветные колонии и пересевают одну из них на среду Ресселя или на короткий «пестрый» ряд с лактозой и глюкозой. Оставшуюся часть колонии используют для постановки ориентировочной реакции агглютинации на стекле со смесью сывороток Флекснера и

## Схема 12

### Схема микробиологического исследования при дизентерии



Зонне и смесью сывороток против сальмонелл для исключения брюшного тифа или сальмонеллеза. Окончательное заключение дают на 4-й день по результатам изучения ферментативных свойств и реакции агглютинации. При обнаружении шигелл Флекснера или Бойда обязательно устанавливают серотип в реакции агглютинации с типовыми адсорбированными сыворотками. Ферментативные свойства дизентерийных бактерий определяют на длинном «пестром» ряде (табл. 24).

## Ферментативные и агглютинабельные свойства шигелл

Виды шигелл	Ферментация												Образование				Агглютинация с сыворотками				
	лактозы	глюкозы	маннита	мальтозы	сахарозы	рапнозы	ксилиты	сорбита	дульцита	арабинозы	мочевины	Н <sub>2</sub> S	индола	каталазы	Шига	Штуцера	Флекнера	Ньюкаста	Бойда	Зонне	
Григорьева — Шига	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—
Штуцера — Шмитца	—	+	—	—	—	+/—	—	+	+	+	—	+	+	+/—	—	+	—	—	—	—	—
Флекнера	—	+	+	+/—	+	—	+/—	—	+	+	—	+/—	+	+	+	+	+	+	—	—	—
Ньюкастл	—	+	+/—	—	—	—	+	+	+	+	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—
Бойда	—	+	+	+/—	—	—	+/—	+/—	+	+	—	+/—	+	+	—	—	—	—	+	—	—
Зонне	(+)	+	+	+/—	(+)	+/—	+/—	+	+	+	—	—	+	+	—	+/—	—	—	—	—	+

Обозначения: + положительная реакция; — отрицательная реакция; (+) позитивная реакция, наступающая не ранее 2—3-го дня; +/— большое число штаммов дают положительную реакцию, меньшее число штаммов — отрицательную.

Колициногенотипирование. Шигеллы Зонне содержат разные типы колициногенных факторов, которые обнаруживаются с помощью специального набора индикаторных штаммов. Колициногенотипирование дает достаточно стабильные результаты и может быть использовано для эпидемиологических целей.

Серологическая диагностика применяется для ретроспективного обоснования диагноза дизентерии при стертых формах, а также для уточнения вида возбудителя. Ставят реакцию агглютинации по типу реакции Видаля (с. 188).

Диагностическим титром при дизентерии, вызванной шигеллами Флекспера, считают разведение 1 : 200, а шигеллами Зонне и Ньюкастл— 1 : 100.

### Микробиологическая диагностика брюшного тифа и паратифов

Брюшной тиф и паратифы вызываются бактериями рода *Salmonella*, которые относятся по своей антигенной структуре к серогруппам А, В и D.

Микробиологическая диагностика тифо-паратифозных заболеваний производится путем бактериологического и серологического исследований. Бактериоскопия первичного материала не нашла практического применения, так как в мазках из испражнений невозможно отличить сальмонеллы от кишечной палочки, а в другом материале (крови, желчи и т. д.) возбудителей слишком мало, чтобы их можно было обнаружить при микроскопии мазков.

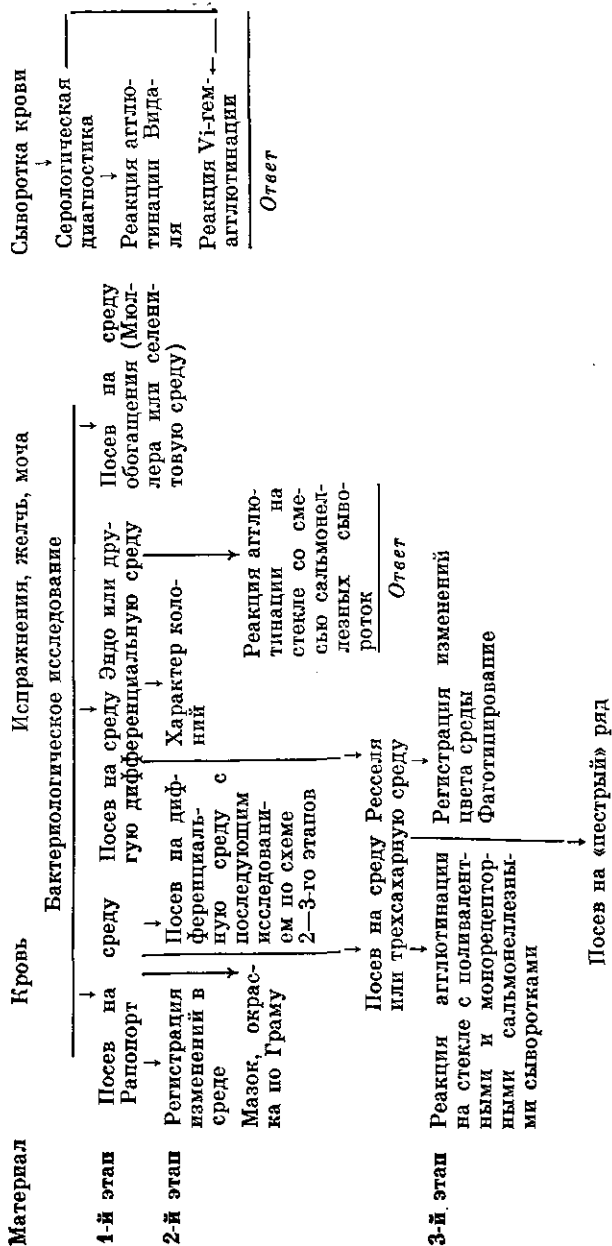
Вследствие особенностей патогенеза брюшного тифа на 1-й неделе заболевания, в период бактериемии, возбудителя выделяют из крови (получение гемокультуры); со 2-й недели заболевания — из испражнений (получение копрокультуры), мочи или желчи. Антитела в сыворотке накапливаются при брюшном тифе в конце 1-й недели заболевания (схема 13).

### Методические указания

**Бактериологическое исследование. Получение гемокультуры.** В 1-й день у больного из локтевой вены шприцем берут 5—10 мл крови и у постели больного вносят ее в колбу с 50—100 мл среды Рапопорт. Указанные соотношения крови и среды необходимы для подавления бактерицидного действия белков крови. Посевы инкубируют при 37°C в течение 18—20 ч.



Схема бактериологического и серологического исследования при брюшном тифе и паратифах



Окончательный ответ

На 2-й день при росте тифозных бактерий наблюдается помутнение и изменение цвета среды. При росте паратифозных бактерий наряду с указанными изменениями появляются пузырьки газа в поплавке. Для ускорения ответа из среды Рапопорт делают мазки и препараты «висячая» капля. При наличии чистой культуры грамотрицательных подвижных палочек и изменения цвета среды (или наличия газа) дают первый предварительный ответ.

Затем культуру из среды Рапопорт пересевают в пробирку со средой Ресселя или на скошенный мясо-пептонный агар, полагая при этом, что из крови выделена чистая культура и можно сразу приступить к ее идентификации. Одновременно со среды Рапопорт делают посевы на среду Эндо для получения изолированных колоний с целью проверки чистоты выросшей культуры.

Состав среды Ресселя: мясо-пептонный агар, 1% лактозы, 0,1% глюкозы и индикатор Андрее. Среду готовят в пробирках таким образом, чтобы внизу она была в виде столбика, а верхняя часть имела скошенную поверхность. Посев исследуемой культуры делают уколом в столбик и на поверхность среды. При ферментации углеводов происходит покраснение среды; разрывы столбика свидетельствуют о газообразовании. Покраснение всей среды наблюдается при ферментации лактозы, покраснение только столбика — при ферментации глюкозы, так как содержание ее в среде значительно меньше, чем лактозы.

Наряду со средой Ресселя в настоящее время при диагностике кишечных инфекций получила распространение трехсахарная среда (в ее состав входит глюкоза, лактоза, сахароза, мочевины, некоторые соли и индикатор — феноловый красный).

На 3-й день отмечают ферментацию глюкозы на среде Ресселя и ставят ориентировочную реакцию агглютинации на стекле. На основании полученных данных дают второй предварительный ответ.

Для дальнейшего исследования отбирают несколько бесцветных колоний со среды Эндо и пересевают их в среду Ресселя или скошенный мясо-пептонный агар (для контроля полученных результатов). Чистую культуру, выросшую на среде Ресселя или скошенном мясо-пептонном агаре, пересевают на среды «пестрого» ряда и используют для постановки реакции агглютинации на стекле со смесью групповых сывороток, адсорбированными О- и моворцепторными Н-сальмонеллезными сыворотками.

## Биохимические свойства тифо-паратифозных бактерий

Бактерии	Ферментация углеводов					Образование			Действие на лакмусовое молоко
	лактозы	глюкозы	мальтозы	сахарозы	маннита	H <sub>2</sub> S	NH <sub>3</sub>	индола	
<i>S. typhi</i>	—	К	К	—	К	+	—	—	Кислая реакция
<i>S. paratyphi A</i>	—	КГ	КГ	—	КГ	—	—	—	То же
<i>S. schottmuelleri</i>	—	КГ	КГ	—	КГ	+	+	—	Щелочная реакция

Обозначения: К — образование кислоты (без газа); КГ — образование кислоты и газа.

Окончательный диагноз устанавливают на основании данных «пестрого» ряда (табл. 25) и реакции агглютинации.

По способности разлагать ксилосу и арабинозу культуры бактерий брюшного тифа могут быть разделены на три ферментативных типа: 1 — ксилосоположительные, арабинозоотрицательные, 2 — ксилозоотрицательные, арабинозоотрицательные, 3 — ксилосоположительные, арабинозоположительные. Определение ксилосно-арабинозного признака может быть использовано для маркирования бактерий в эпидемиологических целях.

**Фаготипирование.** С помощью набора стандартных Vi-фагов определяют до 78 фаготипов *S. typhi*. При этом необходимым условием является наличие в культуре Vi-антигена. Культуры *S. schottmuelleri* дифференцируются на 11 фаготипов и подтипов.

**Получение конрокультуры.** Испражнения сеют на одну из дифференциально-диагностических сред (Эндо или Левина).

Для посева петлю кала вносят в пробирку с изотоническим раствором хлорида натрия и готовят суспензию. После оседания крупных комочков петлю тонкой суспензии наносят на поверхность агаровой среды на одну половину чашки. Материал тщательно растирают шпателем по одной, а затем по другой половине чашки для получения изолированных колоний. Посевы инкубируют при 37°C в течение 18—20 ч. Одновременно испражнения сеют на среду обогащения Мюллера или селенитовую среду. На этих средах удается получить рост возбудителя даже в том случае, когда он в незначительном

количестве содержится в исследуемом материале. Посевы инкубируют при 37°C в течение 18—20 ч.

Среда Мюллера содержит 4,5 г химически чистого мела, 90 мл мясо-пептонного бульона, 2 мл раствора Люголя и 10 мл 50% раствора гипосульфита натрия. Среду разливают по 8—10 мл в пробирки. При взаимодействии йода и гипосульфита образуется тетраионат натрия, подавляющий рост кишечной палочки, но не препятствующий росту сальмонелл.

Селенитовая среда готовится из основного раствора, который содержит 0,5% пептона, 0,7%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,3%  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,4% лактозы и дистиллированную воду. К 50 мл стерильной основной среды добавляют ex tempore 2 мл 10% раствора кислого селенистокислого натрия ( $\text{NaHSeO}_3$ ) и разливают приготовленную среду по 5—7 мл в пробирки. Селенистокислый натрий стимулирует рост сальмонелл и подавляет сопутствующую флору.

На 2-й день изучают характер колоний, выросших на чашках, пересевают 2—3 бесцветные колонии на среду Ресселя и в пробирки со скопленным мясо-пептонным агаром. При отсутствии подозрительных колоний на чашках делают высевы из среды Мюллера или селенитовой среды на чашки со средой Эндо для получения изолированных колоний тифозных или паратифозных бактерий. Для ускорения ответа ставят ориентировочную реакцию агглютинации на стекле с материалом, взятым из бесцветной колонии.

Далее поступают так же, как и при идентификации гемокультуры.

**Серологическая диагностика.** В лабораторной практике широко применяется реакция агглютинации Видаля. Она основана на выявлении в сыворотке крови людей агглютининов, которые появляются в конце 1-й — начале 2-й недели заболевания, и на изучении динамики нарастания и длительности сохранения антител.

Реакция ставится одновременно с несколькими антигенами — О- и Н-брюшнотифозными, А- и В-паратифозными диагностикумами. Брюшнотифозные монодиагностикумы применяются для установления периода болезни, так как содержание О- и Н-антител в разные периоды болезни неодинаковое. О-антитела накапливаются в разгар заболевания и исчезают к моменту выздоровления. Н-антитела появляются к концу заболевания и сохраняются у переболевших в течение длительного времени.

У людей, вакцинированных против брюшного тифа и паратифов, также наблюдается положительная реакция Видаля, причем в довольно высоком титре, поэтому «инфекционный Видаль» удается отличить от «прививочного» только по

нарастанию титра агглютининов у больных в процессе болезни.

Реакцию Видаля ставят в четырех рядах пробирок по 7 пробирок в каждом ряду, из которых 5 опытных и 2 контрольных. Техника приготовления разведений сыворотки изложена на с. 127 в табл. 13. Для контроля каждого диагностикума в пробирки вносят по 1 мл изотонического раствора хлорида натрия, в который добавляют 2—3 капли диагностикума. В контрольной пробирке с 1 мл сыворотки (без диагностикума) не должно быть хлопьев. При спонтанной агглютинации реакция не учитывается. Диагностический титр реакции Видаля равен 1 : 200.

Для серологического обследования реконвалесцентов и выявления бактерионосителей широко используют реакцию пассивной Vi-гемагглютинации, с помощью которой определяют Vi-антитела в сыворотке крови людей. В качестве антигена используют эритроцитарный Vi-диагностикум, который представляет собой взвесь эритроцитов человека I (0) группы, обработанных формалином и сенсибилизированных Vi-антигеном брюшнотифозных микробов. Испытуемую сыворотку разводят от 1 : 10 до 1 : 1280. При положительной реакции эритроциты покрывают дно пробирки в виде диска с зазубренными краями, а надосадочная жидкость остается прозрачной. При отрицательной реакции так же, как и в контроле, эритроциты осаждаются на дне пробирки и имеют вид диска с ровными краями («пуговки»). Диагностическое значение имеет титр пассивной Vi-гемагглютинации начиная с 1 : 40 и выше. Всех лиц, сыворотки которых дают положительный результат в РПГА с эритроцитарным Vi-антигеном, рассматривают как подозрительных на носительство брюшнотифозных бактерий и подвергают многократному бактериологическому обследованию.

### Микробиологическая диагностика пищевых отравлений бактериальной природы

К пищевым отравлениям относятся токсикоинфекции, патогенез и клиническая картина которых определяются наличием в желудочно-кишечном тракте больного большого количества соответствующих бактерий, внесенных с зараженной пищей. После массового разрушения бактериальных клеток освобождается значительное количество эндотоксина, вызывающего отравление организма. Наиболее распространенными возбудителями пищевых токсикоинфекций являются сальмо-

неллы — *S. typhimurium*, *S. cholerae suis*, *S. enteritidis*, *S. heidelberg*, *S. anatum*, *S. derby* и др., реже встречаются *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *Proteus morgani* и др.

При пищевых токсикоинфекциях освобождение желудочно-кишечного тракта от возбудителя происходит довольно быстро, иногда через несколько часов после заболевания. Бактериemia при этом, как правило, не развивается.

Особое значение среди пищевых отравлений имеют интоксикации, которые вызываются экзотоксинами *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus*, *Clostridium perfringens*. В этих случаях для развития болезни не требуется присутствия в организме самого возбудителя.

### Методические указания

Ход микробиологического исследования, проводимого при пищевых токсикоинфекциях, определяется видом микроба, подозреваемого в качестве возбудителя. Материал для исследования берется от больного (рвотные массы, промывные воды желудка, фекалии) и из остатков пищи, которая могла явиться возможным источником инфекции.

Бактериологическая диагностика пищевых токсикоинфекций, вызванных сальмонеллами, производится путем первичного посева материала на среды Эндо и Мюллера для выделения чистой культуры (см. схему 13).

Идентификацию чистой культуры проводят по биохимическим свойствам на «пестром» ряде, по антигенной структуре в реакции агглютинации с групповыми и монорецепторными диагностическими сыворотками (табл. 26), а также с учетом гибели белых мышей после перорального заражения.

Для доказательства этиологической роли *E. coli* при пищевой токсикоинфекции материал (рвотные массы, фекалии, остатки пищи) сеют на среду Эндо. Изолированные колонии идентифицируют по схеме 11. При этом большое значение придается одновременному выделению культур *E. coli* из остатков пищи и материала от больного.

Для доказательства этиологической роли бактерий рода *Proteus* первичный посев производят в конденсационную воду скошенного мясо-пептонного агара (по Шукевичу) для выявления ползучего роста — наиболее характерного признака культуры *Proteus*. Из выделенной культуры готовят препараты «висячая» кашля и мазок, который окрашивают по Граму. Бактерии рода *Proteus* являются очень подвижными грамтрицательными палочками, ферментирующими глюкозу

## Биохимические свойства и антигенная структура некоторых сальмонелл

Группа	Виды сальмонелл	Ферментация							Образование		Антигены			
		глюко-зны	лакто-зны	манни-та	исж-лозы	сахарозы	дубль-цига	раино-зны	индо-ла	H <sub>2</sub> S	сома-тич-ские —0	спец-фичес-кие	неспе-цифи-ческие	жгутиковые-Н
В	<i>S. typhimurium</i>	+	—	+	+/-	—	+	+/-	+	+	1,4 5,12	i	1,2	
	<i>S. derby</i>	+	—	+	+	—	+	+	+	+	1,4 12	f, g	—	
	<i>S. heidelberg</i>	+	—	+	+	-/+	+	+	+	+	4,5 12	r	1,2	
С	<i>S. cholerae suis</i>	+	—	+	+	—	+/-	+	-/+	-/+	6,7	c	1,5	
	<i>S. newport</i>	+	—	+	+	—	+	+	+	+	6,8	e, h	1,2	
Д	<i>S. enteritidis</i>	+	—	+	+	—	+/-	+	-/+	+	1,9 12	g, m	—	
Е	<i>S. anatum</i>	+	—	+	+	—	+	+	+	+	3,10	e, h	1,6	

Обозначения те же, что и в табл. 24.

и не разлагающими лактозу. Важным признаком является их способность ферментировать мочевины, в отличие от сальмонелл и шигелл, которые не обладают подобными свойствами. Выделенные культуры дифференцируют по биохимическим свойствам (табл. 27).

Таблица 27

Биохимические тесты для дифференцирования бактерий рода *Proteus*

Признак	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. morgani</i>	<i>P. rettgeri</i>
Ферментация мочевины	+	+	+	+
» маннита	—	—	—	+
» мальтозы	+	—	—	—
» ксилозы	+	+	—	—
Разжижение желатинны	+	+	—	—
Образование H <sub>2</sub> S	+	+	+	—
Ассимиляция цитрата натрия	—	—	—	+
Образование индола	+	—	+	+

Обозначения те же, что и в табл. 26.

При подозрении на этиологическую роль *Clostridium perfringens* в первую очередь в исследуемом материале определяют наличие токсина. Для этого его экстрагируют изотоническим раствором хлорида натрия, а затем центрифугируют и надосадочную жидкость вводят внутрибрюшинно белым мышам или внутрикожно морской свинке. Гибель животных в течение первых 3—4 ч или появление некроза на месте внутрикожных инъекций свидетельствует о наличии токсина. Для выяснения природы токсина ставят реакцию нейтрализации с антитоксическими сыворотками *Cl. perfringens*. Выделение культуры *Cl. perfringens* проводится редко. В этих случаях используют методы выделения анаэробных бактерий (см. схему 15).

Микробиологическая диагностика интоксикаций, вызванных стафилококковым энтеротоксином, описана на с. 150, а токсином ботулизма — на с. 208.

Диагностические, профилактические и лечебные препараты

Агглютинирующие ОВ-сыворотки против энтеропатогенных типов кишечной палочки: ОВ-коли-сыворотка О26, ОВ-коли-сыворотка О55 : В5, ОВ-коли-сыворотка О111 : В4 и др.



Получены путем гипериммунизации кроликов взвесью бактерий соответствующей серологической группы *E. coli*. Применяются для постановки реакции агглютинации с целью определения серологической группы эшерихий.

**Адсорбированные агглютинирующие сыворотки для идентификации шигелл.** Поливалентные: 1) Флекснера, Ньюкастл и Зонне, 2) Бойда, 3) Ларджа — Сакса, 4) провизорные. Видовые: Флекснера, Зонне, Бойда, Григорьева — Шиги и Штутцера — Шмитца. Типовые: Флекснера (рецепторы 1, 2, 3, 4, 5, 6), Бойда (1—15). Получены из крови кроликов, иммунизированных определенными видами шигелл, путем последовательной адсорбции антител. Применяются для серологической идентификации возбудителей дизентерии.

**Сальмонеллезные групповые, адсорбированные O- и монорецепторные H-агглютинирующие сыворотки.** Применяются для постановки реакции агглютинации для определения вида возбудителя при брюшном тифе и пищевых токсикоинфекциях.

**Брюшнотифозные O- и H-монодиагностикумы.** Взвеси брюшнотифозных бактерий, убитых нагреванием (O-диагностикумы) или обработкой формалином (H-диагностикумы). Применяются для серологической диагностики брюшного тифа (реакции Видаля).

**Наборы фагов для типирования энтеропатогенных эшерихий, шигелл и сальмонелл.**

**Химическая сорбированная тифо-паратифозно-столбнячная вакцина (ТАВте).** Состоит из полных антигенов, извлеченных из возбудителей брюшного тифа, паратифов А и В, а также столбнячного анатоксина, адсорбированных на геле гидроокиси алюминия. Применяется для специфической профилактики брюшного тифа и столбняка.

**Спиртовая дизентерийная вакцина.** Высушенная взвесь шигелл Зонне и Флекснера, убитых спиртом. Применяется для лечения затяжных и хронических форм дизентерии.

**Поливалентный брюшнотифозный сухой бактериофаг с кислотоустойчивым покрытием.** Применяется для специфической профилактики брюшного тифа.

**Бактериофаг сальмонеллезный групп А, В, С, D, Е жидкий.** Применяется для лечения больных сальмонеллезам, вызванными сальмонеллами соответствующих серологических групп, а также с профилактической целью по эпидемиологическим показаниям.

**Поливалентный дизентерийный бактериофаг сухой с кислотоустойчивым покрытием.** Активен в отношении возбу-

телей дизентерии Зонне, Флекснера, Ньюкастл. Применяется с профилактической целью и для лечения больших дизентерий.

**Коли-протейный бактериофаг жидкий.** Фильтраты фаголизатов наиболее распространенных серологических групп энтеропатогенных кишечных бактерий, *Pr. mirabilis* и *Pr. vulgaris*. Применяется для лечения и профилактики заболеваний, вызванных этими бактериями.

**Колибактерин** — сухой препарат, содержащий живые *E. coli* штамма М-17 с антагонистическими свойствами. Применяют при дисбактериозах и при лечении дизентерии.

**Бифидумбактерин** — высушенная взвесь живых *B. bifidum*, применяют для лечения дизентерии и хронических кишечных инфекций с невыясненной этиологией.

**Бификол** — препарат, состоящий из смеси живых бактерий *E. coli* штамма М17 и *B. bifidum*. Показания к применению те же.

**Антибиотики и химиотерапевтические препараты:** левомицетин, хлортетрациклин, окситетрациклин, сульфаниламиды и др.

#### Контрольные вопросы

1. Какие заболевания относятся к кишечным инфекциям? Особенности патогенеза и пути их распространения.
2. Современная классификация семейства *Enterobacteriaceae*.
3. Антигены энтеробактерий. Их химическая природа и локализация в бактериальных клетках.
4. Какие биохимические признаки используются для дифференцирования эшерихий, шигелл и сальмонелл?
5. Химическая структура О-антигена и эндотоксина энтеробактерий.
6. Элективные и дифференциально-диагностические питательные среды, применяемые при диагностике кишечных инфекций. Их состав и особенности применения.
7. Биологические признаки кишечной палочки. Ее экологические особенности и роль в патологии человека.
8. Свойства О-, К-, Н-антигенов эшерихий. По каким признакам дифференцируют условно патогенные эшерихии от энтеропатогенных?
9. Какие заболевания вызывают энтеропатогенные эшерихии?
10. Как проводится бактериологическая диагностика заболеваний, вызванных энтеропатогенными эшерихиями?
11. Какие серологические группы энтеропатогенных эшерихий встречаются при колиэнтеритах детей, дизентериеподобных и холероподобных заболеваниях?
12. Какой генетический фактор контролирует образование эшерихиями холероподобного энтеротоксина и каковы его свойства?
13. Почему свежeweделенные культуры энтеропатогенных эшерихий не агглютинируются специфическими антисыворотками? Что нужно сделать, чтобы преодолеть их О-инагглютинабельность?
14. Патогенетические особенности и характер иммунитета тифо-паратифозных заболеваний.

15. Какие основные биохимические признаки сальмонелл учитываются при их идентификации?

16. Какие принципы положены в основу классификации сальмонелл, предложенной Кауфманом и Уайтом?

17. Как проводится ранняя диагностика тифо-паратифозных заболеваний?

18. Диагностика тифо-паратифозных заболеваний на второй и третьей неделях болезни.

19. Серологические реакции, используемые для серодиагностики брюшного тифа, и техника их постановки.

20. Динамика антителообразования в разные периоды заболевания брюшным тифом. Можно ли с помощью реакции Видала определить период заболевания брюшным тифом, ранее перенесенную инфекцию и поствакцинальные серологические сдвиги?

21. Особенности бактерионосительства при брюшном тифе. Какие серологические реакции используются для подтверждения хронического бактерионосительства?

22. Как проводится фаготипирование сальмонелл? Практическое значение этого метода.

23. Назовите препараты, используемые для специфической профилактики, терапии и химиотерапии тифо-паратифозных заболеваний.

24. Современная международная классификация шигелл.

25. Патогенетические особенности и характер иммунитета при дизентерии.

26. Какие виды шигелл наиболее часто выделяются при дизентерии в настоящее время?

27. Антигены шигелл. Их химический состав и основные свойства.

28. Как проводится бактериологическая диагностика дизентерии?

29. В чем заключается колициногенотипирование дизентерийных бактерий и практическое значение этого метода?

30. Назовите энтеробактерий — возбудителей пищевых токсикоинфекций. В чем состоит отличие пищевых токсикоинфекций от интоксикаций? Источники и пути заражения.

31. Как проводится бактериологическая диагностика пищевых токсикоинфекций?

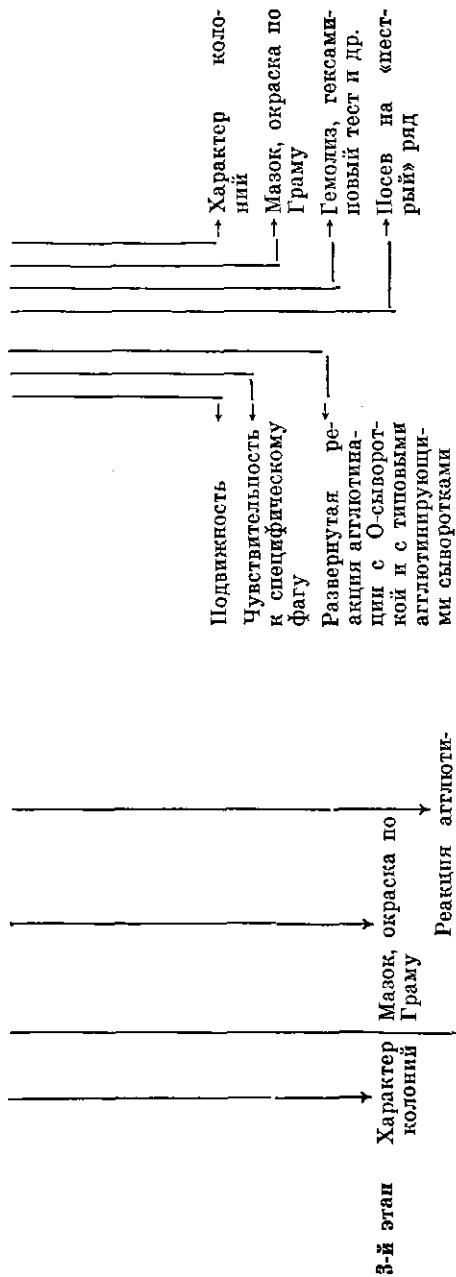
## Тема 20. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ХОЛЕРЫ

Возбудителями холеры являются холерный вибрион (*Vibrio cholerae*) и вибрион Эль-Тор (*Vibrio eltor*); они относятся к семейству *Vibrionaceae*.

Холера относится к острым инфекционным заболеваниям, характеризующимся общей интоксикацией и острым гастроэнтеритом. Весьма важным является правильная и быстрая лабораторная диагностика холеры, так как первые случаи заболевания требуют бактериологического подтверждения для своевременного принятия эффективных противоэпидемических мер.

Микробиологическая диагностика производится путем бактериоскопического и бактериологического исследований (схема 14). Трудности диагностики связаны с дифференциро-





Пересев на скошенный щелочной мясо-пептонный агар. Изучение выделенной чистой культуры по схеме 3—4-го этапа

ванием биотипов холерных вибрионов от сходных с ними холероподобных вибрионов (Мечникова, Финклера, Приора, светящихся вибрионов), широко распространенных в природе и не патогенных для человека.

### Программа занятия

1. Изучение схемы микробиологической диагностики холеры.
2. Бактериологическое исследование при холере.
3. Диагностические, профилактические и лечебные препараты, применяемые при холере.

### Демонстрация

1. Мазки, приготовленные из культуры холерного вибриона; окраска по Граму.
- 2. Реакция иммобилизации вибриона O-противохолерной сывороткой.
- 3. Тесты для дифференцирования холерных вибрионов.
4. Специальный патрон для забора и транспортировки материала при холере.
5. Противохолерная агглютинирующая сыворотка, холерный бактериофаг, холерная вакцина, холероген-анатоксин, антибиотики.

### Задание студентам для выполнения лабораторной работы

1. Бактериологическое исследование.  
Материал для исследования — испражнения больного с подозрением на холеру: а) микроскопировать готовые мазки из исследуемой культуры; б) определить подвижность культуры, выращенной на щелочной пептонной воде; в) отметить результаты развернутой реакции агглютинации с O-противохолерной сывороткой; г) отметить наличие или отсутствие роста исследуемой культуры на среде с полимиксином и результаты гексаминового теста. Дать заключение по проведенным исследованиям.

### Методические указания

**Бактериоскопическое исследование.** Из исследуемого материала (испражнения, рвотные массы) готовят мазки, которые окрашивают по Граму и водным фуксином. Кроме того, из нативного материала готовят препарат «висячая» капля, в котором определяют наличие подвижных вибрионов при обычной или фазово-контрастной микроскопии. Обнаружение в мазках большого количества грамотрицательных, слегка изогнутых палочек (размерами от 1,5 до 3 мкм в длину) и активно подвижных вибрионов в препарате «висячая» капля позволяет дать первый предварительный положительный ответ (рис. 75).

**Бактериологическое исследование.** Материал сеют на различные жидкие и плотные питательные среды, в частности во

флаконы со щелочной пептонной водой (1% пептонная вода, 0,5% NaCl, 0,01% KNO<sub>3</sub> и 0,2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; pH 9,0), на чашки со щелочным мясо-пептонным агаром. Посевы на пептонной воде инкубируют при 37°C в течение 5—6 ч, на чашках — 10—12 ч. Из пленки, образующейся на пептонной воде, или из поверхностного слоя делают мазки и препараты «раздавленная» и «висячая» капля. Этот же материал используется для постановки реакции агглютинации на стекле со специфической противохолерной О-сывороткой.

Часть пептонной воды переносят в пустую пробирку для постановки нитрозоиндоловой пробы. Для этого добавляют несколько капель серной кислоты. В положительном случае появляется розовое окрашивание вследствие образования нитрозоиндола (из индола и нитритов, которые образуются под влиянием холерного вибриона).

Независимо от результатов исследования делают пересев на вторую пептонную воду. Наличие грамтрицательных вибрионов, агглютинирующихся О-сывороткой, позволяет дать второй предварительный ответ.

Независимо от полученных результатов продолжают исследование, как это показано на схеме 14.

Выделение чистой культуры и ее идентификацию проводят по 5—6 однотипным колониям, выросшим на щелочном агаре. Для ускорения хода анализа ставят развернутую реакцию агглютинации с бактериальной суспензией, приготовленной из колоний. Для этого агглютинирующую О-сыворотку разводят в пробирках до титра пептонной водой (в объеме 0,5 мл). Затем в каждую пробирку вносят 1—2 капли суспензии.

Результат реакции агглютинации учитывают после 3—4-часовой инкубации при 37°C.

Окончательную идентификацию культуры проводят на основании определения чувствительности выделенных культур к холерному фагу, их гемолитических свойств, биохимической активности и агглютинабельности противохолерной О-сывороткой и типовыми агглютинирующими сыворотками Инаба и Огава и т. д. (табл. 28).

Таким образом, идентификацию культур, особенно впервые выделенных в данной местности, проводят в три этапа: 1) устанавливают их принадлежность к роду *Vibrio*; 2) дифференцируют их от холероподобных вибрионов в реакции агглютинации с О-сывороткой по чувствительности к специфическому фагу и другими тестами; 3) определяют видовые признаки культур (см. табл. 28).

Тесты для дифференциации холерных вибрионов

Тест	Классический холерный вибрион	Холерный вибрион Эль-Тор	Неагглютинирующиеся вибрионы
Агглютинация О-сывороткой	+	+	—
Агглютинация типовыми сыворотками Огава и Инаба	+	+	—
Лизис фагами:			
холерный фаг С (фаг IV)	+	—	±
фаг Эль-Тор II	—	+	±
Агглютинация куриных эритроцитов	—	+	±
Гемолиз эритроцитов барана	—	±	±
Рост на агаре с 50 ЕД полимиксина	—	+	±
Гексаминовый тест	—	+	±
Реакция Фогеса—Проскауэра (образование ацетилметилкарбинола)	—	+	±

Обозначения: + наличие признака; — отсутствие признака; ± признак непостоянный.

Окончательное заключение о выделении и дифференцировании холерных вибрионов дают через 36—48 ч на основании комплексного изучения основных биологических признаков возбудителя.

Трудности при оценке результатов бактериологического исследования встречаются при выделении атипичных холерных вибрионов и в первую очередь не агглютинирующихся холерной О-сывороткой (НАГ-вибрионов). НАГ-вибрионы могут лизироваться одним из специфических холерных фагов и обладать другими свойствами, сходными с холерными вибрионами.

**Ускоренные методы обнаружения холерных вибрионов.**  
 1. Иммунизация вибрионов холерными сыворотками и типовыми холерными фагами. Капли испражнений или материала с поверхности пептонной воды обрабатывают холерной О-сывороткой, типовыми сыворотками Огава и Инаба или типовыми холерными фагами. Приготавливают из них препараты «раздавленная» капля, которые исследуют в микроскопе, снабженном темнопольным фазово-контрастным устройством. В положительном случае через 3—5 мин наблюдают прекращение движения вибрионов.



2. Иммунофлюоресцентный метод. Препараты из исследуемого материала обрабатывают флюоресцирующей противохолерной сывороткой и исследуют в люминесцентном микроскопе. Положительным результатом считается обнаружение в препарате даже единичных вибрионов с ярким желто-зеленым свечением в виде блестящего ободка по периферии клетки. Положительный результат можно получить через 1—2 ч после начала исследования при концентрации вибрионов не менее  $10^6$  клеток/мл. Поэтому рекомендуется предварительное подращивание материала на питательных средах.

Кроме того, для ускоренного обнаружения возбудителя холеры применяются методы развернутой реакции агглютинации в бульоне, микроагглютинации нативного материала, подращивание вибрионов на мембранных фильтрах и др.

Серологическое исследование является вспомогательным и применяется для ретроспективной диагностики холеры, выявления вибрионосителей и оценки напряженности постинфекционного и поствакцинального иммунитета. Для этого обычно ставят реакцию агглютинации или РПГА, а также определяют вибриоцидные антитела в реакции лизиса *in vitro*.

### Диагностические, профилактические и лечебные препараты

Противохолерная агглютинирующая О-сыворотка, типовые сыворотки Огава и Инаба. Получены из крови кроликов, иммунизированных холерными вибрионами. Применяются для серологической идентификации и типирования холерных вибрионов в реакции агглютинации.

**Холерный фаг.** Типовые холерные фаги применяются для идентификации и типирования холерных вибрионов. Поливалентный холерный бактериофаг используется для лечебно-профилактических целей.

**Холерная вакцина.** Взвесь убитых холерных вибрионов. Применяется для активной иммунизации против холеры. Приготавливают из вибрионов Эль-Тор и классических холерных вибрионов серотипов Инаба и Огава.

**Холероген-анатоксин.** Взвесь убитых холерных вибрионов, выращенных на жидкой питательной среде. Препарат очищен от балластных веществ, выпускается в сухом виде. Применяется для специфической профилактики холеры.

**Антибиотики:** тетрациклин, морфоциклин, сигмамидин.

## Контрольные вопросы

1. Классификация возбудителей холеры.
2. Патогенетические особенности и характер иммунитета при холере.
3. Основные биологические свойства холерных вибрионов.
4. Какой материал исследуют для выделения возбудителя холеры? Особенности забора, консервации и транспортировки материала в лабораторию. В какие сроки лаборатория дает предварительный ответ и окончательное заключение?
5. На основании каких признаков свежевыделенную культуру бактерий относят к роду *Vibrio*?
6. Как определяют видовую и типовую принадлежность холерных и холероподобных вибрионов?
7. Какие методы используются для экспресс-диагностики холеры и выявления вибрионосительства?
8. Препараты, применяемые для профилактики и лечения холеры.

## Тема 21. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА АНАЭРОБНЫХ ИНФЕКЦИЙ (ГАЗОВОЙ ГАНГРЕНЫ, СТОЛБНЯКА, БОТУЛИЗМА)

Возбудители анаэробных инфекций относятся к семейству *Bacillaceae*, роду *Clostridium* и имеют ряд общих признаков. Все они являются обитателями кишечника людей и животных, с фекалиями попадают в почву, где могут сохраняться в виде спор в течение длительного времени. Представляют собой грамположительные палочки, продуцирующие экзотоксины, которые играют ведущую роль в патогенезе соответствующих заболеваний. Для своего роста эти микробы требуют анаэробных условий, хотя степень анаэробнозиса для каждого из них неодинакова.

Газовая гангрена и столбняк относятся к раневым инфекциям, поскольку эти заболевания связаны с ранениями, травмой и попаданием в рану земли. Ботулизм является пищевой интоксикацией, которая возникает при употреблении в пищу продуктов, содержащих токсины палочки ботулизма.

### Программа занятия

1. Изучение схем микробиологических исследований при анаэробных инфекциях и ботулизме.
2. Бактериологическая диагностика газовой гангрены, столбняка, ботулизма.
3. Экспресс-методы обнаружения перфрингенса- и ботулинического токсина.
4. Лечебно-профилактические препараты, применяемые при раневых инфекциях и ботулизме.

### Демонстрация

1. Мазки, приготовленные из культур *Cl. perfringens*, *Cl. tetani* и *Cl. botulinum*.

2. Аппаратура и питательные среды для культивирования клостридий.

3. «Пестрые» ряды для дифференцирования и идентификации возбудителей газовой гангрены.

4. Реакция пассивной гемагглютинации для обнаружения ботулинического токсина.

5. «Бомбажная» консервная банка.

6. Столбнячный анатоксин, противостолбнячная, противогангренепозные и противоботулинические сыворотки.

#### Задание студентам для выполнения лабораторной работы

1. Бактериоскопическое и бактериологическое исследование при газовой гангрене.

Материал для исследования — отделяемое раны морской свинки, погибшей от экспериментальной газовой гангрены: а) приготовить из отделяемого раны мазок, окрасить по Граму и микроскопировать; б) провести учет результатов посева раневого отделяемого на среды Китта — Тароцци, Вильсона — Блера и молоко.

Сделать заключение на основании полученных данных и наметить ход дальнейшего исследования.

2. Определить перфрингенс-токсин в раневом отделяемом с помощью лецитовителлазной пробы. Сделать заключение.

#### Микробиологическая диагностика газовой гангрены

Газовая гангрена — полимикробное заболевание, вызываемое ассоциацией анаэробных клостридий, среди которых чаще всего встречаются следующие виды: *Clostridium perfringens*, *Cl. oedematiens*, *Cl. septicum*, *Cl. histolyticum*, *Cl. sordelli*.

Наряду с перечисленными микробами при газовой гангрене часто встречаются стафилококки, грамположительные и грамотрицательные аэробные бактерии. Полимикробная флора вызывает тяжелое течение раневой инфекции (схема 15).

#### Методические указания

**Бактериоскопическое исследование.** Мазки для первичной бактериоскопии готовят из отечной жидкости или некротизированной ткани и окрашивают по Граму. Наличие в препарате крупных (1—1,5 на 3—10 мкм) грамположительных палочек, часть из которых (*Cl. perfringens*) образует капсулу, служит ориентировочным признаком для подозрения на газовую гангрену (рис. 76).

**Бактериологическое исследование.** Исследуемый материал засевают в несколько пробирок со средой Китта — Тароцци. Для ускоренного обнаружения наиболее часто встречающегося

ся возбудителя газовой гангрены *Cl. perfringens* исследуемый материал, кроме того, засевают на молоко и среду Вильсона — Блера. Часть пробирок прогревают 30 мин при 80°C для уничтожения вегетативных форм неспорных бактерий и инкубируют при 37°C. *Cl. perfringens* на молоке через 3—4 ч дает губкообразный сгусток, содержащий пузырьки газа; отделившаяся жидкость прозрачна. На среде Вильсона — Блера отмечается сильное газообразование и почернение. Для изучения морфологии выросших бактерий приготавливают мазки и окрашивают по Граму.

При отсутствии характерных изменений на указанных средах бактериологическое исследование продолжают. На 2-й день изучают посевы на среде Китта — Тароцци, отмечая наличие помутнения среды и газообразование; микроскопируют мазки, окрашенные по Граму. После получения первичного роста культуры производят пересевы на плотные питательные среды (сахарный мясо-пептонный агар, среду Вильсона — Блера, кровяной сахарный мясо-пептонный агар) для получения изолированных колоний. Посевы на чашках с кровяным агаром помещают в анаэробстат (метод Цейслера). Посевы на сахарный агар и среду Вильсона — Блера производят в столбик среды. Для этого можно использовать трубки Вейнберга (см. с. 66). Посевы инкубируют 24—28 ч при 37°C.

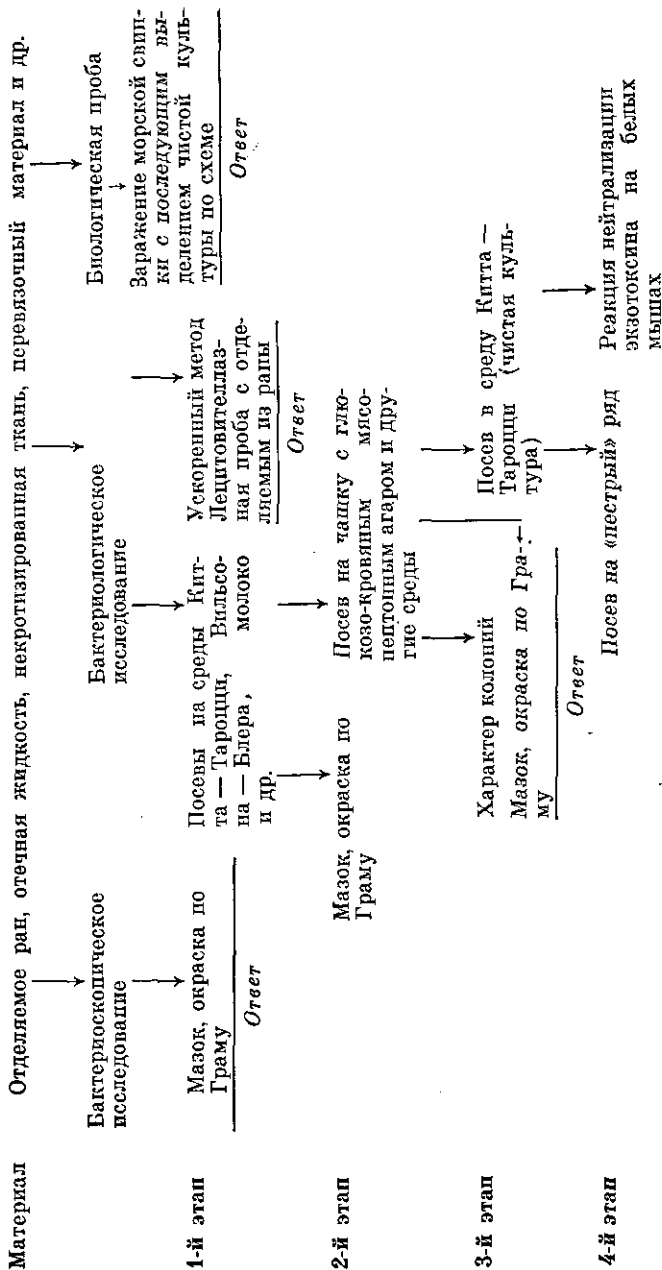
На 3—4-й день исследования изучают выросшие колонии, обращая внимание на их размер и форму, а на кровяном агаре — на наличие гемолиза. На среде Вильсона — Блера *Cl. perfringens* образует колонии черного цвета. Для получения чистой культуры отдельные колонии с плотных сред пересевают в среду Китта — Тароцци. Чистую культуру идентифицируют по биохимическим, антигенным и токсигенным свойствам.

**Определение токсигенных свойств *Cl. perfringens* и серологическое типирование токсина.** Для быстрого обнаружения токсина *Cl. perfringens* в раневом отделяемом определяют его лецитовителлазную активность. Положительная реакция на лецитовителлазу проявляется в виде помутнения жидкости в пробирке; при ее нейтрализации соответствующей антисывороткой проба будет отрицательной.

Определение серологического типа токсина проводят в реакции нейтрализации путем заражения лабораторных животных смесью исследуемого токсина с антитоксическими сыворотками *Cl. perfringens* A., *Cl. oedematiens*, *Cl. septicum*, *Cl. histolyticum*, *Cl. sordellii*. Токсигенные штаммы возбудителей

Схема 15

Схема микробиологического исследования при газовой гангрене



Окончательный ответ

газовой гангрены можно выявить в очень короткие сроки (через 30 мин — 4 ч после инъекции) путем их внутривенного введения морской свинке.

### Микробиологическая диагностика столбняка

Возбудитель столбняка *Cl. tetani* попадает в организм людей через поврежденные кожные покровы при разных травмах и ранениях, у женщин — через родовые пути после родов или аборта, у новорожденных — через пупочную рану. Микробиологические исследования, проводимые при столбняке, представлены на схеме 16.

### Методические указания

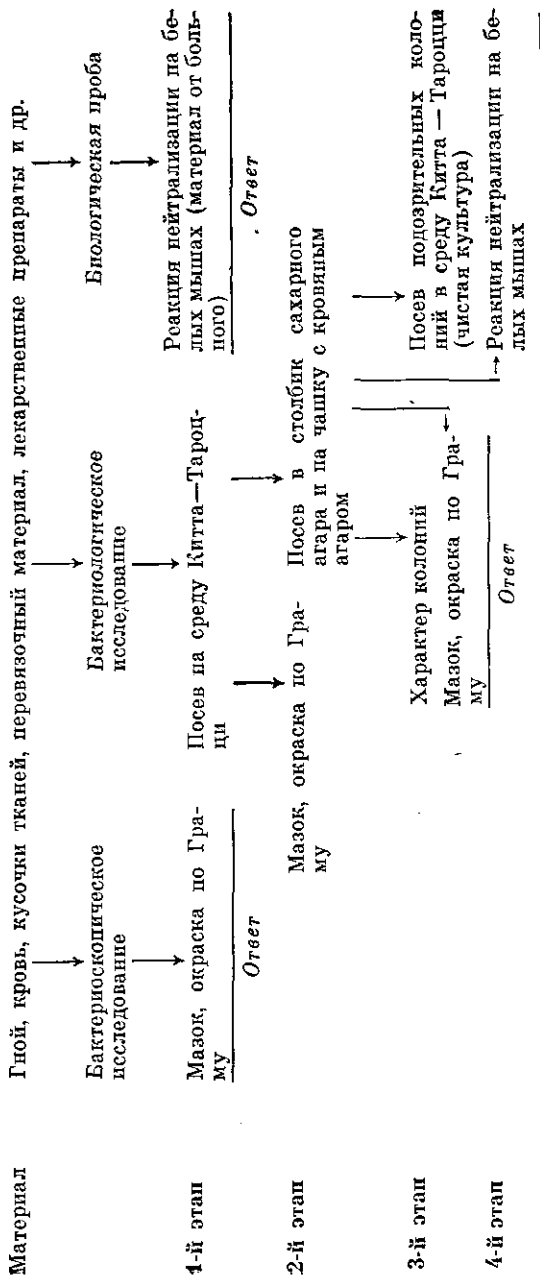
**Бактериоскопическое исследование.** Мазки из исследуемого материала окрашивают по Граму. Наличие в препарате грамположительных бактерий, имеющих характерную форму барабанной палочки, является ориентировочным признаком загрязнения материала клостридиями столбняка (рис. 77).

**Бактериологическое исследование.** Материал засевают в среду Китта — Тароцци и инкубируют при 37°C в течение 3—4 сут. В положительном случае наблюдается придонный рост. Затем делают пересев на чашку с кровяным мясо-пептонным агаром и в столбик сахарного мясо-пептонного агара. Посевы инкубируют в анаэробном состоянии. *Cl. tetani* образует зону гемолиза на кровяном агаре и чечевицеобразные плотные колонии (R-форма) или пушистые с плотным центром (S-форма) в глубине агарового столбика. Для получения чистой культуры колонию пересевают на среду Китта — Тароцци.

**Биологическая проба.** Для обнаружения экзотоксина исследуемый материал экстрагируют изотоническим раствором хлорида натрия. Полученный экстракт фильтруют через бумажный фильтр и вводят внутримышечно белым мышам в бедро задней лапки. Контрольным мышам вводят смесь экстракта с противостолбнячной сывороткой, при этом заболевание у животных не наступает. Для проверки токсигенности культуры в качестве исходного материала используют центрифугат культуры, выращенной на среде Китта — Тароцци. Первые признаки столбняка у мышей — ригидность мышц хвоста и задних конечностей. При постукивании по клетке

Схема 16

Схема микробиологического исследования при столбняке



Окончательный ответ

наблюдается резкая реакция у больных животных, характеризующаяся сокращением мышц основания хвоста, в результате чего хвост поднимается вверх трубой, развивается ригидность мышц спины, наблюдается искривление позвоночника. Через 2—3 дня наступает паралич и гибель животных.

### Микробиологическая диагностика ботулизма

Возбудитель ботулизма — *Cl. botulinum* широко распространен в природе. Споры палочки ботулизма из почвы попадают в воду, на различные растения, овощи, фрукты, рыбу, мясо. Заболевание возникает при приеме пищи (колбасы, мясных, рыбных, фруктовых и овощных консервов), зараженной ботулиническим токсином, который образуется вегетативными формами *Cl. botulinum* и может вызывать смертельную интоксикацию.

### Методические указания

Материалом для исследования служат остатки пищи, промывные воды желудка, кровь, моча, испражнения. Микробиологическая диагностика направлена на обнаружение в исследуемом материале ботулинического токсина путем постановки биологической пробы или в реакции пассивной гемагглютинации.

Выделение чистой культуры проводится редко, по специальным показаниям. Для этого исследуемый материал засевают в среду Китта — Тароцци и инкубируют при 35°C в течение 18—20 ч. При обнаружении в посевах грамположительных палочек, имеющих форму теннисных ракеток, делают пересев на чашки с кровяным и печеночным мясо-пептонным агаром и в столбик сахарного мясо-пептонного агара для выделения чистой культуры. Посевы инкубируют в анаэробных условиях. Палочка ботулизма на кровяном агаре образует колонии неправильной формы, окруженные зоной гемолиза; в столбике сахарного агара колонии имеют вид пушинок или чечевиц.

Выделенную чистую культуру идентифицируют по биохимическим, антигенным и токсигенным признакам.

Методика обнаружения ботулинического токсина. 1. Для обнаружения ботулинического токсина в сыворотке крови больного ставят реакцию пассивной гемагглютинации с эритроцитами, нагруженными моновалентными антитоксическими



ми противоботулиническими сыворотками типов А, В, Е, и в качестве контроля с нормальной сывороткой.

2. Обнаружение ботулинического токсина в пищевых продуктах, а также определение токсигенности *Cl. botulinum* проводится в реакции нейтрализации токсина на белых мышцах. Для определения типа токсина реакцию нейтрализации ставят с моновалентными противоботулиническими сыворотками типов А, В, Е. При нейтрализации токсина гомологичной сывороткой мышцы остаются живыми.

## Профилактические и лечебные препараты

**Адсорбированный столбнячный анатоксин** приготовлен из экзотоксина *Cl. tetani* путем обезвреживания формалином (по Рамону) с последующей очисткой, концентрацией и адсорбцией на гидрате окиси алюминия. Применяется для проведения активной иммунизации против столбняка. Входит в состав адсорбированной дифтерийно-столбнячной (АДС), коклюшно-дифтерийно-столбнячной вакцины (АКДС) и брюшнотифозной вакцины с секстаанатоксином, в которую входят О- и Vi-антигены брюшнотифозных бактерий и анатоксины, полученные из экзотоксинов возбудителей ботулизма типов А, В, Е, столбняка и газовой гангрены (перфрингенс типа А и эдематигенс).

**Противостолбнячная сыворотка** получена из крови лошадей, гипериммунизированных столбнячным анатоксином. Сыворотку очищают и концентрируют методом «Диаферм-3». Активность измеряется в международных антитоксических единицах. Применяется для лечения и профилактики столбняка.

**Иммуноглобулин человеческий противостолбнячный** — раствор гамма-глобулиновой фракции крови людей — доноров, ревакцинированных очищенным сорбированным столбнячным анатоксином. Применяется для пассивной экстренной профилактики при всех травмах кожных покровов (в сочетании с анатоксином) и для лечения столбняка.

**Противогангренозные сыворотки** получены из крови лошадей, гипериммунизированных анатоксинами возбудителей газовой гангрены. Применяются для лечения и профилактики газовой гангрены.

**Противоботулинические сыворотки** получены из крови лошадей, гипериммунизированных ботулиническими анатоксинами; очищены и концентрированы методом «Диаферм-3». Для лечебно-профилактических целей готовят противоботули-

пические сыворотки против токсинов четырех типов А, В, Е, F, представляющих основную опасность для человека.

**Антибиотики:** стрептомицин, пенициллин, хлортетрациклин (для профилактики осложнений).

### Контрольные вопросы

1. Какие микроорганизмы являются возбудителями газовой гангрены и каковы их свойства?
2. Назовите среду обитания и переживания возбудителей газовой гангрены и столбняка. При какой локализации в организме они образуют экзотоксины?
3. Какие условия необходимы для возникновения газовой гангрены?
4. Дайте характеристику токсическим продуктам *Cl. perfringens*.
5. Бактериологическая диагностика газовой гангрены и метод ускоренного обнаружения токсина *Cl. perfringens*.
6. Роль микробных ассоциаций в патогенезе газовой гангрены.
7. Биологические признаки возбудителя столбняка.
8. Как проводится бактериологическая диагностика столбняка?
9. Патогенетические особенности столбняка.
10. Какие группы населения в первую очередь нуждаются в активной профилактике столбняка? Как она проводится?
11. Какие биологические препараты вводят людям при травмах? Правила введения и механизм действия.
12. Для чего при травмах наряду с противостолбнячной сывороткой вводят столбнячный анатоксин?
13. Получение противостолбнячной сыворотки и единицы измерения ее активности.
14. Какими свойствами обладает столбнячный экзотоксин и в каких единицах измеряют его активность?
15. Основные признаки возбудителя и особенности патогенеза ботулизма.
16. По каким показателям бракуют консервы при подозрении на заражение клостридиями ботулизма?
17. Свойства ботулинического токсина и лабораторные методы его обнаружения.
18. Какие препараты используют с лечебно-профилактической целью при подозрении на заболевание ботулизмом?

## Тема 22. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ДИФТЕРИИ

Дифтерийная палочка — *Corynebacterium diphtheriae* относится к семейству *Corynebacteriaceae*, роду *Corynebacterium* (от греч. *Coryne* — булава), включающему ряд непатогенных бактерий, объединенных в группу дифтероидов, и ложнодифтерийную палочку Гоффмана. Все они являются грамположительными палочками, нередко образующими колбовидные утолщения, придающие им форму булавы, за счет зернистых включений в цитоплазме (зерен волкутина). Дифтерийная палочка образует сильный экзотоксин, который играет основную роль в патогенезе дифтерии. Бактерии диф-

терии по культуральным и биохимическим свойствам подразделяются на типы: *gravis* и *mitis*.

Микробиологическая диагностика дифтерии проводится путем бактериоскопического и бактериологического исследования.

### Программа занятия

1. Изучение схемы микробиологической диагностики дифтерии.
2. Бактериоскопическое и бактериологическое исследование при дифтерии.
3. *Диагностические, профилактические и лечебные препараты, применяемые при дифтерии.*

### Демонстрация

1. Мазки из чистых культур дифтерийных бактерий и дифтероидов, окрашенных по Нейссеру и по Граму.
2. Мазок дифтерийных бактерий, окрашенный корифосфином, в люминесцентном микроскопе.
3. Рост дифтерийных бактерий и дифтероидов на свернутой сыворотке и теллуритовой среде.
4. Пестрые ряды культур дифтерийной палочки и дифтероидов. Пробы на цистиназу и уреазу.
5. Определение токсигенности дифтерийной культуры (в реакции преципитации в агаре).
6. Ускоренный метод диагностики дифтерии.
7. Токсин Шика, дифтерийный анатоксин, противодифтерийная сыворотка.

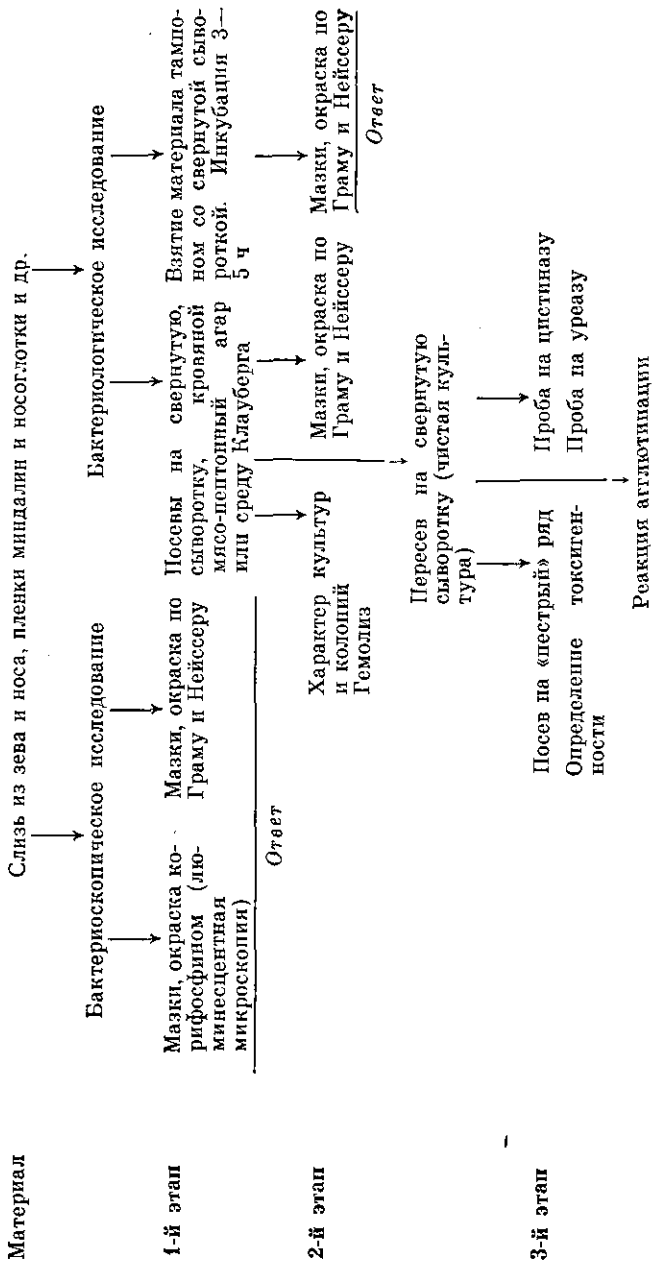
### Задание студентам для выполнения лабораторной работы

1. Бактериоскопическое исследование.  
Материал — мазки из зева больных с подозрением на дифтерию или бактерионосительство. Микроскопировать готовые мазки, определить способ окраски и дать предварительное заключение.  
Наметить ход дальнейшего исследования для подтверждения бактериоскопического диагноза.
2. Бактериологическое исследование: а) описать рост культуры, полученной на свернутой сыворотке, и колоний на теллуритовой среде; б) отметить результаты готовых посевов исследуемых культур на среды «пестрого» ряда; в) в случае обнаружения *S. diphtheriae* определить ее токсигенность.  
Сопоставить данные бактериоскопического и бактериологического исследований с целью идентификации выделенной культуры и поставить окончательный микробиологический диагноз (схема 17).

### Методические указания

**Бактериоскопическая диагностика.** Забор материала производят двумя ватными стерильными тампонами, один из которых используют для приготовления мазков, другой — для посева.

## Схема микробиологического исследования при дифтерии



Окончательный ответ

Мазки окрашивают по способу Нейссера и Грама. Для дифтерийной палочки характерны зерна волютина и расположение в виде буквы «V» (см. рис. 20). Дифтероиды и ложнодифтерийная палочка Гоффмана не имеют зерен волютина или содержат их не на концах, а по длине палочки. Кроме того, сами бактерии располагаются в виде «частокола». Применение люминесцентной микроскопии позволило повысить эффективность исследования. При этом можно отличить дифтерийные палочки от ложнодифтерийных по коричнево-красному свечению зерен волютина, которое они приобретают после окраски флюорохромом — корифосфином. Цитоплазма этих бактерий дает зеленое или желтое свечение.

**Бактериологическое исследование.** Материал засевают на элективные питательные среды — свернутую сыворотку и теллуритовую среду Клауберга (мясо-пептонный агар с теллуридом натрия, глицерином и дефибринированной кровью) для получения чистой культуры. На этих средах задерживается рост кокков и другой микрофлоры зева, что способствует размножению бактерий дифтерии. *S. diphtheriae* образует на свернутой сыворотке мелкие круглые колонии с уплотнением в центре. При сплошном росте поверхность культуры напоминает шагреновую кожу. На теллуритовой среде бактерии дифтерии типа *gravis* формируют колонии серовато-черного цвета с радиальной исчерченностью поверхности, напоминающей цветок маргаритки, тип *mitis* — круглые выпуклые колонии черного цвета вследствие интенсивного восстановления теллура (рис. 78).

Выделенную культуру дифференцируют от ложнодифтерийной палочки и дифтероидов по морфологическим особенностям, ферментации сахарозы, глюкозы, крахмала, токсигенности и антигенным признакам (табл. 29).

Способность бактерии продуцировать токсин устанавливают в реакции преципитации в агаре. Для этого в чашку Петри с мясо-пептонным агаром, содержащим 15—20% лошадиной сыворотки, 0,3% мальтозы и 0,03% цистина, помещают полоску фильтровальной бумаги (1,5×6 см), пропитанную антитоксической противодифтерийной сывороткой, содержащей 500 МЕ/мл. Чашку подсушивают при 37°C в течение 30 мин. Исследуемые культуры подсевают в виде перпендикулярных к бумажке штрихов по 2—3 с каждой стороны на расстоянии 0,6—0,8 см от края бумажки. В качестве контроля используют заведомо токсигенную культуру. Посевы инкубируют при 37°C до следующего дня. Если культура токсигенна, то в месте соединения токсина с антитоксином в

Биологические свойства дифтерийной палочки и сходных с ней коринебактерий

Виды	Зерна волютина	Гемолиз	Ферментация			Токсигенность	Цистиназа	Уреаза	Агглютинация
			сахарозы	глюкозы	крахмала				
Дифтерийные палочки:									
тип <i>gravis</i>	+	-	-	+	+	±	+	-	+
тип <i>mitis</i>	+	+	-	+	-	±	+	-	+
Дифтероиды	±	-	+	+	-	-	±	±	-
Ложнодифтерийная палочка	±	-	-	-	-	-	-	+	-

Обозначения те же, что и в табл. 28.

плотной питательной среде образуется преципитат в виде белых линий («усов») (см. рис. 64).

В случае выделения нетоксигенной культуры ставят пробы на цистиназу (проба Пизу), уреазу (проба Закса) и реакцию агглютинации с агглютинирующей дифтерийной сывороткой.

Для определения цистиназы (проба Пизу) в столбик мясо-пептонного агара с цистином и ацетатом свинца уколочным способом засевают исследуемую культуру. Посевы инкубируют при 37°C до следующего дня. Истинные дифтерийные палочки вызывают почернение среды по ходу посева, вокруг которого появляется зона коричневого цвета, а на глубине 1 см от поверхности в среде появляется коричневое «облачко» (в результате образования сульфида свинца).

Для определения уреазы (проба Закса) готовят спиртовой раствор мочевины и раствор индикатора — фенолового красного, которые смешивают перед употреблением в соотношении 1 : 9 и разливают по 1—2 мл в агглютинационные пробирки. Затем одну петлю исследуемых бактерий вносят и растирают по стенке пробирки. После 20—30-минутной инкубации при 37°C происходит расщепление мочевины ферментом уреазой, в результате чего среда приобретает красный цвет.

Ускоренный метод диагностики дифтерии является ориентировочным и проводится путем взятия материала стерильным ватным тампоном, пропитанным лошадиной сывороткой, свернутой при 80—90°C. После инкубации при 37°C в течение 3—5 ч с тампона готовят мазки, которые окрашивают по Нейссеру и микроскопируют.

### Диагностические, профилактические и лечебные препараты

**Токсин Шика** — высокоочищенный экзотоксин дифтерийных бактерий применяется для постановки реакции Шика для определения напряженности антитоксического иммунитета против дифтерии у детей.

**Дифтерийный адсорбированный очищенный анатоксин (АД)** — дифтерийный экзотоксин, обезвреженный (по Рамоцу) с последующей очисткой, концентрацией и адсорбцией на гидрате окиси алюминия. Применяется для проведения активной иммунизации против дифтерии. Входит в состав адсорбированного дифтерийно-столбнячного анатоксина (АДС) и коклюшно-дифтерийно-столбнячной вакцины (АКДС).

**Противодифтерийная анитоксическая сыворотка** получена из крови лошадей, гипериммунизированных дифтерийным анатоксином. Сыворотку очищают и концентрируют методом «Диаферм-3». Активность сыворотки измеряется в международных единицах. Применяется для лечения и профилактики дифтерии.

**Агглютинирующая противодифтерийная сыворотка (поливалентная и типовые)**. Применяется для дифференцирования бактерий дифтерии от дифтероидов.

### Контрольные вопросы

1. Биологические признаки дифтерийных бактерий.
2. Место локализации дифтерийных бактерий в организме и особенности патогенеза дифтерии.
3. На каких питательных средах культивируются дифтерийные бактерии?
4. Как проводится микробиологическое исследование при дифтерии?
5. На основании каких признаков идентифицируют дифтерийных бактерий и проводят дифференцирование между возбудителями дифтерии и дифтероидами?
6. Дайте характеристику токсина дифтерийной палочки.
7. Как определить токсигенность дифтерийных бактерий *in vivo* и *in vitro*?

8. Особенности иммунитета при дифтерии и методы его оценки.
9. С какими генетическими детерминантами связана токсигенность дифтерийной палочки?
10. Препараты, применяемые для активной и пассивной профилактики дифтерии. Их получение и показания для применения.
11. Единицы и методы измерения активности противодифтерийной сыворотки.
12. Какие препараты применяются для санации дифтерийных бактерионосителей?
13. Можно ли на основании одного бактериоскопического исследования поставить диагноз дифтерии?
14. Всегда ли обнаружение дифтерийной палочки в зеве ребенка свидетельствует о его заболевании дифтерией?

## Тема 23. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА КОКЛЮША И ПАРАКОКЛЮША

Возбудитель коклюша — *Bordetella pertussis* относится к роду *Bordetella*. К этому же роду относится *Bordetella parapertussis* — возбудитель паракоклюша. Основным методом лабораторной диагностики является бактериологическое исследование. Экспресс-диагностика проводится с помощью иммунофлюоресцентного метода. Серологическое исследование применяется при выявлении стертых форм болезни и ретроспективной диагностики (схема 18).

### Программа занятия

1. Изучение схемы микробиологической диагностики коклюша и паракоклюша.
2. Бактериологическое и серологическое исследование при коклюше. Экспресс-диагностика коклюша с помощью иммунофлюоресцентного метода.
3. Диагностические, профилактические и лечебные препараты, применяемые при коклюше.

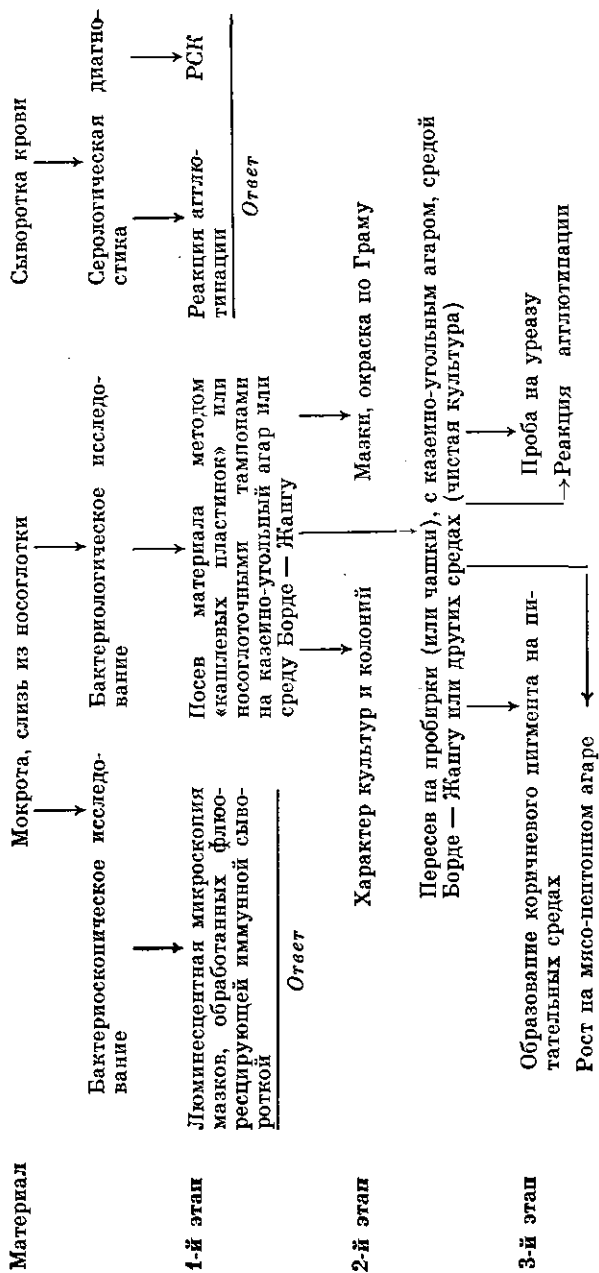
### Демонстрация

1. Мазки из чистых культур коклюшных и паракоклюшных бактерий, окрашенные по Граму.
2. Питательные среды для культивирования бордетелл: казеино-угольный агар (КУА), среда Борде — Жангу, молочно-кровяной агар.
3. Рост коклюшных бактерий на казеино-угольном агаре и среде Борде — Жангу.
4. Определение уреазной активности паракоклюшных бактерий.
5. Реакция связывания комплемента для серологической диагностики коклюша.
6. Вакцина АКДС, иммуноглобулин нормальный человеческий, агглютинирующие адсорбированные (факторные) сыворотки.



С х е м а 18

Схема микробиологического исследования при коклюше и паракоклюше



Окончательный ответ

## Задание студентам для выполнения лабораторной работы

Бактериологическое исследование: а) микроскопировать готовые мазки, приготовленные из колоний со среды казенно-угольного агара и Борде — Жангу; б) описать рост культуры бордетелл, полученной на казенно-угольном агаре и среде Борде — Жангу; обратить внимание на скорость появления роста, описать характер колоний, наличие или отсутствие изменений цвета среды; в) отметить наличие или отсутствие роста культуры на мясо-пептонном агаре; г) отметить результаты пробы на уреазу; д) поставить реакцию агглютинации на стекле для серологической идентификации культуры бордетелл.

Сопоставить морфологические, культуральные, биохимические и серологические свойства выделенной культуры для ее идентификации и поставить окончательный микробиологический диагноз.

### Методические указания

**Бактериоскопическое исследование.** Для быстрого обнаружения и идентификации *V. pertussis* используют иммунофлюоресцентный метод. Забор материала производят стерильным ватным тампоном из носоглотки больного. Для забора материала от маленьких детей тампон вводят через нос. В этом случае для приготовления тампона используют тонкую и эластичную проволоку. Сразу же после взятия материала на предметном стекле делают два мазка, высушивают их на воздухе и фиксируют на пламени. Один мазок обрабатывают флюоресцирующей иммунной противокклюшной сывороткой, другой — паракклюшной сывороткой. Препараты микроскопируют в люминесцентном микроскопе; просматривают не менее 50 полей зрения. В положительном случае наблюдают специфическую окраску. *V. pertussis* — темные клетки с четким светящимся венчиком. Диагностическое значение имеет обнаружение не менее 2—3 светящихся клеток.

Бактериологическое исследование является основным методом лабораторной диагностики коклюша. Материал для посева берут с помощью носоглоточного тампона (см. выше) или методом «кашлевых пластинок». Для этого в момент появления кашля открытую чашку Петри со специальной питательной средой подносят ко рту ребенка и держат несколько секунд в течение 6—8 кашлевых толчков. Правильное и раннее взятие материала позволяет выделить коклюшные микробы в начальном периоде болезни в 80—90% случаев. Размножению коклюшных бактерий на питательных средах препятствуют ингибиторы — жирные кислоты, образующиеся в процессе роста культуры. Для нейтрализации этих ингибиторов применяют кровь, древесный уголь или ионообменные смо-

лы. Для посевов используют полусинтетическую среду — казеино-угольный агар или кровяные среды — картофельно-глицериновый кровяной агар Борде — Жангу и молочно-кровяной агар. В питательные среды добавляют пенициллин для угнетения роста посторонней микрофлоры.

Колонии *V. pertussis* на указанных средах обычно появляются через 48—72 ч культивирования, у паракокклюшных микробов они появляются несколько раньше — через 24—72 ч. Бордетеллы образуют мелкие, диаметром около 1 мм, выпуклые, влажные, блестящие колонии. На казеино-угольном агаре колонии серовато-кремового цвета, на среде Борде — Жангу они приобретают жемчужный или ртутный блеск. Колонии паракокклюшных бактерий несколько крупнее, чем кокклюшных. На среде Борде — Жангу и молочно-кровяном агаре они образуют нерезко ограниченную зону гемолиза, диффузно распространяющуюся в среду.

Из подозрительных колоний, выросших на чашках, готовят мазки, окрашивают их по Граму и микроскопируют. При обнаружении в мазках овоидных грамтрицательных палочек ставят с колониями ориентировочную реакцию агглютинации с кокклюшной и паракокклюшной сыворотками.

Затем подозрительные колонии пересевают в пробирки для дальнейшего изучения бордетелл, основные дифференциальные признаки которых представлены в табл. 30.

В отличие от других бордетелл *V. pertussis* не растет на мясо-пептонном агаре и не изменяет цвета специальных питательных сред.

Характерным свойством *V. parapertussis* является изменение цвета питательной среды — образование буро-коричневого пигмента на казеино-угольном агаре, потемнение картофельно-глицериновой кровяной среды Борде — Жангу и молочно-кровяного агара. Особенно яркие изменения цвета среды наблюдаются при культивировании *V. parapertussis* на мясо-пептонном агаре с добавлением 0,1% тирозина.

Для определения уреазы в агглютинационные пробирки вносят 0,3 мл 2% раствора мочевины, 0,3 мл густой суспензии испытуемой культуры бордетелл и 2—3 капли 0,1% спиртового раствора фенолфталеина. После инкубации в положительном случае через 20—30 мин появляется малиновое окрашивание, указывающее на расщепление мочевины ферментом уреазой. Отсутствие каких-либо изменений в течение 2 ч инкубации рассматривают как отрицательный результат.

Установление серологической специфичности бордетелл, дифференциация видов и определение серотипов проводятся

Биологические свойства *B. pertussis* и *B. parapertussis*

Признак	Вид	
	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>
Морфология и тинкториальные свойства	Грамотрицательные палочки	мелкие овоидные
Капсула	+	—
Рост на мясо-пептонном агаре	—	+
Образование коричневого пигмента на питательных средах	—	+
Гемолиз	+	+
Образование уреазы	—	+
Дермонекротическая проба	Некроз	Некроз
Реакция агглютинации с видовой и типовой сыворотками		
к <i>B. pertussis</i>	+	—
к <i>B. parapertussis</i>	—	+

в реакции агглютинации с адсорбированными сыворотками.

**Серологическая диагностика.** Серологические реакции — реакция агглютинации и РСК применяются в основном для ретроспективного подтверждения диагноза и дифференциальной диагностики атипичных форм коклюша. Агглютинины в крови больных появляются на 3—4-й неделе заболевания в титре 1 : 20 и выше.

### Диагностические, профилактические и лечебные препараты

**Вакцина АКДС** — адсорбированная коклюшно-дифтерийно-столбнячная вакцина. Содержит взвесь коклюшных бактерий, убитых формалином или мертиололом, и очищенные концентрированные дифтерийный и столбнячный анатоксины, адсорбированные на гидрате окиси алюминия. Применяется для вакцинации детей против коклюша, дифтерии и столбняка.

**Иммуноглобулин нормальный человеческий** получают из плацентарной или венозной крови человека. Препарат содержит специфические антитела против возбудителей многих инфекционных заболеваний, в том числе и против возбудителя коклюша. Применяется для пассивной профилактики и лечения коклюша.

**Агглютинирующие адсорбированные (факторные) сыворотки применяются для серологической дифференциации коклюшных бактерий.**

### **Контрольные вопросы**

1. Биологические признаки коклюшных бактерий.
2. На каких питательных средах культивируются коклюшные бактерии?
3. Какие продукты метаболизма коклюшных бактерий препятствуют их росту на питательных средах и какие вещества используются для нейтрализации этих ингибиторов?
4. Особенности патогенеза и иммунитета при коклюше.
5. Как проводится микробиологическое исследование при коклюше?
6. На основании каких признаков идентифицируют *B. pertussis* и проводят дифференцирование между бактериями коклюша и паракоклюша?
7. Какие реакции применяются при серологической диагностике коклюша?
8. Препараты, применяемые для активной и пассивной профилактики и лечения коклюша. Их получение и применение.

## **Тема 24. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ТУБЕРКУЛЕЗА И ПРОКАЗЫ**

**Возбудители туберкулеза и проказы относятся к порядку Actinomycetales, семейству Mycobacteriaceae, роду Mycobacterium, который включает патогенные микобактерии и микобактерии-сапрофиты. Характерным свойством микобактерий является их кислотоустойчивость (в связи с большим содержанием миколовой кислоты и липидов), а также устойчивость к щелочам и спирту.**

### **Программа занятий**

1. Изучение схем микробиологической диагностики туберкулеза и проказы.
2. Бактериоскопическое и бактериологическое исследования при туберкулезе.
3. Диагностические, профилактические и лечебные препараты, применяемые при туберкулезе и проказе.

### **Демонстрация**

1. Мазок из чистой культуры туберкулезных микобактерий, окрашенный по Цилю — Нильсену.
2. Препарат микобактерий туберкулеза в люминесцентном микроскопе.
3. Ускоренный метод микробиологической диагностики туберкулеза.
4. Рост туберкулезных микобактерий на среде Петраньяни.
5. Питательные среды для культивирования туберкулезных микобактерий.

6. Препарат микобактерий лепры.  
7. Туберкулин, вакцина BCG, антибиотики и химиотерапевтические противотуберкулезные препараты, лепронин.

### Задание студентам для выполнения лабораторной работы

1. Бактериоскопическое исследование при туберкулезе.  
Материал для исследования — мокрота от больных с подозрением на туберкулез легких.  
Окрасить приготовленные мазки из мокроты и провести микроскопическое исследование.  
Сделать заключение по проведенному исследованию и наметить ход дальнейшего исследования для подтверждения бактериоскопического диагноза.
2. Бактериологическое исследование при туберкулезе: а) отметить характер роста исследуемой культуры на среде Левенштейна — Йенсена; б) отметить результаты пинациновой пробы; в) определить чувствительность туберкулезных микобактерий к антибиотикам и химиотерапевтическим препаратам.  
Отметить наличие или отсутствие роста микобактерий на среде Левенштейна — Йенсена с разными концентрациями противотуберкулезных препаратов. Сопоставить полученные данные с клиническими границами устойчивости туберкулезных микобактерий (см. с. 226).  
Дать окончательное заключение по проведенным исследованиям.

### Микробиологическая диагностика туберкулеза

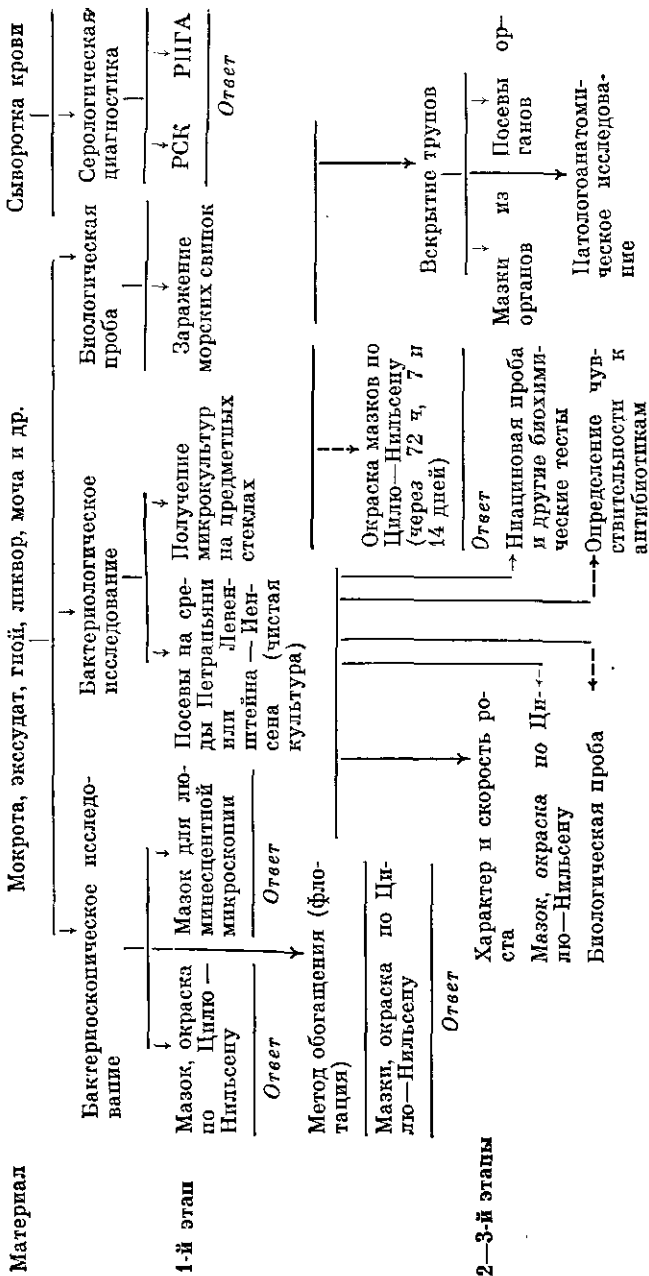
Возбудители туберкулеза — *Mycobacterium tuberculosis* и *Mycobacterium bovis* характеризуются медленным ростом на питательных средах. Заражение происходит воздушно-капельным и пылевым путем, иногда — через желудочно-кишечный тракт.

Основные методы, применяемые для микробиологической диагностики туберкулеза, приведены в схеме 19.

### Методические указания

**Бактериоскопическое исследование.** Мокроту помещают в чашку Петри и ставят на черную поверхность. Пинцетом выбирают гнойный комочек, переносят его на предметное стекло ближе к одному из концов и, растирая между двумя стеклами, приготавливают два мазка. Спинномозговую жидкость отстаивают в холодильнике и готовят мазки из нежной пленки фибрина, в которой находятся туберкулезные микобактерии и клеточные элементы. Мочу центрифугируют и делают мазки из осадка. Препараты из мочи при окраске по методу Циля — Нильсена обязательно обесцвечивают не только кислотой, но и спиртом для дифференцирования туберкулез-

Схема микробиологического исследования при туберкулезе



ных бактерий от *M. smegmatis*, которые могут находиться в моче здоровых людей. В отличие от туберкулезных микобактерий они обесцвечиваются спиртом.

Мазки окрашивают по Цилю — Нильсену и микроскопируют до 100 полей зрения в препарате. Туберкулезные палочки окрашиваются в ярко-красный цвет, располагаясь в препарате поодиночке или небольшими скоплениями (см. рис. 18). Единичные бактерии можно обнаружить в препарате, если их содержание не менее  $10^5$  в 1 мл мокроты. Поэтому при небольшом содержании туберкулезных микобактерий в материале применяют методы «обогащения» — гомогенизации и осаждения или, чаще, флотации.

**Метод гомогенизации и осаждения.** К суточной порции мокроты добавляют равный объем 1% раствора едкого натра (или антиформина) для гомогенизации, флакон плотно закрывают пробкой и энергично встряхивают 10—15 мин. После центрифугирования и нейтрализации кислотой из осадка приготавливают мазки и окрашивают по Цилю — Нильсену.

**Метод флотации.** Мокроту гомогенизируют и прогревают при  $55^{\circ}\text{C}$  в течение 30 мин на водяной бане. Затем добавляют 1—2 мл ксилола (бензола, бензина или петролейного эфира), дистиллированную воду, повторно встряхивают в течение 10 мин и отстаивают около 20 мин при комнатной температуре. На поверхности образуется пена, которая состоит из всплывших капелек ксилола с адсорбированными микробами. Пипеткой или петлей из пенообразного слоя приготавливают мазок, несколько раз наслаивая материал на предметное стекло по мере его высыхания. Мазок обезжиривают эфиром, фиксируют и окрашивают по Цилю — Нильсену.

**Применение люминесцентной микроскопии** повышает число находок туберкулезных палочек в патологическом материале. При этом пользуются объективом 40 и окуляром 10. При окраске аураминол туберкулезные микобактерии светятся золотисто-зеленым светом, а при окраске акридином — оранжево-красным.

Микроскопическое исследование является ориентировочным и позволяет судить лишь о наличии кислотоустойчивых бактерий в материале без определения видовой и типовой принадлежности.

**Бактериологическое исследование.** Материал перед посевом обрабатывают в течение нескольких минут 10% серной кислотой или 4—6% раствором едкого натра для освобождения от сопутствующей микрофлоры. Затем тщательно встря-



хивают, центрифугируют. Осадок нейтрализуют и засевают на несколько пробирок со средой Петраньяни или Левенштейна — Йенсена.

Среда Петраньяни состоит из суспензии яиц, молока, картофельной муки, картофеля, глицерина, пептона и малахитгрюна. Среду свертывают в наклонном положении при  $85^{\circ}\text{C}$  в течение 2—2½ ч. Среду Левенштейна — Йенсена готовят из суспензии свежих яиц, картофельной муки, глицерина, аспарагина,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , сульфата и нитрата магния и малахитгрюна. Среду свертывают в наклонном положении при  $85^{\circ}\text{C}$  в течение 45 мин.

Во избежание высыхания ватные пробки пробирок после посева заливают парафином и посевы инкубируют при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 4—6 нед и более, так как туберкулезные палочки очень медленно размножаются, особенно в первых генерациях. Культуры микобактерий туберкулеза имеют вид сероватого или светло-кремового морщинистого или крошкообразного сухого налета (рис. 79).

Для ускорения диагностики используют метод микрокультур Прайса. На нескольких предметных стеклах (ближе к одному концу) делают толстые мазки из исследуемого материала. Мазки высушивают, обрабатывают несколько минут 2—6% серной кислотой, промывают стерильным изотоническим раствором хлорида натрия. Затем стекла опускают во флаконы с гемолизированной цитратной кровью в разведении 1 : 4—1 : 8 (или с жидкой питательной средой) и ставят в термостат. Через несколько дней извлекают стекла, фиксируют препарат, окрашивают по Цилю — Нильсену и микроскопируют (рис. 80). Через 72 ч, 7 или 14 дней вирулентные штаммы образуют микрокультуры, имеющие вид жгутиков или кос (корд-фактор).

Из биохимических свойств чаще всего определяют способность исследуемой культуры синтезировать никотиновую кислоту (ниациновая проба Коэнно). Это является одним из признаков, с помощью которого удастся отличить туберкулезные палочки человеческого типа, хорошо синтезирующих никотиновую кислоту, от микобактерий бычьего типа, образующих ее в минимальных количествах.

Для определения ниацина к культуре микобактерий на жидкой питательной среде добавляют 1 мл раствора KCN и 1 мл 5% раствора хлорамина. При наличии ниацина через несколько минут появляется ярко-желтая окраска. Для обезвреживания KCN после учета результатов реакции в пробирки добавляют 3—5 мл 10% раствора NaOH.

**Определение чувствительности туберкулезных микобактерий к антибиотикам и химиотерапевтическим препаратам**

проводят методом серийных разведений. С этой целью взвесь туберкулезных микобактерий в количестве 0,1 мл засевают в пробирки со средой Левенштейна — Йенсена, содержащие различные концентрации противотуберкулезных препаратов: 5, 10, 50 ЕД/мл стрептомицина, 5, 10, 50 мкг/мл ПАСК, 1, 5, 10, 25 мкг/мл тубазид, 30 мкг/мл циклосерина и этноамида. Результаты учитывают на 12—21-й день инкубации. Границы устойчивости туберкулезных микобактерий: стрептомицин 5 ЕД/мл; ПАСК 10 ЕД/мл; тубазид 1 мкг/мл, циклосерин и этноамид 30 мкг/мл.

**Биологическая проба** применяется при первичной диагностике, а также для определения вирулентности культуры, для заражения исследуемым материалом с целью выделения чистой культуры. Исследуемый материал обрабатывают серной кислотой для освобождения от посторонней микрофлоры и вводят подкожно в количестве 2—3 мл морской свинке с отрицательной туберкулиновой реакцией. Через 4 мес, если морская свинка не погибает, ее забивают и проводят макро- и микроскопическое исследование органов и делают посевы. Микобактерии человеческого типа являются высоко-патогенными для морских свинок и малопатогенными для кроликов; микобактерии бычьего типа патогенны для морских свинок и кроликов.

**Серологическая диагностика** проводится ограниченно. Обычно ставят РСК и РПГА. Положительные результаты могут наблюдаться при инфицировании туберкулезными микобактериями, при вакцинации ВСГ и при активном туберкулезном процессе в организме.

**Аллергические реакции** проводятся с туберкулином—очищенной белковой фракцией, полученной из туберкулезных микобактерий. Туберкулиновые пробы применяются для определения состояния аллергии у людей с целью отбора контингентов для ревакцинации против туберкулеза. Туберкулин вводят по Пирке (реакция Пирке) подкожно и по Манту (реакция Манту) — внутривенно в строго определенной дозировке. Учитывают реакции через 24—48 ч по образованию гиперемии и папулы (см. рис. 55).

### **Микробиологическая диагностика проказы**

Возбудитель проказы *M. leprae* по морфологическим и тинкториальным свойствам очень сходен с туберкулезными микобактериями. На питательных средах не культивируется, лабораторные животные не чувствительны к инфекции. За-

ражение людей происходит воздушно-капельным или контактным путем, особенно при тесном и длительном общении больных со здоровыми лицами.

**Бактериоскопическое исследование.** Исследуют соскоб слизистой оболочки носа, кожные лепрозные узлы, пунктат лимфатических узлов, мокроту и др. Мазки окрашивают по Цилю — Нильсену. Микобактерии располагаются скоплениями в виде пачек сигар или наподобие шаров (рис. 81). Бактериоскопическое исследование является основным методом лабораторной диагностики лепры.

**Аллергические реакции.** Проводят аллергические кожные пробы с лепроминном. При положительной реакции через 24—48 ч на месте введения лепроминна появляется инфильтрат диаметром не менее 10 мм. Аллергическая реакция диагностического значения не имеет и применяется для характеристики клинического течения болезни.

### Диагностические, профилактические и лечебные препараты

**Туберкулин сухой очищенный (РРД).** Получают из фильтрата бульонной культуры микобактерий путем добавления химических веществ, осаждающих белок, с последующей очисткой. Применяется для постановки кожно-аллергических туберкулиновых реакций (пробы Пирке и Манту).

**Вакцина ВСГ.** Живая лиофильно высушенная культура вакцинного штамма туберкулезных микобактерий, полученного в 1921 г. французскими учеными Кальметтом и Гереном. Применяется внутрикожно для проведения активной специфической профилактики туберкулеза.

**Антибиотики и химиотерапевтические противотуберкулезные препараты,** применяемые для лечения туберкулеза. К препаратам 1-го ряда относятся основные противотуберкулезные препараты: стрептомицин, ПАСК (пара-аминосалициловая кислота) и производные ГИНК (гидразида изоникотиновой кислоты) — тубазид, фтивазид, метазид и др. Препараты 2-го ряда: циклосерин, канамицин, этнонамид и др. При лечении больных обычно комбинируют препараты 1-го и 2-го рядов с учетом клинической характеристики заболевания и чувствительности туберкулезных микобактерий к лекарственным препаратам.

**Лепромин.** Взвесь лепрозного узелка, растертого в ступке и инактивированного нагреванием. Применяется для постановки кожно-аллергической пробы,

## Контрольные вопросы

1. Современная классификация микобактерий.
2. Назовите микобактерии — сапрофиты и потенциально патогенные. Что такое «атипичные» микобактерии и какова их роль в патологии человека?
3. Основные биологические признаки микобактерий туберкулеза.
4. Типы туберкулезных микобактерий, играющие роль в патологии человека, и их биологические особенности.
5. Пути заражения и особенности патогенеза туберкулеза.
6. Питательные среды, используемые для культивирования туберкулезных микобактерий.
7. Дайте характеристику токсина туберкулезных микобактерий.
8. Как получают и для чего применяют туберкулин? Что такое PPD?
9. Какие методы микроскопии применяются для бактериоскопической диагностики туберкулеза? В чем заключаются методы обогащения?
10. Как проводится бактериологическое исследование при туберкулезе?
11. Дайте характеристику метода ускоренной бактериологической диагностики туберкулеза.
12. Какие признаки исследуют для идентификации и дифференцирования туберкулезных микобактерий?
13. Аллергические пробы, применяемые при туберкулезе. Их механизм и техника постановки.
14. Можно ли на основании положительной туберкулиновой пробы поставить диагноз туберкулеза или исключить заболевание при отрицательной реакции?
15. Какие антибиотики и химиотерапевтические препараты применяются для лечения туберкулеза? Объясните механизм их действия.
16. Как определяют чувствительность туберкулезных микобактерий к противотуберкулезным препаратам?
17. Особенности иммунитета при туберкулезе. Назовите факторы иммунитета, играющие роль в устойчивости организма к туберкулезной инфекции.
18. Какая вакцина используется для активной профилактики туберкулеза? Методика ее приготовления и показания к применению.
19. Основные признаки возбудителя лепры.
20. Методы лабораторной диагностики лепры.

## МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ СПИРОХЕТОЗНЫХ ИНФЕКЦИЯХ

Возбудителями спирохетозов — возвратного тифа, сифилиса, инфекционной желтухи являются спирохеты, которые относятся к семейству Spirochaetaceae и соответственно родам *Borrelia*, *Treponema*, *Leptospira*.

По биологическим свойствам спирохеты занимают промежуточное положение между бактериями и простейшими, как это отмечалось на с. 39. Они так же, как и простейшие, вызывают рецидивирующие заболевания и плохо растут на искусственных питательных средах. Поэтому при микробиологической диагностике спирохетозов применяют главным образом микроскопические и серологические методы исследования.

### Тема 25. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ВОЗВРАТНОГО ТИФА, СИФИЛИСА И ЛЕПТОСПИРОЗОВ

#### Программа занятия

1. Изучение схем микробиологической диагностики возвратного тифа, сифилиса и лептоспирозов.
2. Микроскопическая и серологическая диагностика спирохетозов.
3. Диагностические и лечебно-профилактические препараты, применяемые при возвратном тифе, сифилисе и лептоспирозах.

#### Демонстрация

1. Препарат *Treponema pallidum*, окрашенный методом серебрения.
2. Культура лептоспир в темнопольном микроскопе.
3. Препарат *Borrelia recurrens* в крови больного возвратным тифом. Окраска по Романовскому — Гимзе.
4. Антигены для серодиагностики сифилиса, лептоспирозный антиген, лептоспирозная вакцина.

#### Задание студентам для выполнения лабораторной работы

1. Микроскопическая диагностика возвратного тифа. Материал для исследования: кровь больного. Приготовить из крови больного два препарата: «толстую» каплю и мазок. Первый окрасить по способу Романовского — Гимзы, второй фуксином.

Сделать заключение по данным микроскопического исследования.

2. Серологическая диагностика сифилиса: а) учесть результаты реакции Вассермана; б) учесть результаты осадочных реакций.

Поставить серологический диагноз заболевания, исходя из полученных данных.

## Микробиологическая диагностика эпидемического возвратного тифа

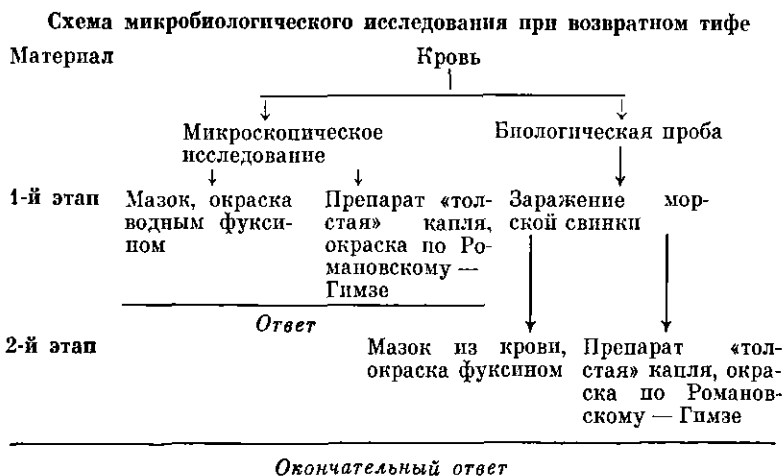
Возбудитель эпидемического возвратного тифа — *Borrelia recurrentis*.

Переносчики — платяная и головная вошь. Заражение происходит в результате втирания в кожу гемолимфы раздавленных насекомых.

Возбудитель эндемического возвратного тифа — *Borrelia sogdianum* и др. Переносчики — клещи. Заражение происходит при укусе клещей.

Микробиологическая диагностика проводится путем микроскопического исследования, реже прибегают к биопробе (схема 20).

С х е м а 20



### Методические указания

Микроскопическое исследование является основным методом микробиологической диагностики возвратного тифа. У больного во время приступа болезни берут кровь и готовят мазки и препарат «толстой» капли. В мазках, окрашенных фуксином, спирохеты имеют красный цвет; в препарате «толстой» капли, окрашенной по Романовскому—Гимзе, — фиолетово-розовый цвет. Боррелии возвратного тифа — тонкие спирохеты длиной 8—16 мкм, имеют 4—12 неравномерных завитков (рис. 82).

**Биологическая проба.** Кровью больных заражают морских свинок. Через 5—6 дней в крови животных появляется большое количество спирохет. Этот метод позволяет дифференцировать возбудителя эпидемического возвратного тифа, который непатогенен для морских свинок, от возбудителя эндемического (клещевого) возвратного тифа, вызывающего у животных заболевание.

### Микробиологическая диагностика сифилиса

Возбудитель сифилиса — *Treponema pallidum*. При микробиологической диагностике сифилиса используют разные методы с учетом патогенеза заболевания. В 1-м и 2-м периодах сифилиса применяют микроскопическое исследование; во 2-м, 3-м и 4-м периодах используют серологические реакции (схема 21).

#### Схема 21

##### Схема микробиологического исследования при сифилисе

Материал	Отделяемое твердого шанкра, пунктат лимфатических узлов, отделяемое кожных поражений при вторичном сифилисе		Сыворотка крови, спинномозговая жидкость	
			Серологическая диагностика	
	Микроскопическое исследование	Реакция иммобилизации	Вассерман	Реакция иммобилизации трепонем
	Нативный препарат для микроскопии в темном поле	Осадочные реакции Закса и др.	реакция Виткевича	Иммунофлюоресцентное исследование
	Ответ		Ответ	

### Методические указания

**Микроскопическое исследование.** Приготавливают препарат «раздавленная» капля, который исследуют в темном поле. В положительном случае видны тонкие спирохеты длиной 6—14 мкм, имеющие 14—17 равномерных, мелких завитков правильной формы (рис. 83, а, б). Для бледной трепонемы характерно маятникообразное движение и сгибание под углом. При исследовании материала из шанкра, находящегося в полости рта, известные трудности представляет дифференциация бледной трепонемы от трепонемы ротовой

полости. В этом случае решающее значение для диагностики имеет обнаружение типичных трепонем в пунктате регионарных лимфатических узлов.

**Серологическая диагностика.** Для серологической диагностики применяют реакцию Вассермана (основанную на принципе РСК); осадочные реакции, реакцию иммобилизации трепонем, реакцию иммуофлюоресценции.

**Реакция Вассермана (табл. 31).** В отличие от других реакций реакцию Вассермана ставят с тремя антигенами: № 1—неспецифический антиген, состоящий из очищенных липидов, полученных из мышцы сердца быка, и № 2 и № 3—специфические, приготовленные из культур трепонем.

Таблица 31

Реакция Вассермана

Ингредиенты, мл	Пробирки			
	1-я	2-я	3-я	4-я (контроль)
Инактивированная испытуемая сы- воротка	0,1	0,1	0,1	0,1
Изотонический раствор хлорида натрия	0,4	0,4	0,4	0,9
Антиген серии № 1, разведенный по титру	0,5	—	—	—
Антиген серии № 2, разведенный по титру	—	0,5	—	—
Антиген серии № 3, разведенный по титру	—	—	0,5	—
Комплемент (в рабочей дозе)	0,5	0,5	0,5	0,5

В термостат на 45 мин

Гемолитическая система (сенсibili- лизированная)	1	1	1	1
---	---	---	---	---

В термостат на 40—60 мин в зависимости от наступления гемолиза в контролях

Регистрация опыта после наступления гемолиза в контроле

Результат:	+++	+++	+++	—
------------	-----	-----	-----	---

Обозначения: +++ полная задержка гемолиза; — гемолиз.



Первый период сифилиса является серонегативным и характеризуется отрицательной реакцией Вассермана. У 50% больных положительная реакция наблюдается не ранее чем через 2—3 нед после появления шанкра. Во втором и в третьем периодах сифилиса число положительных серологических реакций достигает 75—90% (серопозитивный сифилис). После специфического лечения сифилиса реакция Вассермана становится отрицательной.

Осадочные реакции Кана и Закса — Витебского (цитохолевая) (табл. 32, 33) ставят параллельно с реакцией Вассермана. По своему механизму они относятся к реакции преципитации. Для их постановки используют сыворотку, оставшуюся от реакции Вассермана, и неспецифические антигены. В цитохолевой реакции в отличие от реакции Кана применяется концентрированный антиген. Это позволяет в более короткий срок провести регистрацию результатов.

Таблица 32

Реакция Кана

Ингредиенты, мл	Пробирки					
	опытные			с контролями антигенов		
	1-я	2-я	3-я	4-я	5-я	6-я
Антиген	0,05	0,025	0,0125	0,05	0,025	0,0125
Исследуемая сыворотка	0,15	0,15	0,15	—	—	—
Изотонический раствор хлорида натрия	—	—	—	0,15	0,15	0,15
Тщательно встряхивать в течение 3 мин						
Изотонический раствор хлорида натрия	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Встряхивать 1 мин						
Результаты при положительной реакции	+++	+++	+++	—	—	—

Обозначения: +++ появление преципитата и выпадение хлопьев; — отсутствие хлопьев.

## Реакция Закса — Витебского

Ингредиенты, мл	Пробирки		
	опытная	контрольные	
		с антигеном	с сывороткой
	1-я	2-я	3-я
Исследуемая сыворотка	0,2	—	0,2
Антиген	0,1	0,1	—
Спирт 95°, разведенный 1:2	—	—	0,1
Изотонический раствор хлорида натрия	—	0,2	—
Встряхивать 1 мин, затем оставить при комнатной температуре на 30 мин			
Изотонический раствор хлорида натрия	1	1	1
Результаты при положительной реакции	+++	—	—

Обозначения те же, что и в табл. 32.

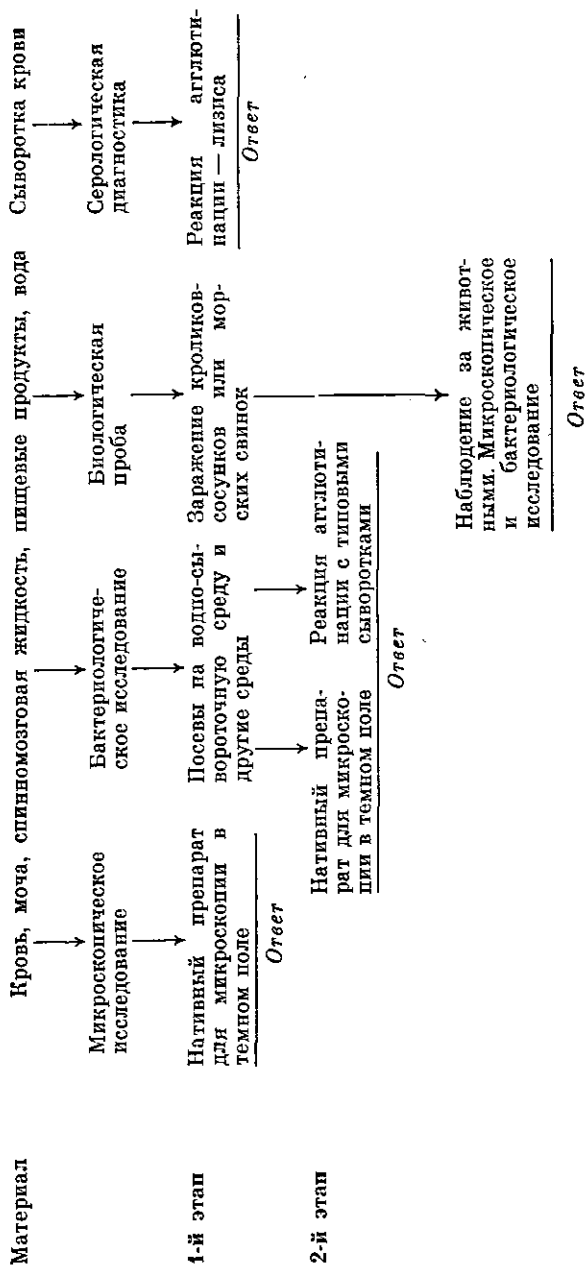
Реакция иммобилизации трепонем (тест Нельсона — Майера) является специфической реакцией для диагностики сифилиса. Принцип реакции заключается в том, что сыворотка больного сифилисом в присутствии комплемента угнетает движение бледных трепонем. Последних получают из яичка кролика, пораженного специфическим орхитом. Яичко размельчают в специальной среде, в которой трепонемы сохраняют свою подвижность. Реакция иммобилизации обладает высокой чувствительностью и остается положительной после выздоровления больного.

### Микробиологическая диагностика лептоспирозов

*Leptospira icterohaemorrhagiae* вызывает желтушную форму заболевания; *Leptospira grippotyphosa* является возбудителем безжелтушных форм.

На 1-й неделе заболевания (обычно до появления желтухи) возбудителей можно обнаружить в крови больного, при тяжелых формах с менингеальными явлениями — в спин-

Схема микробиологического исследования при лептоспирозах



Окончательный ответ

номозговой жидкости. Со 2-й недели и до 3 мес от начала болезни лептоспиры выделяются с мочой. Антитела появляются в сыворотке крови со 2-й недели заболевания. Исходя из патогенеза болезни, прибегают к тем или другим методам микробиологической диагностики лептоспирозов (схема 22).

### Методические указания

**Микроскопическое исследование.** Из материала приготавливают препарат «раздавленная» капля и исследуют в микроскопе с темнопольным конденсором или с фазово-контрастным устройством. В положительном случае видны извитые формы размером 6—9 мкм. Лептоспиры имеют первичные и вторичные завитки. Первичные завитки мелкие, плотно примыкают друг к другу (12—18 завитков) и придают лептоспирам вид жемчуга или «гирлянды роз». Вторичные завитки в виде загнутых крючкообразных концов придают лептоспирам S-образную форму. Живые лептоспиры весьма подвижны; для них характерно быстрое прямолинейное перемещение, движение по кругу и вращение на месте (рис. 84).

**Микробиологическое исследование.** Для выделения культур лептоспир используют специальные питательные среды: водно-сывороточную среду, среду Ферворта — Вольфа (пептонная вода с фосфатной буферной смесью и

инактивированной кроличьей сывороткой). Материал засевают в 3—5 пробирок. Среда в пробирках после посева заливают вазелиновым маслом и инкубируют при 28°С в течение 3 мес, так как лептоспиры растут очень медленно — время развития одной генерации лептоспир в логарифмической фазе достигает 58—68 ч. При размножении лептоспиры не изменяют пита-

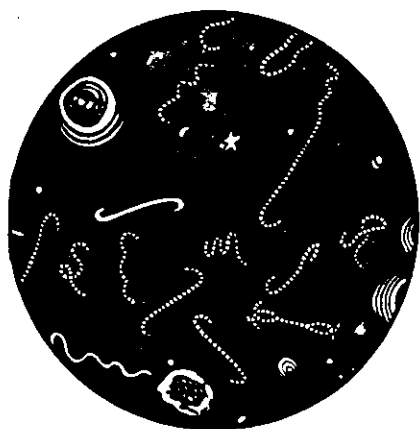


Рис. 84. Лептоспиры инфекционной желтухи. Темнопольная микроскопия.

тельной среды, которая остается прозрачной в течение всего времени наблюдения. Рост контролируют не реже чем через 5—6 дней путем микроскопии препаратов «раздавленной» капли в темнопольном или фазово-контрастном микроскопе.

Идентификацию выделенных культур лептоспир проводят в реакции агглютинации с типовыми агглютинирующими сыворотками, а также применяют метод адсорбции сывороток.

**Биологическая проба.** Заражают морских свинок, кроликов-сосунков или других животных. Морские свинки и белые мыши обладают неодинаковой чувствительностью к разным типам лептоспир: они чувствительны к заражению *L. icterohaemorrhagiae* и не чувствительны к заражению *L. grippotyphosa* и другими возбудителями безжелтушных лептоспирозов. В то же время кролики-сосунки и дикие грызуны (золотистые хомяки, суслики, степные пеструшки) чувствительны к любым возбудителям лептоспирозов. Зараженных животных наблюдают до 30 дней (ежедневно взвешивают, измеряют температуру). В случае болезни или гибели животного исследуют препараты из крови, мочи, секционного материала (при микроскопии в темном поле) и делают посевы для выделения культуры лептоспир.

**Серологическая диагностика.** Ставят реакцию агглютинации-лизиса с живыми лабораторными культурами лептоспир разных видов и типов. Техника постановки реакции общепринятая, учет результатов проводят в препаратах «раздавленной» капли в темном поле или при фазово-контрастной микроскопии. Отмечают феномен лизиса и агглютинации. Реакция агглютинации сопровождается, как правило, лизисом лептоспир. В первых разведениях сыворотки наблюдается полное растворение лептоспир, частичный лизис или зернистое набухание, в последующих разведениях — агглютинация лептоспир и появление аггломератов в виде «паучков». Диагностический титр реакции 1:100. Максимальный титр антител (1:10 000—1:20 000 и выше) обнаруживают на 15—30-й день от начала болезни. У части переболевших антитела сохраняются длительное время (годами и десятками лет), поэтому серологическое исследование имеет значение и для ретроспективной диагностики.

## Диагностические, профилактические и лечебные препараты

**Лептоспирозный антиген** — живая, 7—10-дневная культура лептоспир. Применяется для серологической диагностики лептоспирозов путем постановки реакций агглютинации и лизиса.

**Специфические сифилитические антигены** для реакции Вассермана готовят из культуры трепонем путем выделения антигенной фракции или обработки ультразвуком («озвученный антиген»).

**Неспецифические антигены** для реакции Вассермана и осадочных реакций представляют собой липиды нормальных тканей, кардиолипиновый антиген — высокоочищенный экстракт из бычьего сердца с добавлением лецитина и холестерина.

**Лептоспирозная убитая вакцина** приготовлена из культур трех типов лептоспир, убитых нагреванием и консервированием фенолом. Применяется для активной иммунизации.

### Контрольные вопросы

1. Классификация спирохет и их роль в патологии человека.
2. Общие свойства спирохет, их отличия от бактерий и простейших.
3. Биологические признаки бледной трепонемы и особенности ее культивирования.
4. Патогенетические особенности и характер иммунитета при сифилисе. Что такое шанкерный иммунитет?
5. Назовите антибиотики и химиопрепараты, применяемые для лечения сифилиса. Механизм их действия.
6. Как проводится микробиологическая диагностика сифилиса?
7. Серологические реакции, применяемые при диагностике сифилиса. Какие периоды называют серонегативным и серопозитивным?
8. Объясните механизм реакции Вассермана и осадочных реакций. Почему возможно применение неспецифических антигенов в этих реакциях?
9. Специфические реакции, применяемые при серологической диагностике сифилиса.
10. Биологические признаки возбудителей эпидемического и эндемического возвратного тифа.
11. Как проводится микробиологическая диагностика возвратного тифа? Дифференцирование возбудителей эпидемического и эндемического возвратного тифа?
12. Классификация лептоспир и их роль в патологии человека.
13. Как происходит заражение лептоспирами? Патогенетические особенности и характер иммунитета при лептоспирозах?
14. Как проводится микробиологическое исследование при лептоспирозах и определение видовой и типовой принадлежности лептоспир?
15. Препараты, применяемые для специфической профилактики лептоспирозов.

## МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ, ВЫЗВАННЫХ РИККЕТСИЯМИ

Возбудители риккетсиозов — риккетсии относятся к порядку Rickettsiales семейству Rickettsiaceae, которое включает два рода: Rickettsia и Coxiella.

Риккетсии паразитируют как на позвоночных, так и на беспозвоночных (членистоногих). Патогенные риккетсии через кровососущих членистоногих заражают млекопитающих и человека.

По своим морфологическим признакам и химическому составу риккетсии похожи на бактерии, а по своим физиологическим свойствам они приближаются к вирусам. Все риккетсии являются облигатными внутриклеточными паразитами и не растут на искусственных питательных средах.

Для выделения риккетсий от животных и человека используют вирусологические методы (заражение экспериментальных животных, тканевых культур и куриных эмбрионов). Наиболее широкое применение при риккетсиозах получили серологические методы диагностики.

### Тема 26. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА СЫПНОГО ТИФА И ДРУГИХ РИККЕТСИОЗОВ

#### Программа занятия

1. Изучение схемы микробиологической диагностики риккетсиозов.
2. Методы выявления и идентификации риккетсий.
3. Серологическая диагностика риккетсиозов.
4. Диагностические и профилактические препараты, применяемые при риккетсиозах.

#### Демонстрация

1. Микропрепараты риккетсий в пораженных клетках и чистой культуре (сыпнотифозная вакцина), окрашенные по методу Здродовского.
2. Методы выделения риккетсий с помощью заражения животных, куриных эмбрионов и тканевых культур.
3. Риккетсиозные диагностические и профилактические препараты: антигены корпускулярные, растворимые, сыпнотифозная вакцина, вакцина против Ку-лихорадки.

## Задание студентам для выполнения лабораторной работы

1. Учесть результаты реакции агглютинации риккетсий с сыворотками больных эпидемическим и крысиным сыпным тифом (схема 23). Определить титр агглютининов в реакциях с антигенами из риккетсий Провачека и Музера, сопоставить результаты и обосновать серологический диагноз.

2. Учесть результаты РСК при дифференцировании первичного (эпидемического) и повторного сыпного тифа (болезни Брилля — Цинссера), используя данные табл. 35.

## Методические указания

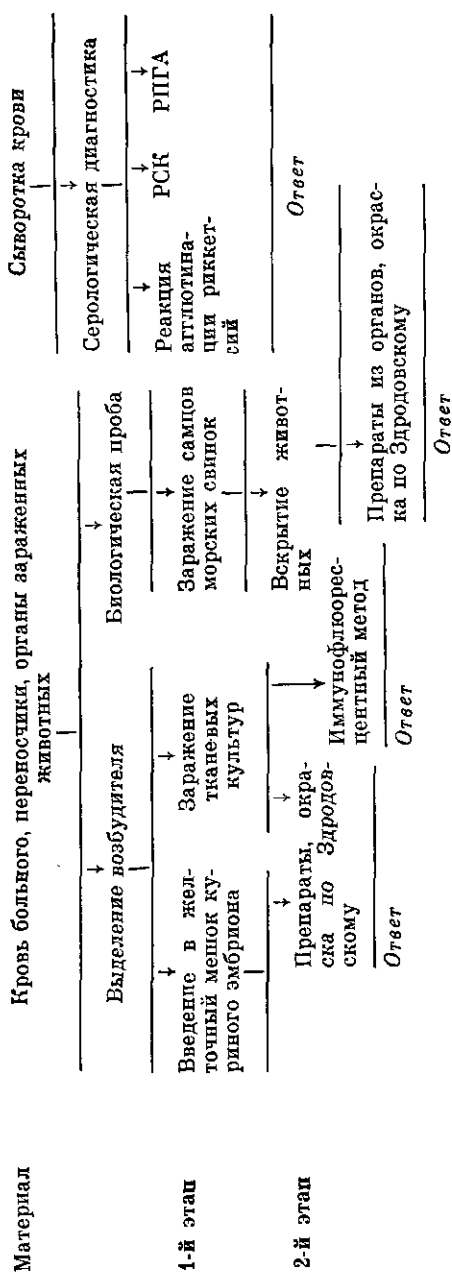
**Микробиологическое исследование.** Материалом для выделения возбудителя при всех видах риккетсиозов служит кровь, взятая у больного из вены в возможно раннем периоде лихорадки. Обычно используют цитратную кровь или взвесь из растертого сгустка свернувшейся крови. Исследуемый материал вводят внутривентриально самцам морских свинок, поскольку при большинстве эндемических риккетсиозов (в отличие от эпидемического сыпного тифа) у них развивается специфический периорхит с накоплением риккетсий в мезотелии влажных оболочек яичка. При эпидемическом сыпном тифе выделение морфологически видимых риккетсий обычно не удается и приходится прибегать к предварительному накоплению риккетсий в кшечнике платяных вшей, заражаемых кровью сыпнотифозного больного. Для выделения риккетсий проводят заражение исследуемым материалом в желточный мешок развивающихся куриных эмбрионов или в первично трипсинизированные и перевиваемые тканевые культуры. Для обнаружения риккетсий в переносчиках, органах зараженных животных и тканевых культурах может быть использована микроскопия препаратов, окрашенных по Здродовскому. Для риккетсий, в частности, риккетсий Провачека характерен выраженный полиморфизм в зависимости от фазы инфекции, от паразитизма в различных тканях и от других условий. Различные морфологические типы риккетсий обнаруживаются в цитоплазме и ядрах зараженных клеток (рис. 85). Эффективным методом выявления риккетсий в зараженных клетках является иммунофлюоресцентный метод Кунса.

Выделение, культивирование и идентификацию риккетсий проводят в специализированных лабораториях, а в условиях обычных лабораторий применяют только серологические методы и кожно-аллергические пробы.



Схема 23

Схема микробиологического исследования при риккетсиозных инфекциях



При серологической диагностике риккетсиозов применяются реакции агглютинации, РПГА и РСК (см. схему 23).

**Реакция агглютинации риккетсий** применяется для серологической диагностики всех риккетсиозов, поскольку характеризуется высокой специфичностью. Реакция ставится в пробирках в объеме 0,5 мл. Двукратные разведения испытуемых сывороток приготавливают, начиная с разведения 1 : 50, 1 : 100. К каждому разведению сыворотки в объеме 0,25 мл добавляют по 0,25 мл соответствующих антигенов. Через 18 ч инкубации при 37°С учитывают результаты реакции, не встряхивая пробирок. Интенсивность реакции обозначают следующим образом: + + + + полное просветление, нежный, мелкозернистый осадок на дне пробирки в виде зонтика; + + + неполное просветление, осадок тот же; + + незначительное просветление, зернистый осадок; + незначительная зернистость во взвеси. Положительной считается реакция не менее чем + + (табл. 34).

**Реакцию связывания комплемента** при риккетсиозах ставят по общепринятой методике (см. с. 137) с использованием корпускулярных и растворимых антигенов риккетсий. Реакция считается положительной при задержке гемолиза не менее чем + +.

**Реакция пассивной гемагглютинации.** В РПГА используют растворимый риккетсиозный антиген, адсорбированный на поверхности эритроцитов. РПГА ставится с разведениями испытуемых сывороток от 1:250 до 1:64 000 по обычной схеме (см. с. 128).

В отличие от РСК с помощью РПГА нельзя провести внутригруппового дифференцирования риккетсиозов. Однако РПГА позволяет выявить фазу риккетсиозной инфекции, поскольку гемагглютинирующие антитела, накапливающиеся в высоком титре на протяжении инфекционного процесса, быстро снижаются в периоде реконвалесценции и через 6 мес обычно не обнаруживаются. Использование РСК в сочетании с РПГА дает возможность дифференцировать текущее заболевание от перенесенного в прошлом.

**Серологическое дифференцирование первичного (эпидемического) и повторного сыпного тифа (болезнь Брилля).** Возможность серологического дифференцирования первичного и повторного тифа связана с тем, что при первичном и повторном сыпном тифе формируются качественно различные иммуноглобулины (Ig): при первичном — IgM (19S), при повторном — IgG (7S). Дифференцирование IgM и IgG антител основана на их различной чувствительности к дей-



ствию редуцирующих веществ, содержащих свободные сульфгидрильные группы (2-меркаптоэтанол, цистеин и др.). Эти вещества вызывают разрыв дисульфидных связей в молекулах IgM и их распад на субъединицы, лишённые активности антител. IgG при этом не изменяются. Параллельно ставят РСК с испытуемой исходной сывороткой и обработанной 2-меркаптоэтанолом или цистеином.

В случае первичного (эпидемического) сыпного тифа, для которого характерно преобладание IgM антител, наблюдается снижение титра антител в обработанной сыворотке не менее чем в 4 раза по сравнению с необработанной исходной сывороткой (табл. 35).

Таблица 35

Результаты РСК при дифференцировании первичного сыпного тифа от болезни Брилла

Сыворотка	Разведения сыворотки									
	1:50	1:100	1:200	1:300	1:400	1:500	1:600	1:700	1:800	1:1000
Обработанная 2-меркаптоэтанолом	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Не обработанная 2-меркаптоэтанолом	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

При повторном сыпном тифе (болезни Брилла), где преобладают IgG, титр антител в обеих сыворотках должен быть одинаковым (допускается снижение титра не более чем в 2 раза).

### Диагностические, профилактические и лечебные препараты

**Риккетсиозные антигены сухие корпускулярные** — взвесь убитых риккетсий, выращенных в желточном мешке куриных эмбрионов, хорошо очищенная от посторонних тканевых элементов. Применяется для постановки реакции агглютинации, РИГА и РСК.

**Риккетсиозные антигены сухие растворимые** — антигенные субстанции, полученные путем экстракции в сочетании

с обработкой эфиром риккетсиозных суспензий. Применяются при постановке РСК и РПГА, обладают более высокой активностью по сравнению с корпускулярными антигенами.

Сухая живая комбинированная сыпнотифозная вакцина Е (ЖКСВ-Е) представляет собой смесь живой яичной культуры риккетсий Провачека вакцинного штамма Е, выращенной в курином эмбрионе, с растворимым антигеном вирулентного штамма риккетсий Провачека. Применяется для активной иммунизации против сыпного тифа.

Сухая живая вакцина М-44 представляет собой высушенную взвесь вакцинного штамма (мутант-44) риккетсий Бернета, выращенных в курином эмбрионе. Применяется для профилактики Ку-лихорадки.

### Контрольные вопросы

1. Классификация риккетсий и их основные биологические признаки.
2. Что общего у риккетсий с бактериями и какие свойства сближают их с вирусами?
3. Какими особенностями метаболизма риккетсий можно объяснить их внутриклеточный паразитизм? Методы, применяемые для культивирования риккетсий.
4. Каким образом резервуар риккетсиозной инфекции поддерживается в природе без участия человека?
5. Механизм заражения и особенности патогенеза сыпного тифа.
6. Являются ли членистоногие при всех риккетсиозах только переносчиками заболевания?
7. Чем отличаются риккетсии Бернета от остальных риккетсий?
8. Можно ли выделить возбудителя из организма больного сыпным тифом в период лихорадки? Если можно, то как это сделать?
9. Как исследуют клеща, отловленного в эндемическом очаге риккетсиоза, для выявления его зараженности риккетсиями?
10. Как выделить возбудителя из организма больного эндемическим риккетсиозом?
11. Почему для биологической пробы при диагностике риккетсиозов используют самцов, а не самок морских свинок?
12. Как дифференцировать эпидемический сыпной тиф от эндемического? Лабораторные методы, применяемые для этой цели.
13. Какие серологические реакции применяются для обнаружения противриккетсиозных антител в сыворотках здоровых людей?
14. Как отличить первичную инфекцию — эпидемический сыпной тиф от повторной инфекции — болезни Брилля—Цинссера, вызванной тем же возбудителем?

## МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ, ВЫЗЫВАЕМЫХ ПАТОГЕННЫМИ ГРИБАМИ

Заболевания, вызываемые грибами (mycetes), — микозы чрезвычайно разнообразны как по биологическим особенностям их возбудителей, так и по патогенезу и клинике самой болезни. Раздел микробиологии, занимающийся изучением патогенных грибов, называется медицинской микологией.

Среди патогенных грибов можно выделить следующие группы: 1) дерматофиты — возбудители заболеваний кожи и ее придатков (волос, ногтей); 2) грибы рода Кандида — возбудители кандидозов или кандидамикозов — заболеваний кожи и слизистых оболочек, редко внутренних органов; 3) криптококки, гистоплазмы, бластомицеты, кокцидиоиды, а также плесневые грибы — возбудители глубоких микозов, поражающие самые разнообразные органы и ткани.

Микробиологическая диагностика микозов проводится главным образом путем микроскопического и культурального исследований. Идентификацию и дифференцирование выделенной чистой культуры гриба проводят по морфологическим, культуральным и биохимическим признакам и в некоторых случаях — по антигенной структуре. Определение патогенных свойств грибов в опытах на животных во многих случаях не удается. Серологическая диагностика микозов недостаточно разработана. Аллергические пробы самостоятельного значения не имеют, так как аллергены, полученные из грибов, являются недостаточно специфическими.

### Тема 27. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА МИКОЗОВ И КАНДИДАМИКОЗОВ

Дерматофиты являются возбудителями фавуса, трихофитии, микроспории и эпидермофитии. Они принадлежат соответственно к родам *Achorion*, *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*, которые относятся к группе несовершенных грибов.

Заражение людей происходит при непосредственном контакте с больными людьми и животными, а также через игрушки, банные принадлежности, головные уборы и прочие вещи.

Возбудителями кандидозов являются грибы рода *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*). Они обитают на коже и слизистых оболочках человека, а также домашних птиц и некоторых животных, на плодах, ягодах.

#### Программа занятия

1. Изучение схемы микробиологической диагностики кандидозов.
2. Микроскопические, культуральные и серологические методы диагностики грибковых заболеваний.
3. Демонстрация диагностических, профилактических и лечебных препаратов, применяемых при микозах.

#### Демонстрация

1. Препараты из чистых культур грибов рода *Candida*.
2. Мазки из патологического материала от больных, пораженных кандидозом (окраска гевициановым фиолетовым).
3. Типы филаментации грибов рода *Candida* на картофельном агаре.
4. Колонии патогенных грибов на плотной питательной среде.
5. Реакции связывания комплемента и агглютинации при серологической диагностике висцерального кандидамикоза.
6. Диагностические, профилактические и лечебные препараты:  
а) грибковые антигены для серологических реакций; б) грибковые аллергены; в) противогрибковые антибиотики: нистатин, леворин, гризеофульвин.

#### Задание студентам для выполнения лабораторной работы

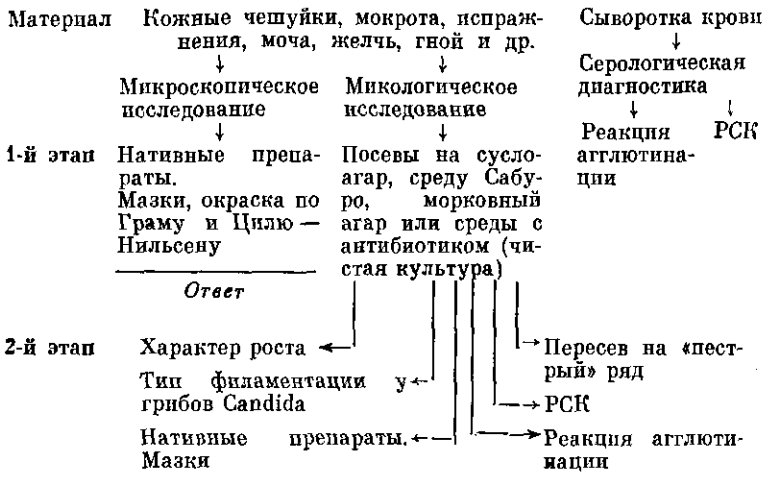
1. Микроскопическое исследование при дерматомикозах. Материал: пораженные волосы, кожные чешуйки. Приготовить препарат для микроскопии и поставить микроскопический диагноз заболевания трихофитии, микроспории, фавуса или эпидермофитии.
2. Определить видовую принадлежность дрожжеподобного гриба рода *Candida* на основании морфологии клеток и колоний, типа филаментации и биохимических свойств, используя данные схемы 24 и рис. 87.

#### Методические указания

**Микроскопическое исследование.** Для приготовления препарата на предметное стекло наносят каплю 10% едкой щелочи или спирта с глицерином, в которую помещают 2—3 подозрительных волоса или несколько кожных чешуек, или беловатые влажные палеты со

## С х е м а 24

### Схема микробиологического исследования при кандидозах



*Окончательный ответ*

слизистых оболочек. Препарат (со щелочью) осторожно подогревают над пламенем до появления белого ободка из кристаллов щелочи по периферии капли, не доводя ее до кипения. Затем каплю накрывают покровным стеклом и рассматривают под микроскопом с объективом 8 и 40.

При фавусе в волосе обнаруживают полиморфные грибковые элементы. Наряду с тонким мицелием встречается мицелий широкий, состоящий из прямоугольных клеток. Часто наблюдаются споры круглой или прямоугольной формы, а также пузырьки воздуха.

При трихофитии локализация элементов гриба в патологическом материале может быть различной. Споры гриба *Trichophyton* располагаются либо только внутри пораженного волоса, сплошь заполняя его содержимое (эндотрикс), либо несколькими слоями окружают волос снаружи в виде чехла (эктотрикс), либо споры и мицелий находятся как внутри, так и снаружи волоса (эндоектотрикс).

При микроспории волос окружен в своей фолликулярной части «чехлом» из мозаично расположенных мелких спор гриба. Внутри волоса обнаруживаются фрагменты гриба и споры (рис. 86).



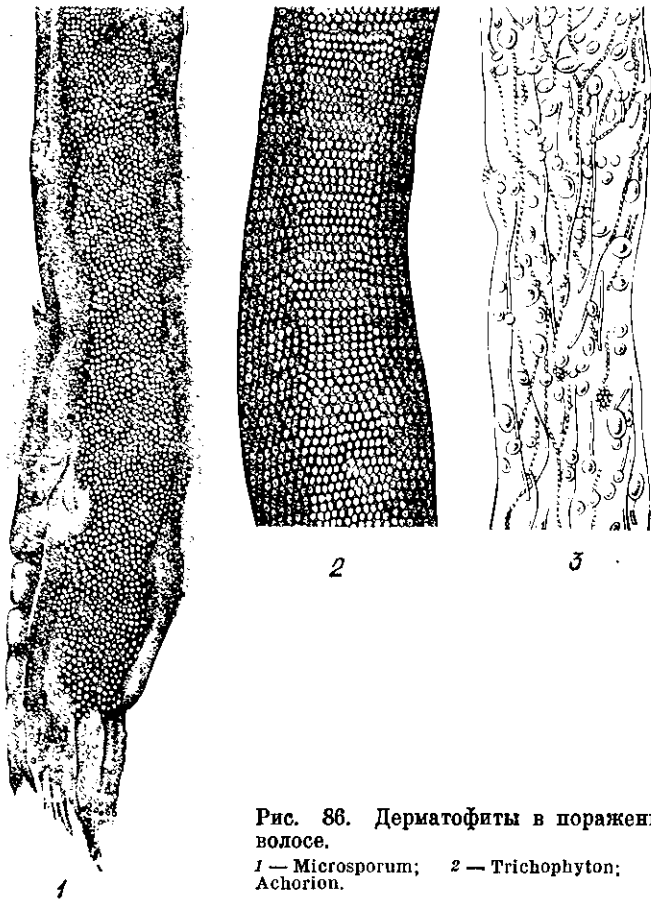


Рис. 86. Дерматофиты в пораженном волосе.  
 1 — *Microsporum*; 2 — *Trichophyton*; 3 — *Achorion*.

При эпидермофитии элементы гриба содержатся в чешуйках кожи, где они располагаются в виде толстых септированных ветвящихся нитей мицелия наряду со спорами многогранной формы.

При кандидамикозах в патологическом материале видны одноклеточные грамположительные микроорганизмы круглой и овальной формы, не образующие истинных спор и истинного мицелия. Грибы рода *Candida* формируют псевдомицелий, который отличается от истинного отсутствием общей оболочки и перегородок и состоит из длинных, тонких клеток, соприкасающихся друг с другом узким основа-

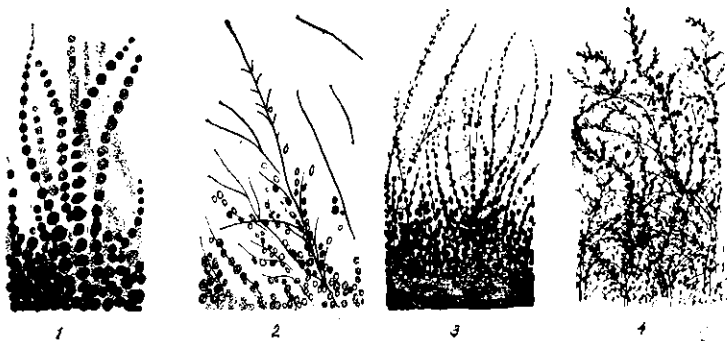


Рис. 87. Типы роста (филаментации) дрожжеподобных грибов рода *Candida*.

1— *mycotorula*; 2— *mycotoruloides*; 3— *candida*; 4— *mycocandida*.

нием. Для установления диагноза «кандидоз» необходимы многократные количественные посевы патологического материала на агаровую среду в чашки Петри. Нарастающее количество колоний, обнаруженных в посевах, а также антител в сыворотке крови подтверждает диагноз.

Культуральное исследование проводят для установления родовой и видовой принадлежности возбудителя путем выделения чистой культуры гриба и изучения его биологических свойств. Материал предварительно обрабатывают кислотами или антибиотиками. Затем делают посев на сахарный мясо-пептонный агар, сусло-агар (приготавливается из неохмеленного пивного сусла), агар Сабуро (пептонная вода с мальтозой и агар-агаром), овощные среды (морковный агар), куда добавляют антибиотики для задержки роста бактериальной флоры. Посевы инкубируют при 30° С. В положительных случаях рост наблюдается на 3—5-е сутки в виде разнообразных колоний: гладких, кожистой консистенции, морщинистых, мучнистых, пушистых, часто пигментированных. При микроскопии препаратов, приготовленных из культур, хорошо заметен развитой, широко ветвящийся септированный мицелий. Органами размножения служат споры, которые могут быть внутренними (эндоспоры), расположенными внутри мицелия, и наружными (экзоспоры), расположенными на концах или по сторонам мицелиальных нитей. Специальных органов плодоношения типа асков (сумок) у дерматофитов не обнаружено, что дало основание отнести их к несовершенным грибам (*Fungi imperfecti*).

Грибы рода *Candida* на 2—3-й день после посева образуют мелкие, выпуклые колонии, которые нередко сливаются в мощные образования, растущие в среду.

Идентификацию грибов рода *Candida* проводят на основании данных микроскопии патологического материала, культуральных признаков, биохимической активности, типов роста (филаментации) (рис. 87) и патогенности, которую определяют при заражении лабораторных животных. При культивировании на картофельном агаре дрожжеподобные грибы образуют несколько типов роста, отличающихся друг от друга по характеру клеточных элементов и расположению бластоспор (см. с. 37).

## Тема 28. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ГЛУБОКИХ МИКОЗОВ

Возбудителями глубоких микозов являются грибы *Cryptococcus neoformans*, вызывающие криптококкоз, *Histoplasma* — гистоплазмоз, *Blastomyces* — бластомикоз, *Coccidioides* кокцидиоидоз, *Actinomyces* — актиномикоз и др.

Микробиологическая диагностика проводится путем микроскопического исследования, при котором выявляются характерные морфологические особенности возбудителя, и путем микологического исследования, т. е. выделения чистой культуры гриба.

### Диагностические, профилактические и лечебные препараты

**Кандидозный антиген** — взвесь двухсуточной агаровой культуры грибов рода *Candida* в изотоническом растворе хлорида натрия. Применяется для постановки реакции агглютинации при кандидозах.

**Кандидозный антиген для РСК** — спирто-водный экстракт из культуры грибов рода *Candida*. Применяется для постановки РСК и кожно-аллергических проб при кандидозах.

**Антибиотики противогрибковые:** нистатин, леворин, гризеофульвин (см. табл. 10).

### Контрольные вопросы

1. Назовите грибы — возбудители дерматомикозов и глубоких микозов.
2. На основании каких признаков дифференцируют дрожжеподобные грибы от истинных дрожжей?

3. Поражения, вызываемые дрожжеподобными грибами рода *Candida*. На основании каких признаков проводится их дифференцирование?

4. Какие факторы оказывают влияние на развитие кандидозов?

5. Почему нельзя поставить окончательный диагноз кандидоза только на основании положительного микроскопического исследования? Какие дополнительные исследования необходимы для постановки окончательного диагноза?

6. Какие грибы относятся к дерматомицетам и на основании каких признаков проводят их дифференцирование?

7. Какие микроскопические изменения в волосе обнаруживаются при микроспории, трихофитии и фавусе?

8. Методы лабораторной диагностики дерматомикозов при массовом обследовании больных.

9. Какие методы используются для микробиологической диагностики глубоких микозов?

10. Дайте характеристику химиопрепаратам, используемым для лечения микозов.

## ВИРУСОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ, ВЫЗЫВАЕМЫХ ВИРУСАМИ

Для вирусологической диагностики вирусных инфекций используются вирусологические, серологические и биологические методы исследования. Среди них наиболее трудоемкими являются вирусологические методы, которые заключаются в заражении вирусосодержащим материалом культур ткани или куриных эмбрионов. В связи с различным спектром цитопатического действия вирусов в отношении культур тканей приходится одновременно заражать несколько первичных или перевиваемых культур. Некоторые вирусы могут быть обнаружены при заражении исследуемым материалом лабораторных животных.

Идентификацию выделенных вирусов проводят с помощью серологических реакций: нейтрализации (РН), связывания комплемента (РСК), торможения гемагглютинации (РТГА), преципитации в агаре. Выбор той или иной реакции связан с особенностями антигенной структуры исследуемого вируса. Выделение вируса и его идентификация требуют сравнительно больших затрат времени, примерно от 7—10 дней до 30 и более. Это объясняется тем, что во многих случаях приходится 2—3 раза пассировать вирус в тканевой культуре для его накопления. Поэтому особое значение для ускорения сроков проведения анализов имеет иммунофлюоресцентный метод, который дает возможность в некоторых случаях в течение 30—60 мин обнаружить и идентифицировать вирус в исследуемом материале.

Серологическая диагностика вирусных инфекций в основном носит ретроспективный характер и применяется для подтверждения диагноза и эпидемиологического анализа. Чаще всего ставят РСК и РТГА, реже РН не менее чем с двумя сыворотками крови одного и того же больного, взятыми в разные сроки заболевания (парные сыворотки) для обнаружения нарастания титра антител.

### Тема 23. ВИРУСОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ ЭНТЕРОВИРУСАМИ

Энтеровирусы (вирусы полиомиелита, Коксаки и ЕСНО) относятся к семейству Picornaviridae (рис. 88).

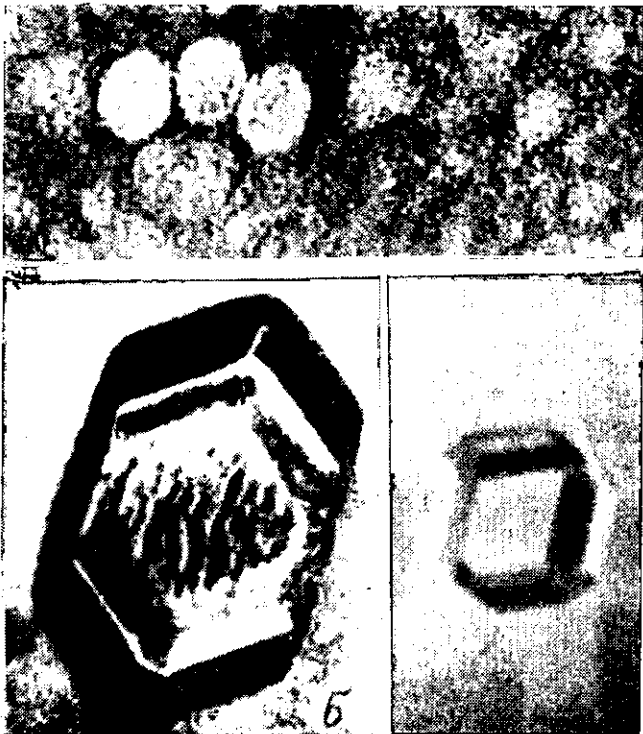


Рис. 88. Вирусы полиомиелита.

а — вирионы вируса полиомиелита. Электронная микроскопия.  $\times 400\ 000$ ; б — кристаллы вируса полиомиелита.

Лабораторная диагностика энтеровирусных инфекций проводится по двум основным направлениям.

1. Выделение вируса с последующим его дифференцированием и серологическим типированием, главным образом в РСК и реакции нейтрализации (РН). Последние методы дали возможность выделить среди полиовирусов 3 серотипа, среди вирусов Коксаки — группу А (24 серотипа) и группу В (6 серотипов) и среди вирусов ЕСНО 34 серотипа.

2. Определение титра антител в парных сыворотках, полученных от больных в остром периоде и через 3—4 нед после пачала заболевания.

#### Программа занятия

1. Изучение схемы диагностики энтеровирусных инфекций.
2. Вирусологическая диагностика энтеровирусных инфекций.

3. Серологическая диагностика энтеровирусных инфекций.
4. Диагностические, профилактические и лечебные препараты, применяемые при энтеровирусных инфекциях.

### Демонстрация

Диагностикумы, сыворотки и вакцины, применяемые при энтеровирусных инфекциях.

### Задание студентам для выполнения лабораторной работы

1. Произвести первичное заражение тканевой культуры предварительно обработанными фекалиями больного полиомиелитом.
2. Учесть результаты первичного заражения тканевой культуры на 7-й день после заражения. Отметить наличие или отсутствие цитопатического действия, его тип и в зависимости от этого наметить план дальнейшего вирусологического исследования.
3. Учесть результаты идентификации полиовирусов в реакции пейтрализации в тканевой культуре с помощью цветной пробы (табл. 36).

Таблица 36

### Реакция нейтрализации для идентификации полиовирусов

Типы вирусов	Сыворотки типоспецифические			Контроль		
	I	II	III	сыворотки	вируса	культуры ткани
I	Ж	К	К	Ж	К	Ж
II	К	Ж	К	Ж	К	Ж
III	К	К	Ж	Ж	К	Ж

Обозначения: Ж — желтое окрашивание среды в пробирках с культурами ткани; К — красное окрашивание.

Дать заключение по вирусологической диагностике.

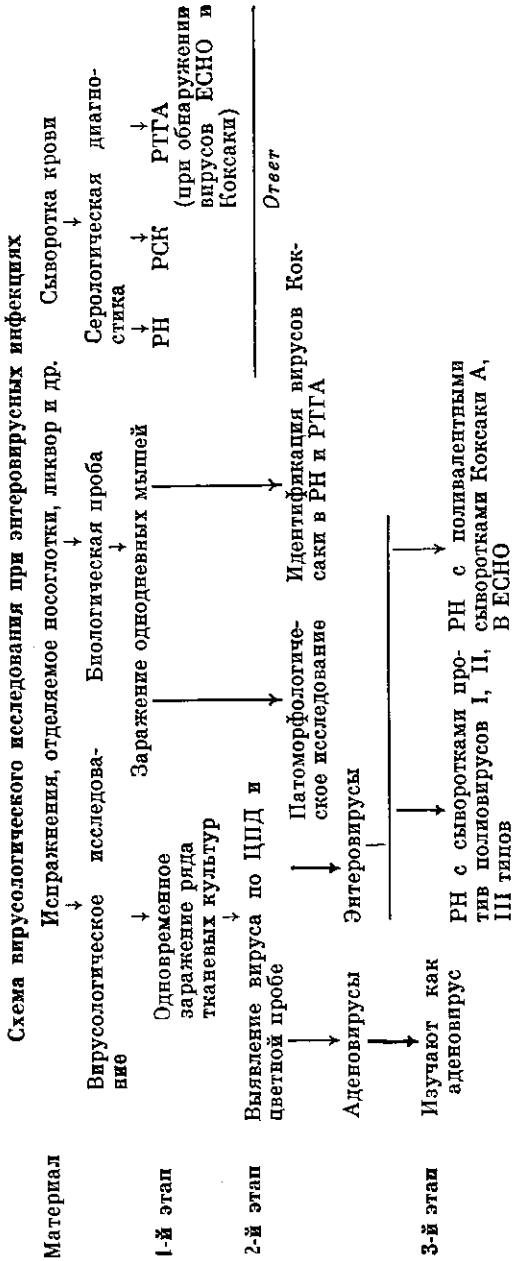
4. Учесть результаты реакции нейтрализации с парными сыворотками в тканевой культуре с помощью цветной пробы.

Обосновать серологический диагноз заболевания.

### Методические указания

**Вирусологическое исследование.** Испражнения исследуют в первые 2 нед с начала заболевания. Из них готовят равномерную суспензию в изотоническом растворе хлорида натрия или растворе Хенкса, которую центрифугируют. Надосадочную жидкость собирают, к ней добавляют пенициллин и стрептомицин и выдерживают в течение 1—2 ч при комнатной температуре для подавления бактериальной флоры. Отделяемое носоглотки берут в первые 3 дня заболевания сухими тампонами с задней стенки носоглотки,

Схема 25



Окончательный ответ



миндалин и из носа. Тампоны помещают в пробирку с изотоническим раствором хлорида натрия. Затем производят обработку антибиотиками.

Выделение вирусов в тканевых культурах. Одновременно заражают не менее двух различных культур клеток. Чаще используют первичную культуру почек обезьян и перевиваемые клетки амниона человека или клетки HeLa. Зараженные культуры инкубируют при 35°C. Все типы энтеровирусов (за исключением некоторых вирусов типов Коксаки А) вызывают цитопатическое действие (ЦПД), которое чаще всего отмечается на 5—7-й день в виде равномерно распределенной мелкозернистой деструкции клеток.

Типирование полиовирусов проводят в РСК с тремя сыворотками (к каждому типу), так как полиовирусы не имеют общего комплементсвязывающего антигена. РСК ставят по общей методике (см. с. 140). Для типирования используют также РН в тканевой культуре почечных клеток обезьян или клеток HeLa. Тканевую цитопатическую дозу вируса (ТЦД) определяют в предварительном опыте. Для этого готовят десятикратные разведения вируса от  $10^{-1}$  до  $10^{-7}$  и по 0,1 мл каждого разведения вносят в 3—4 пробирки с культурой ткани. Максимальное разведение вируса, вызывающее ЦПД в 50% пробирок, соответствует 1 ТЦД<sub>50</sub>.

Для дифференцирования и идентификации выделенных энтеровирусов ставят РН со стандартными поливалентными сыворотками или смесью, приготовленной из моновалентных сывороток (против отдельных типов вирусов Коксаки и ЕСНО). Для постановки РН смешивают равные объемы сыворотки и взвеси вируса, содержащей в 0,1 мл 100 ТЦД<sub>50</sub>. После 3-часовой экспозиции при 37°C по 0,2 мл каждой смеси вносят в пробирки с тканевыми культурами клеток, которые инкубируют при 35°C. Регистрацию результатов проводят после появления ЦПД в контрольных культурах, зараженных теми же дозами вируса (примерно через 5—7 дней после постановки реакции). Типовую принадлежность вируса при необходимости проверяют в РН с моновалентной сывороткой.

Результаты реакции нейтрализации можно учитывать не только по отсутствию ЦПД, но и с помощью цветной пробы (рис. 89). Последняя основана на способности клеток тканевой культуры изменять РН среды продуктами своего метаболизма, вследствие чего содержащийся в ней

индикатор (фенолрот) изменяет цвет из красного в желтый. При заражении тканевой культуры вирусом происходит разрушение клеток и сохранение первоначального красного цвета среды. Нейтрализация вируса иммунной сывороткой не нарушает метаболических процессов в тканевой культуре, в результате чего так же, как и в первом случае, происходит изменение цвета среды (см. табл. 36).

Биологическую пробу применяют для выделения вирусов Коксаки А и В и полиовируса II типа, а также для идентификации вирусов Коксаки. Для этого используют мышей-сосунков 1—4-дневного возраста. Более взрослые мыши невосприимчивы к данным вирусам.

Материал вводят внутривентриально и подкожно, реже — в мозг. Если на 5—6-й день мыши не погибли, их забивают, из головного мозга и тушки готовят суспензию, которую после обработки антибиотиками вводят мышам-сосункам для проведения 2-го пассажа и т. д. При отрицательном результате, полученном после 3-го пассажа, исследование заканчивают.

**Серологическая диагностика.** При полиомиелите ставят РСК с парными сыворотками, взятыми от больного в начале заболевания и через 3—4 нед после начала болезни. В качестве антигенов используют эталонные штаммы трех типов полиовируса. Применяют также РН с тремя типами вируса в чувствительных культурах клеток, которую учитывают по цитопатическому эффекту, цветной пробе или методом бляшек.

При заболеваниях, вызванных вирусами Коксаки и ЕСНО, используют РН, которую учитывают по цитопатическому эффекту или по цветной пробе, а с вирусами Коксаки А реакцию проводят на мышах-сосунках. Увеличение титра антител во второй сыворотке по сравнению с первой не менее чем в 4 раза к одному и тому же эталонному штамму (антигену) свидетельствует, что возбудителем заболевания является вирус данного серологического типа. При заболеваниях, вызванных вирусами ЕСНО, также ставят РТГА, так как эти вирусы обладают гемагглютинирующими свойствами.

#### **Диагностические, профилактические и лечебные препараты**

Поливалентная и типоспецифические полиомиелитные сыворотки I—III типов. Применяются для типирования вирусов полиомиелита.

**Поливалентные и типоспецифические (моновалентные) сыворотки Коксаки и ЕСНО.** Применяются для дифференцировки и типирования соответствующих вирусов.

**Полиомиелитная пероральная живая вакцина.** Содержит аттенуированные штаммы вирусов полиомиелита I — III типов, выращенных на культуре ткани почек африканских зеленых марышек. Вакцина выпускается в жидком виде и в форме конфет-драже для перорального применения.

**Иммуноглобулин нормальный человеческий** содержит антитела различной специфичности и получается из крови человека (донорской, плацентарной или абортивной) путем фракционирования. Применяется для профилактики и лечения полиомиелита.

#### Контрольные вопросы

1. Какие вирусы относятся к энтеровирусам и почему?
2. Биологические особенности энтеровирусов. Какие признаки используются для их дифференцирования между собой и от других вирусов?
3. Перечислите патологические материалы, используемые для выделения энтеровирусов.
4. Как учитывают результаты реакции нейтрализации (РН) при диагностике полиомиелита.
5. Можно ли провести серодиагностику полиомиелита, располагая лишь одной сывороткой, полученной от больного в острый период заболевания?
6. Какой энтеровирус можно выделить только путем заражения новорожденных мышей?

#### Тема 30. ВИРУСОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА АРБОВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

К арбовирусам относится многочисленная группа РНК-содержащих вирусов, относящихся к различным семействам и передающихся членистоногими.

Арбовирусы получили свое название от сочетания первых букв английских слов *arthropoda born viruses* (вирусы, переносимые членистоногими). К арбовирусам относятся возбудители желтой лихорадки, весенне-летнего энцефалита, японского энцефалита, геморрагических лихорадок и других заболеваний.

Наличие у арбовирусов гемагглютинина позволяет использовать РТГА для их серологической идентификации и дифференцирования.

Вирусологическая диагностика арбовирусных инфекций складывается из выделения вируса в остром периоде и серологического исследования в периоде реконвалесценции.

## Программа занятия

1. Изучение схемы лабораторной диагностики энцефалитов.
2. Вирусологическая диагностика энцефалитов.
3. Серологическая диагностика энцефалитов.
4. Диагностические и профилактические препараты, применяемые при энцефалитах.

## Демонстрация

Диагностические и профилактические препараты, применяемые при энцефалитах: сыворотки, диагностикумы, вакцины.

## Задание студентам для выполнения лабораторной работы

1. Учесть результаты идентификации выделенного штамма арбвируса с помощью реакции нейтрализации на мышах со стандартной типовой сывороткой.
2. Учесть результаты РСК с парными сыворотками больного в осенне-летний энцефалитом.  
Обосновать серологический диагноз заболевания.

## Методические указания

**Вирусологическое исследование.** Вирусы энцефалитов выделяют путем заражения белых мышей, перевиваемо культуры клеток почек эмбрионов свиней и первично культуры фибробластов куриных эмбрионов. С этой целью обработанный соответствующим образом материал интрацеребрально вводят белым мышам. Инкубационный период продолжается 4—12 дней. Вирусы энцефалитов вызывают у мышей заболевания, которые характеризуются повышением чувствительности к внешним раздражениям, появлением параличей. Гибель животных наступает в течение одного дня после начала болезни. Для усиления активности вируса их пассируют на мозговой ткани погибших или забитых животных. В культуре клеток почек эмбрионов свиней вирусы энцефалитов вызывают цитопатический эффект, выражающийся в развитии круглоклеточной дегенерации и отслоением клеток от стекла. В культуре фибробластов вирусы клещевого и японского энцефалитов активно размножаются, но не вызывают видимых цитопатических изменений. Поэтому для их выявления заражают мышей культуральной жидкостью.

Вирусы идентифицируют в РИ на мышах или в культуре клеток, в РТГА и РСК со специфическими сыворотками. Вирусы клещевого и японского энцефалитов по антигенным свойствам различаются между собой и не дают перекрестных реакций. Однако они имеют общие антигены.



с другими арбовирусами, что необходимо учитывать при лабораторной диагностике.

**Постановка реакции нейтрализации на белых мышах.** Предварительно проводят титрование выделенного вируса на мышах. Для этого различные разведения вируса от  $10^{-5}$  до  $10^{-9}$  вводят в мозг мышей. Результаты титрования позволяют установить величину  $LD_{50}$  для данного вируса. Далее взвесь вируса в количестве  $100 LD_{50}$  (заведомо летальная доза для мышей) вносят в пробирки с нормальной и типоспецифической иммунной сыворотками. После 2-часовой инкубации при  $37^{\circ}C$  смесь вирус-сыворотка вводят белым мышам в мозг. Наблюдение за мышами продолжается в течение 14 дней, после чего учитывают результаты.

Если выделенный возбудитель полностью нейтрализуется иммунной сывороткой против вируса клещевого энцефалита, то его можно отнести к вирусам клещевого энцефалита (№ 1). Штаммы вируса, которые нейтрализуются только частично, подлежат дальнейшему изучению (№ 2).

Для серологической диагностики проводят РН на мышах или в культуре клеток, РСК и РТГА. Реакции ставят парными сыворотками больного, взятыми в течение первой недели болезни и через 5—7 нед после ее начала. Диагностическое значение имеет нарастание титра антител в 4 раза и более (см. табл. 37).

Таблица 3

Исследование парных сывороток в РСК

Исследуемые сыворотки	Разведения сывороток				
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160
Первая сыворотка, взятая в начале болезни	++	—	—	—	—
Вторая сыворотка, взятая через 30 дней после начала болезни	++++	++++	++++	++++	—

Обозначения: «—» — гемолиз; ++ — частичное отсутствие гемолиза; ++++ — полное отсутствие гемолиза.

### Диагностические, профилактические и лечебные препараты

Эталонные типоспецифические сыворотки против вируса весенне-летнего энцефалита и других арбовирусов готовят путем иммунизации соответствующими вирусами животных

или используют сыворотки людей, переболевших соответствующей арбовирусной инфекцией. В каждом случае предварительно устанавливают титр антител.

**Диагностикум из вируса клещевого энцефалита.** Готовят из мозга мышей, зараженных выделенным вирусом, прошедшим 1—2 пассажа на мышках.

**Инактивированная культуральная вакцина против клещевого энцефалита человека** представляет собой стерильный культуральный специфический антиген вируса клещевого энцефалита, инактивированного формалином. Применяется для профилактики энцефалита у населения и персонала лаборатории в природных очагах по эпидемиологическим показаниям.

**Гамма-глобулин против клещевого энцефалита** — гамма-глобулиновая фракция, извлеченная из сыворотки крови лошадей, гипериммунизированных вирусом клещевого энцефалита. Препарат содержит в высоком титре специфические противовирусные антитела. Применяют для лечения больных клещевым энцефалитом и для профилактики.

#### Контрольные вопросы

1. Классификация и основные биологические признаки арбовирусов.
2. Какие материалы от больного и из окружающей среды могут служить источником выделения арбовирусов?
3. Методы выделения арбовирусов. Преимущества и недостатки каждого из них.
4. Перечислите серологические реакции, которые используют для идентификации арбовирусов. С какими вирусами их приходится дифференцировать и каким образом?
5. Укажите периоды заболевания, в которые проводится вирусологическая и серологическая диагностика арбовирусных инфекций.
6. Какая из серологических реакций позволяет отличить свежую арбовирусную инфекцию?

#### Тема 31. ВИРУСОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ГРИППА И БЕШЕНСТВА

Вирусы гриппа относятся к семейству Orthomyxoviridae, а вирусы бешенства — к семейству Rhabdoviridae.

Вирусы гриппа состоят из рибонуклеопротеидной (РНП) спирали, «одетой» липоуглеводопротеиновой внешней оболочкой с ворсинчатыми выступами (рис. 90). РНП вируса гриппа является растворимым комплексом связывающим S-антигеном (soluble antigen). В «ворсинках» локализован V-антиген, содержащий гемагглютинин и фермент — нейраминидазу. Различия в антигенных свойствах РНП позво-



Рис. 90. Вирусы гриппа.

а — специфический вирион вируса гриппа типа А2 (Гонконг); б — нитевидные вирионы того же вируса. Электронная микроскопия.  $\times 300\ 000$ .



лили разделить вирусы гриппа на три серологические типа: А, В и С. Вирусы гриппа обладают гемагглютинирующими и гемадсорбирующими свойствами, которые широко используются для идентификации и дифференцирования.

Возбудителями пандемий и крупных эпидемий гриппа являются серологические подтипы вируса А, отличающиеся по гемагглютинирующим (Н) и нейраминидазным (N) антигенам: А<sub>0</sub> (Н<sub>0</sub>Н<sub>1</sub>), А<sub>1</sub> (Н<sub>1</sub>Н<sub>1</sub>), А<sub>2</sub> — Сингапур — 1/57 (Н<sub>2</sub>Н<sub>2</sub>), А<sub>2</sub> — Гонконг — 1/68 (Н<sub>3</sub>Н<sub>2</sub>). Во время последней эпидемии в 1977 г. был вновь выделен подтип А<sub>1</sub> (Н<sub>1</sub>Н<sub>1</sub>).

### Программа занятия

1. Изучение схемы вирусологической диагностики гриппа.
2. Вирусологическая диагностика гриппа.
3. Серологическая диагностика гриппа.
4. Микроскопические методы диагностики гриппа и бешенства:  
а) иммунофлюоресцентный метод выявления и типирования вирусов гриппа в исходном материале; б) выявление специфических включений при бешенстве.
5. Диагностические, профилактические и лечебные препараты, применяемые при гриппе и бешенстве.

### Демонстрация

1. Иммунофлюоресцентный метод экспресс-диагностики гриппа.
2. Тельца Бабеша — Негри.
3. Диагностические, профилактические и лечебные препараты, применяемые при гриппе: диагностические типоспецифические гриппозные и парагриппозные сыворотки, вакцины, лечебные сыворотки.
4. Вакцины против бешенства.

### Задание студентам для выполнения лабораторной работы

1. Ввести соответственно обработанный исследуемый материал (смыв из носоглотки больного) в амниотическую полость развивающихся куриных эмбрионов 10—11-дневного возраста для выделения вируса гриппа.

2. Исследовать полученные из зараженных эмбрионов амниотическую и аллантоисную жидкости на присутствие вируса гриппа в реакции гемагглютинации.

3. Учесть результаты идентификации выделенного вируса гриппа в реакции торможения гемагглютинации. Сделать заключение.

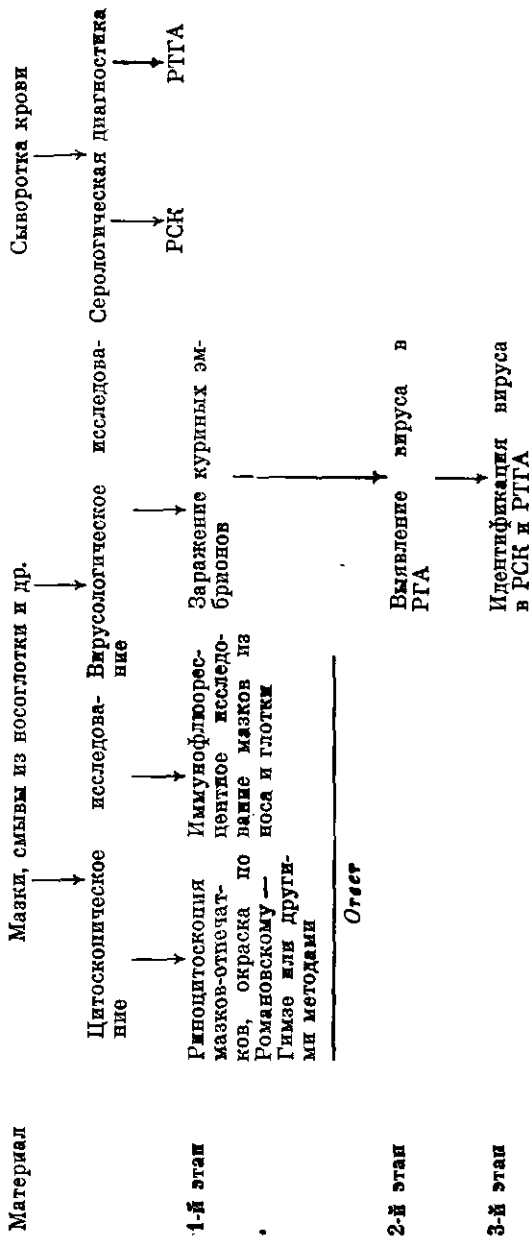
4. Учесть результаты серологической диагностики гриппа в реакции связывания комплекта, поставленной с парными сыворотками. Сделать заключение.

### Методические указания

Цитоскопическое исследование является ориентировочным экспресс-методом лабораторной диагностики гриппа. С поверхности нижней носовой раковины больных приго-

Схема 27

## Схема вирусологического исследования при гриппе



Окончательный отчет

товляют мазки-отпечатки с помощью узких стекол с шлифованным краем или пластинок из плексигласа. Препараты окрашивают смесью основного фуксина и метиленового синего. В цитоплазме цилиндрического эпителия, а также в цитоплазме дегенерированных макрофагов, в лейкоцитах располагаются хорошо контурированные включения, которые окрашиваются в красный цвет.

Риноцитоскопическое исследование не является специфическим методом диагностики гриппа. Однако данный метод позволяет дифференцировать грипп от аденовирусных инфекций, при которых наблюдается десквамация клеток, сопровождающаяся деструкцией, вакуолизацией ядер и образованием внутриядерных включений.

Риноцитоскопическое исследование становится специфическим в сочетании с иммуофлюоресцентным методом. Для этого на фиксированный ацетоном мазок наносят поливалентную флюоресцирующую сыворотку, содержащую антитела против определенных типов гриппозных вирусов. При наличии в клетках соответствующего вируса (антигена) происходит образование комплексов антиген — антитело, характеризующихся ярко-зеленым свечением в люминесцентном микроскопе.

**Вирусологическое исследование.** Сухим или увлажненным тампоном протирают заднюю стенку глотки, а затем тампон опускают в пробирку с раствором Хенкса и нормальной инактивированной сывороткой крови животных. Процедуру повторяют 2—3 раза. В лаборатории тампоны отжимают о стенку пробирки и удаляют, жидкость оставляют в холодильнике и среднюю часть переносят в стерильные пробирки, куда добавляют пенициллин и стрептомицин для уничтожения бактериальной флоры. Через 20—30 мин делают посев для обнаружения бактерий. При отрицательном результате смыв используют для выделения вируса, а остаток замораживают и сохраняют на случай проведения повторного исследования.

Заражение куриных эмбрионов является основным методом выделения вируса гриппа. В амниотическую полость 10—11-дневных куриных эмбрионов (см. рис. 39) вводят 0,2 мл материала. Определяют наличие вируса в аллантоисной и амниотической жидкости с помощью реакции гемагглютинации (см. с. 77). Вирусы гриппа агглютинируют эритроциты около 20 видов животных и птиц. Чаще всего используют эритроциты кур, 0 группу крови человека или морской свинки (рис. 91 и 92). Тип вируса (А, В или С)

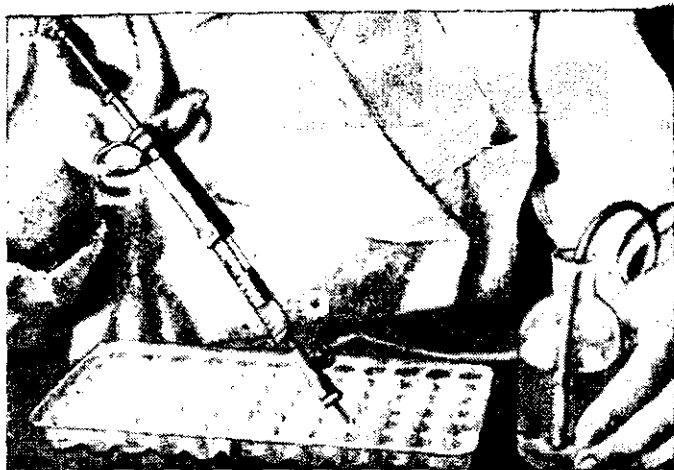


Рис. 91. Постановка реакции гемагглютинации.

дифференцируют в РСК. Подтипы вируса А:  $A_0$  ( $H_0N_1$ ),  $A_1$  ( $H_1N_1$ ),  $A_2$  ( $H_2N_2$ ),  $A_2$  ( $H_3N_2$ ) могут быть дифференцированы в РТГА с набором гомологичных типоспецифических сывороток (табл. 38).

В настоящее время для идентификации Н- и N-антигенов рекомендуют использовать монорецепторные сыворотки, полученные отдельно к гемагглютининому и нейраминидазе. При этом идентификация Н-антигена проводится в РТГА или с помощью реакции иммунопреципитации в геле, а N-антигена — в реакции ингибции нейраминидазы и реакции иммунопреципитации в геле.

Результаты РТГА (рис. 91, 92), представленные в табл. 39, свидетельствуют о том, что гемагглютинирующая активность исследуемого вируса нейтрализуется типоспецифической сывороткой А2 в разведениях 1:10, 1:20 и т. д. до ее титра. Это указывает на то, что исследуемый вирус относится к подтипу А2.

Тканевые культуры для выделения вируса гриппа не нашли практического применения вследствие отсутствия культуры клеток, чувствительной ко всем серотипам вируса.

Серологическая диагностика осуществляется с помощью РСК и РТГА со стандартными диагностикумами, представляющими собой наборы эталонных штаммов различных

Таблица 38

## Реакция торможения гемагглютинации для типирования вирусов гриппа (схема постановки)

Ингредиенты, мл	Пробирки							
	опытные					контроль		
	1-я	2-я	3-я	4-я	...	1-я сыворотки	2-я вируса	3-я эритроцитов
Разведения типоспецифической сыворотки	1:10 0,2	1:20 0,2	1:40 0,2	1:80 0,2	ит. д. до титра ...	0,2	—	—
Вирус (4 гемагглютинирующие дозы)	0,2	0,2	0,2	0,2	...	—	0,2	—
Изотонический раствор хлорида натрия	—	—	—	—	...	0,2	0,2	0,2
Экспозиция 60 мин при комнатной температуре								
1% суспензия эритроцитов курицы	0,4	0,4	0,4	0,4	...	0,4	0,4	0,4
Экспозиция 30—60 мин при комнатной температуре								
Результаты								

Таблица 39

## Реакция торможения гемагглютинации для типирования вируса гриппа

Типоспецифические противогриппозные сыворотки	Разведения сывороток					Контроль		
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	сыворотки	вируса	эритроцитов
A0	—	+	+++	+++	+++	—	+++	—
A1	—	++	+++	+++	+++	—	+++	—
A2	—	—	—	—	—	—	+++	—

серологических типов вируса гриппа. РСК более чувствительна, чем РТГА, и позволяет выявить антитела для всех штаммов одного и того же серотипа вируса. Диагностическое значение имеет четырехкратное увеличение титра антител в парных сыворотках (в период эпидемии гриппа) и двукратное нарастание в сыворотках больных при характерной клинической картине. Отсутствие нарастания титра антител, однако, не исключает гриппозной инфекции.

РТГА применяется для уточнения антигенных разновидностей вируса в пределах одного серотипа и подтипа.

### **Диагностические, профилактические и лечебные препараты**

**Типоспецифические гриппозные сыворотки А0, А1, А2, В и С.** Применяются для серотипирования вирусов гриппа в РТГА и РСК.

**Типоспецифические парагриппозные сыворотки** применяются для дифференцирования и серотипирования вирусов парагриппа.

**Сухие типоспецифические диагностикумы** (гриппозный и парагриппозный) применяются для серологической диагностики соответствующих инфекций.

**Живая гриппозная вакцина.** Приготавливается из аллантоисной жидкости куриных эмбрионов, зараженных вакцинными штаммами вируса гриппа основных серотипов. Применяется интраназально.

**Лечебно-профилактическая поливалентная гриппозная сыворотка.** Получается путем гипериммунизации лошадей вирусами гриппа разных серотипов. Выпускается в сухом виде в смеси с антибиотиками и сульфаниламидами. Применяется интраназально для профилактики гриппа и для лечения больных в самом начале заболевания.

**Противогриппозный донорский гамма-глобулин** готовят из сыворотки крови доноров, иммунизированных живой гриппозной вакциной типов А и В. Применяется для лечения и профилактики гриппа в эпидемических очагах.

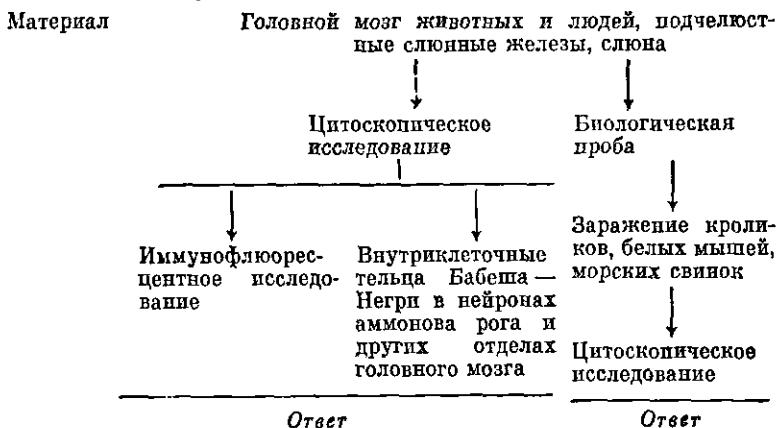
**Человеческий лейкоцитарный интерферон** — видоспецифический белок, синтезированный лейкоцитами человека, находящихся в культуральной среде в ответ на воздействие вируса — интерфероногена. Применяется для профилактики и лечения гриппа и других вирусных респираторных заболеваний.

## Вирусологическая диагностика бешенства

Вирус бешенства обладает выраженными нейротропными свойствами. Содержится в головном мозге и слюне заболевших. Заражение происходит через укусы больных бешенством животных (волки, собаки и др.), при попадании слюны на поврежденную кожу и слизистые оболочки, а также возможен аэрогенный путь. Вирус бешенства вызывает поражение центральной нервной системы с развитием параличей, судорог, гидрофобии. Лабораторная диагностика у человека проводится посмертно; исследуются также больные и подозрительные животные (схема 28).

Схема 28

### Схема вирусологического исследования при бешенстве



## Методические указания

**Цитоскопическое исследование.** Специфические внутриклеточные включения Бабеша — Негри при бешенстве обнаруживают в нейронах аммонова рога, а также в клетках мозжечка, продолговатого мозга. Тельца Бабеша — Негри имеют овальную или многоугольную форму, с внутренней зернистостью, четко контурированы, размеры их около 4—10 мкм. Располагаются в цитоплазме. В гистологических препаратах или мазках-отпечатках тельца Бабеша — Негри окрашиваются по Романовскому — Гимзе в красный цвет, цитоплазма нервных клеток — в голубой (рис. 93).

Обнаружение телец Бабеша — Негри имеет решающее диагностическое значение. Отсутствие их не исключает диагноза бешенства.

**Вирусологическое исследование.** Выделение вируса бешенства проводят в специальных лабораториях. Заражают молодых мышей или кроликов эмульсией из мозговой ткани (внутримышечно или субдурально). Инкубационный период у мышей 8—14 дней, у кроликов — 12—15 дней. Животные погибают от паралитической формы бешенства. В препаратах из мозговой ткани обнаруживаются тельца Бабеша — Негри.

### Профилактические препараты

Антирабические вакцины содержат фиксированный вирус бешенства (*virus fixe*), полученный Пастером пассированием вируса бешенства через мозг кроликов.

Сухая антирабическая вакцина типа Ферми изготавливается из мозга овец в возрасте до 1 года, зараженных фиксированным вирусом бешенства, выпускается в сухом виде. Антирабические вакцины вводят лицам, укушенным больными или подозрительными на бешенство животными. Прививки проводят по специальной инструкции. Антирабические вакцины обладают высокой эффективностью и проверены многолетней практикой. Поствакцинальный иммунитет развивается через 2 нед и сохраняется 6 мес.

Антирабический гамма-глобулин получается путем гипериммунизации лошадей фиксированным вирусом и вводится не позднее 72 ч после укуса. Применяется в сочетании с антирабическими вакцинами. Обезвреживает вирус уличного бешенства и предупреждает поствакцинальные энцефалиты.

### Контрольные вопросы

1. Современная классификация ортомиксовирусов. С чем связано данное им название?

2. Перечислите вирусы, которых относят к семейству ортомиксовирусов и парамиксовирусов, и укажите основные их признаки и вызываемые ими заболевания.

3. Каким образом устанавливают тип и подтип вирусов гриппа?

4. С какими антигенами связана изменчивость вируса гриппа и периоды между эпидемиями и пандемиями?

5. Возможные генетические механизмы, ответственные за изменчивость вируса гриппа.

6. В каких случаях проводится лабораторная диагностика гриппа?

7. Перечислите методы, применяемые для лабораторной диагностики гриппа.



8. По каким признакам дифференцируют гриппозные вирусы от парагриппозных и других парамиксовирусов?

9. Особенности противогриппозного постинфекционного иммунитета.

10. Специфическая профилактика гриппа. Трудности и перспективы.

11. Какие причины затрудняют своевременное приготовление эффективной противогриппозной вакцины? Пути их устранения.

12. Экспресс-метод диагностики гриппа, его достоинства и недостатки.

13. О чем свидетельствует обнаружение в сыворотке крови человека противогриппозных антител? Можно ли дать ответ на этот вопрос при однократном исследовании сыворотки?

14. Для чего используют антибиотики при гриппозной инфекции?

15. Основные признаки рабдовирусов.

16. Лабораторная диагностика бешенства.

17. Какой вирус используют для приготовления вакцины против бешенства? Механизм образования поствакцинального иммунитета после иммунизации против бешенства.

18. В каких случаях проводят вакцинацию против бешенства и когда применяют антирабический гамма-глобулин?

## Тема 32. ВИРУСОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА АДЕНОВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

К аденовирусам относится группа ДНК-содержащих вирусов, семейства *Adenoviridae*, впервые выделенных из аденоидов и миндалин детей. Обнаружено более 30 серотипов аденовирусов, патогенных для человека. Аденовирусы репродуцируются в клетках первичных и перевиваемых эпителиальных культур разных тканей человека, вызывая при этом выраженное цитопатическое действие, обладают гемагглютинирующими свойствами. Идентификация аденовирусов проводится в реакции связывания комплемента, а типирование — в реакциях нейтрализации вирусов и торможения гемагглютинации.

У людей аденовирусы вызывают ангины, конъюнктивиты, респираторные и другие заболевания. Могут сохраняться в латентной форме в области зева, особенно у детей.

### Программа занятия <sup>1</sup>

1. Изучение схемы микробиологических исследований, проводимых при аденовирусных инфекциях.

2. Вирусологическая диагностика аденовирусных инфекций.

3. Серологическая диагностика аденовирусных инфекций.

4. Диагностические препараты, применяемые при аденовирусных инфекциях.

<sup>1</sup> Темы 31 и 32 можно объединить.

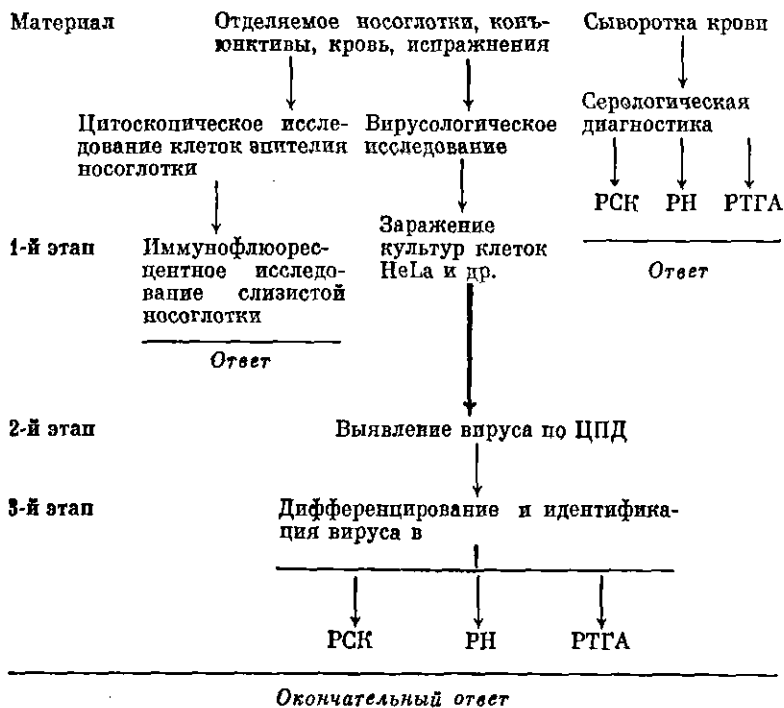
**Задание студентам  
для выполнения лабораторной работы**

1. Учесть результаты реакции нейтрализации в тканевой культуре по цветной пробе, поставленной для дифференцирования аденовируса от вирусов парагриппа и для определения серотипа выделенного аденовируса. Дать заключение.

2. Учесть результаты реакции связывания комплемента с парными сыворотками крови больных людей. Обосновать серологический диагноз заболевания (схема 29).

Схема 29

**Схема вирусологического исследования при аденовирусных инфекциях**



**Методические указания**

**Вирусологическое исследование.** Материал из носоглотки и конъюнктивы берут в течение первой недели заболевания влажными тампонами, которые помещают в пробирку с раствором Хенкса и инaktivированной лошадиной

сывороткой. Фекалии исследуют в первые две недели болезни, кровь — в первые дни. Материал обрабатывают антибиотиками и сохраняют в замороженном состоянии.

Для заражения используют перевиваемые культуры клеток HeLa, HEp-2 и первичные культуры клеток амниона, легочной или мышечной ткани эмбриона человека, почек обезьян и др.

При репродукции аденовирусов в эпителиальных клетках наблюдаются характерные цитопатические изменения, существенно отличающиеся от тех, которые вызывают другие вирусы. Они заключаются в своеобразной группировке дегенерированных клеток в виде гроздьев на периферии клеточного пласта и быстром отслоении пораженных клеток от поверхности стекла. В культурах фибробластов цитопатические изменения развиваются более медленно и характеризуются резким набуханием клеток с распадом ядра.

Для аденовирусной инфекции эпителиальных клеток и фибробластов характерно образование внутриядерных включений.

Принадлежность выделенного цитопатогенного агента к аденовирусам устанавливают в РСК. Антиген готовят из культуры с положительным ЦПД, клетки которой предварительно разрушают попеременным замораживанием и оттаиванием. Затем полученную культуральную жидкость центрифугируют, инактивируют при нагревании до 56°С в течение 30 мин.

Серотип вируса определяют в РН вначале со смесями разных типов сывороток, а затем с типовыми сыворотками. РН проводят в клетках первичных или перевиваемых культур, в зависимости от характера ЦПД, вызываемого исследуемым вирусом. Если вирус вызывает мелкоклеточную дегенерацию клеток, то используют первичные культуры почечных клеток обезьян и др. Тип вируса можно определить и в РТГА с эритроцитами обезьян или крыс.

Серологическая диагностика носит ретроспективный характер. В РСК исследуют парные сыворотки больного с наиболее часто встречающимися типами вируса. Диагностическое значение имеет нарастание титра в 4 раза и более во второй сыворотке.

### Диагностические препараты

**Аденовирусные диагностикумы.** Применяются для серологической диагностики соответствующих инфекций.

**Типоспецифические адеовирусные сыворотки.** Применяются для серологического типирования адеовирусов в РСК, РН и РТГА.

### Тема 33. ВИРУСОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА НАТУРАЛЬНОЙ ОСПЫ

Вирус натуральной оспы относится к ДНК-содержащим вирусам семейства *Poxviridae*.

К этому же семейству относятся вирусы осповакцины и др. Они превосходят все известные вирусы по размерам частиц и по сложности строения. Вирусы оспы имеют форму параллелепипеда с округленными ребрами и вершинами. Тип симметрии не выяснен. Они имеют внешнюю оболочку и не чувствительны к эфиру. Вирусы натуральной оспы и осповакцины обладают сходной антигенной структурой и содержат гемагглютинин. Их культивируют в курином эмбрионе, в первичных и перевиваемых культурах клеток, где они размножаются, образуя цитоплазматические включения. В организме человека вирус натуральной оспы локализуется в крови, кожных покровах и слизистых оболочках верхних дыхательных путей. В любой период развития болезни и даже во время выздоровления вирус оспы можно выделить из организма.

#### Программа занятия

1. Изучение схемы вирусологических и серологических исследований, проводимых для диагностики натуральной оспы.
2. Микроскопические методы диагностики натуральной оспы.
3. Профилактические и лечебные препараты, применяемые при натуральной оспе.

#### Демонстрация

1. Микропрепараты — мазки из вируса осповакцины, окрашенные по методу Морозова.
2. Противооспенные вакцины и гамма-глобулин.

#### Задание студентам для выполнения лабораторной работы

Произвести вскрытие куриного эмбриона, предварительно зараженного на хорион-аллантоисную оболочку вирусом осповакцины. Изучить характер поражений на хорион-аллантоисной оболочке. Намечать пути идентификации вируса (схема 30).

#### Методические указания

Вирусоскопическое исследование является быстрым методом диагностики оспы и с успехом применяется в раннем периоде болезни (главным образом в стадии везикул).



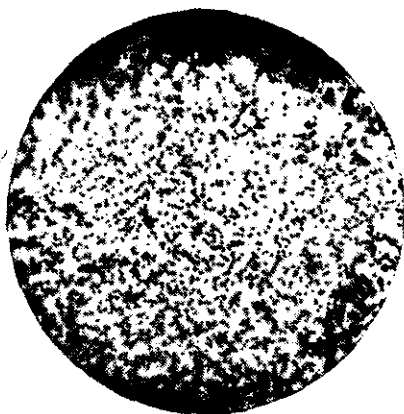


Рис. 94. Тельца Пашена. Окраска по Морозову.

В стадии образования пустул вирусоскопический метод менее пригоден, так как в мазках увеличивается масса клеточного детрита и уменьшается количество вирусных частиц, что затрудняет исследование материала. Из содержимого везикул, пустул или соскоба папул делают мазки, которые высушивают на воздухе и окрашивают по Морозову. Вирусные частицы (тельца Пашена) имеют вид темнокоричневых округлых образований («кирпичики» со сглаженными краями). Располагаются поодиночке или небольшими скоплениями на светло-коричневом фоне детрита (рис. 94).

Хорошие результаты получаются при использовании фазово-контрастной и люминесцентной микроскопии. В препаратах, флюорохромированных примулином, элементарные тельца светятся зеленоватым или голубым цветом на светло-желтом фоне.

**Вирусологические исследования.** Исследуемый материал подвергают соответствующей обработке: везикулярную и пустулезную жидкость разводят изотоническим раствором и центрифугируют для осаждения крупных частиц. Полученную суспензию обрабатывают пенициллином и стрептомицином, после чего производят заражение куриных эмбрионов или культуры ткани.

Выделение вируса на куриных эмбрионах. Материал вводят на хорин-аллантаическую оболочку 11—12-дневных куриных эмбрионов. Наличие на хорин-аллан-

тоисной оболочке мелких, плотных, резко очерченных белых бляшек (осппн) свидетельствует о развитии вируса натуральной оспы, который в первых пассажах не вызывает гибели эмбрионов. Для подтверждения диагноза (особенно при образовании нетипичных бляшек) проводят серологическую идентификацию вируса в РН на куриных эмбрионах, в РСК и РТГА с эритроцитами кур. Реакции ставят по обычной методике.

Выделение вируса в культуре ткани. Используют различные первичные и перевиваемые культуры клеток человека и животных, за исключением фибробластов куриных эмбрионов. Чаще всего применяют культуры перевиваемых клеток человека HeLa, HEp-2 и др. Цитопатические изменения развиваются сравнительно медленно. Они характеризуются образованием цитоплазматических включений и ограниченных фокусов пролиферации клеток. В дальнейшем могут развиваться генерализованные некротические изменения. В культурах ткани под агаровым покрытием вирус оспы образует мелкие бляшки на 4—5-й день. После развития выраженного ЦПД в тканевых культурах наблюдается положительная реакция гемадсорбции с эритроцитами кур.

Для идентификации выделенного вируса используют реакцию задержки гемадсорбции с иммунной сывороткой. Кроме того, вирус оспы может быть выявлен в зараженных культурах еще до появления ЦПД методом иммунофлюоресценции, который дает положительный результат уже через 9—12 ч после инфицирования.

Вирусологическое исследование является эффективным методом диагностики и позволяет обнаружить вирус оспы в кожных поражениях больных в 90—100% случаев. Удаётся выделять вирус из кожных чешуек даже через 30 дней от начала болезни. Выделение вируса из крови возможно в начальной стадии болезни — до высыпания и в первые дни после него, в зависимости от степени тяжести заболевания. Обнаружение вируса в крови имеет решающее значение для диагностики клинических форм оспы, протекающих без сыпи.

**Биологическая проба.** Материалом заражают кролика в скарифицированную роговицу глаза. В гистологических срезах из роговицы обнаруживают тельца Гварниери — внутриклеточные цитоплазматические включения шаровидной или серповидной формы, размером от 1—4 до 10 мкм. При окраске по Романовскому — Гимзе тельца Гварниери окра-

шиваются в пурпурный цвет. В препаратах, флюорохромированных акридиновым оранжевым, тельца Гварниери люминесцируют изумрудно-зеленым светом.

**Серологическая диагностика.** Начиная с 5—6-го дня болезни проводят серологическое исследование для определения нарастания титра антител в РТГА, РСК и РН на куриных эмбрионах или культурах клеток.

Диагностический титр для РТГА — 1:80—1:160. Нарастание титра антител не менее чем в 4 раза подтверждает диагноз.

## Профилактические и лечебные препараты

**Сухая оспенная вакцина.** Живая вакцина, приготовляемая из вируса оспы коров (вируса вакцины), который имеет общие антигенные свойства с вирусом натуральной оспы и вызывает у человека прочный иммунитет. Существует несколько видов оспенных вакцин.

1. Дermalная оспенная вакцина (жидкая и сухая). Приготавливается путем кожного заражения телят вирусом вакцины, который предварительно пассируют для усиления иммуногенности через организм кролика. На 5—6-й день, когда на коже телят образуются везикулы, делают эпителиальный соскоб. Детрит, содержащий вирус, гомогенизируют, обрабатывают фреоном-113 для удаления микрофлоры, проверяют на безвредность и выпускают для использования. В последнее время выпускают главным образом сухую вакцину из лиофилизированного оспенного детрита; срок годности сухой вакцины — до 1 года.

В СССР применяют дермальную оспенную вакцину.

2. Оспенная ововакцина. Приготавливается из суспензии хорион-аллантаической оболочки куриных эмбрионов, зараженных вирусом вакцины.

3. Тканевая оспенная вакцина. Приготавливается из культуральной жидкости однослойной культуры тканей органов или эмбрионов животных, чувствительных к вирусу вакцины.

**Противооспенный донорский иммуноглобулин.** Приготавливают из крови донора, взятой через 3—6 нед после ревакцинации оспенной вакциной. Иммуноглобулин вводят лицам, находившимся в контакте с больными оспой, а также применяют его для лечения и профилактики мествакцинальных осложнений.



## Контрольные вопросы

1. С какими вирусами и по каким признакам приходится дифференцировать аденовирусы при диагностике респираторных инфекций?
2. Отличительные особенности ЦПД аденовирусов в тканевых культурах. В каких диагностических тестах их необходимо учитывать?
3. Вирусы оспы. Их основные признаки.
4. С каким вирусом приходится дифференцировать вирус натуральной оспы в педиатрической практике? Какие тесты используют с этой целью?
5. Какой вирус используется для приготовления противооспенной вакцины? Объясните происхождение термина «вакцина».
6. В чем заключаются современные способы приготовления оспенной вакцины, какой из них предпочтительнее и почему? Как проверяется эффективность противооспенной вакцины?

## МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ, ВЫЗВАННЫХ ПАТОГЕННЫМИ ПРОСТЕЙШИМИ

К патогенным простейшим (Protozoa) относятся дизентерийная амеба, плазмодии малярии, лейшманин, токсоплазмы и др. Эти возбудители вызывают заболевания, характеризующиеся длительным рецидивирующим течением. Многие патогенные простейшие являются внутриклеточными паразитами и проходят определенные циклы развития, образуя разнообразные формы в организме хозяина, переносчика и во внешней среде.

### Тема 34. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ АМЕБИАЗЕ, МАЛЯРИИ, ЛЕЙШМАНИОЗЕ, ТОКСОПЛАЗМОЗЕ

Для микробиологической диагностики заболеваний, вызванных простейшими, используют главным образом микроскопическое исследование препаратов из крови или патологического материала. Реже прибегают к выделению культур и другим методам.

#### Программа занятия

Микроскопическая диагностика протозойных заболеваний.

#### Демонстрация

1. Окрашенные мазки с дизентерийной амёбой.
2. Мазки крови с разными видами плазмодия малярии. Окраска по Романовскому — Гимзе.
3. Мазки лейшманий из содержимого лимфатических узлов. Окраска по Романовскому — Гимзе.
4. Мазки токсоплазм из ткани. Окраска по Романовскому — Гимзе.

#### Методические указания

**Микробиологическая диагностика амёбиаза.** Возбудителем является *Eutamoeba histolytica*. Из испражнений больного готовят препарат раздавленная капля, который помещают на нагревательный столик микроскопа, чтобы амеба сохранила подвижность. Ее характерными особенностями являются подвижность за счет псевдоподий, наличие эндо- и экзоплазмы и сетчатого ядра. Отличие дизентерийной амёбы от кишечной (сапрофит, обитающий в кишечнике) проводится по наличию в эндоплазме поглощенных эритроцитов.

В ряде случаев исследуемым материалом заражают котят через рот или прямую кишку. При этом в испражнениях обнаруживают дизентерийную амёбу.

**Микробиологическая диагностика малярии.** Малярию вызывают четыре вида плазмодиев: *Pl. vivax*, *Pl. malariae*, *Pl. falciparum*, *Pl. ovale*. Из крови больного готовят мазки и препараты толстая капля, которые окрашивают по Романовскому — Гимзе. Плазмодии малярии с голубой цитоплазмой и рубиново-красным ядром обнаруживаются в эритроцитах. Вид и стадию развития плазмодия определяют по его морфологическим особенностям и изменениям в пораженных эритроцитах.

**Микробиологическая диагностика лейшманиоза.** При кожном лейшманиозе или пендинской язве (возбудитель — *L. tropica*) готовят мазки из отделяемого язвы, а при лейшманиозе внутренних органов (возбудитель — *L. donovani*) — из мозга или лимфатических узлов. Мазки фиксируют в смеси Никифорова и окрашивают по Романовскому — Гимзе. Лейшмании обнаруживаются внутри- и внеклеточно в виде безжгутиковых образований округлой формы с цитоплазмой, окрашенной в голубой цвет, ядром — в красный, блефоропластом — в фиолетовый.

Для выделения культуры материал сеют на среду, содержащую агар-агар с NaCl и дефибрированной кровью кролика. Через 3—4 дня после инкубирования посевов при 23°C образуются мелкие прозрачные колонии. В нативных препаратах видны подвижные жгутиковые формы лейшманий.

**Микробиологическая диагностика токсоплазмоза.** Возбудителем является *Toxoplasma gondii*. Мазки готовят из кусочков тканей, взятых путем биопсии, спинномозговой жидкости и другого материала, фиксируют в смеси Никифорова и окрашивают по Романовскому — Гимзе. Токсоплазма имеет форму полумесяца с окрашенной в голубой цвет цитоплазмой и красным ядром. В мазках из тканей и органов обнаруживается большое число крупных цист и псевдоцист.

Для выделения культуры материал вводят на хорион-аллантоисную оболочку куриного эмбриона.

#### Контрольные вопросы

1. Какие патогенные простейшие Вам известны?
2. Как проводится микробиологическая диагностика амебиаза и по каким признакам отличают дизентерийную амёбу от кишечной?
3. Перечислите возбудителей малярии. Чем они отличаются друг от друга? Как проводится микробиологическая диагностика малярии?
4. Как проводится микробиологическая диагностика токсоплазмоза и лейшманиоза?
5. Назовите препараты, применяемые для лечения заболеваний, вызываемых патогенными простейшими.

## СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие . . . . .	3
-----------------------	---

### ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Микробиологические лаборатории и их оборудование . . . . .	6
Тема 1. Бактериологические, вирусологические и серологические лаборатории и их оборудование . . . . .	6
Морфология микроорганизмов . . . . .	24
Тема 2. Морфология и структура бактерий . . . . .	24
Тема 3. Морфология грибов . . . . .	35
Тема 4. Морфология спирохет . . . . .	39
Тема 5. Морфология микоплазм, риккетсий, хламидий и вирусов . . . . .	42
Физиология микроорганизмов . . . . .	50
Тема 6. Стерилизация . . . . .	50
Тема 7. Питательные среды . . . . .	55
Тема 8. Методы выделения, культивирования и идентификации чистых культур аэробных и анаэробных бактерий . . . . .	60
Тема 9. Культивирование риккетсий, хламидий и вирусов . . . . .	71
Микроорганизмы и внешняя среда . . . . .	84
Тема 10. Санитарно-бактериологические исследования . . . . .	84
Тема 11. Действие физических и химических факторов на микроорганизмы . . . . .	94
Тема 12. Симбиоз и антагонизм микробов. Антибиотики. Бактериоциногенез . . . . .	96
Тема 13. Генетика микроорганизмов . . . . .	104
Практическое применение учения об инфекции и иммунитете . . . . .	111
Инфекция . . . . .	111
Тема 14. Патогенность и вирулентность микробов. Токсины . . . . .	112
Иммунитет . . . . .	118
Тема 15. Фагоцитоз . . . . .	119
Тема 16. Приобретенный иммунитет. Реакции иммунитета (серологические реакции) . . . . .	121

### ЧАСТНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Микробиологические исследования при бактериальных инфекциях . . . . .	146
Тема 17. Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых гноеродными кокками . . . . .	146

Микробиологическая диагностика стафилококковых инфекций . . . . .	148
Микробиологическая диагностика стрептококковых инфекций . . . . .	151
Микробиологическая диагностика пневмококковых инфекций . . . . .	154
Микробиологическая диагностика цереброспинального менингита . . . . .	156
Микробиологическая диагностика гонорей . . . . .	157
Диагностические, профилактические и лечебные препараты . . . . .	159
Микробиологическая диагностика гнойных заболеваний, вызванных другими бактериями . . . . .	160
<b>Тема 18. Микробиологическая диагностика зоонозных инфекций . . . . .</b>	<b>162</b>
Микробиологическая диагностика чумы . . . . .	163
Микробиологическая диагностика туляремии . . . . .	166
Микробиологическая диагностика бруцеллеза . . . . .	168
Микробиологическая диагностика сибирской язвы . . . . .	172
Диагностические, профилактические и лечебные препараты . . . . .	175
<b>Тема 19. Микробиологическая диагностика кишечных инфекций . . . . .</b>	<b>177</b>
Микробиологическая диагностика колиэнтеритов и дизентериеподобных заболеваний . . . . .	179
Микробиологическая диагностика дизентерии . . . . .	180
Микробиологическая диагностика брюшного тифа и паратифа . . . . .	184
Микробиологическая диагностика пищевых отравлений бактериальной природы . . . . .	189
Диагностические, профилактические и лечебные препараты . . . . .	192
<b>Тема 20. Микробиологическая диагностика холеры . . . . .</b>	<b>195</b>
Диагностические, профилактические и лечебные препараты . . . . .	201
<b>Тема 21. Микробиологическая диагностика анаэробных инфекций (газовой гангрены, столбняка, ботулизма) . . . . .</b>	<b>202</b>
Микробиологическая диагностика газовой гангрены . . . . .	203
Микробиологическая диагностика столбняка . . . . .	206
Микробиологическая диагностика ботулизма . . . . .	208
Профилактические и лечебные препараты . . . . .	209
<b>Тема 22. Микробиологическая диагностика дифтерии . . . . .</b>	<b>210</b>
Диагностические, профилактические и лечебные препараты . . . . .	215
<b>Тема 23. Микробиологическая диагностика коклюша и паракоклюша . . . . .</b>	<b>216</b>
Диагностические, профилактические и лечебные препараты . . . . .	220
<b>Тема 24. Микробиологическая диагностика туберкулеза и проказы . . . . .</b>	<b>221</b>

Микробиологическая диагностика туберкулеза . . . . .	222
Микробиологическая диагностика проказы . . . . .	226
Диагностические, профилактические и лечебные препараты . . . . .	227
<b>Микробиологические исследования при спирохетозных инфекциях . . . . .</b>	<b>229</b>
Тема 25. Микробиологическая диагностика возвратного тифа, сифилиса и лептоспирозов . . . . .	229
Микробиологическая диагностика эпидемического возвратного тифа . . . . .	230
Микробиологическая диагностика сифилиса . . . . .	231
Микробиологическая диагностика лептоспирозов . . . . .	234
Диагностические, профилактические и лечебные препараты . . . . .	238
<b>Микробиологические исследования при заболеваниях, вызванных риккетсиями . . . . .</b>	<b>239</b>
Тема 26. Микробиологическая диагностика сыпного тифа и других риккетсиозов . . . . .	239
Диагностические, профилактические и лечебные препараты . . . . .	244
<b>Микробиологические исследования при заболеваниях, вызываемых патогенными грибами . . . . .</b>	<b>246</b>
Тема 27. Микробиологическая диагностика микозов и кандидамикозов . . . . .	246
Тема 28. Микробиологическая диагностика глубоких микозов . . . . .	251
Диагностические, профилактические и лечебные препараты . . . . .	251
<b>Вирусологические исследования при заболеваниях, вызываемых вирусами . . . . .</b>	<b>253</b>
Тема 29. Вирусологическая диагностика инфекций, вызываемых энтеровирусами . . . . .	253
Диагностические, профилактические и лечебные препараты . . . . .	258
Тема 30. Вирусологическая диагностика арбовирусных инфекций . . . . .	259
Диагностические, профилактические и лечебные препараты . . . . .	262
Тема 31. Вирусологическая диагностика гриппа и бешенства . . . . .	263
Диагностические, профилактические и лечебные препараты . . . . .	270
Вирусологическая диагностика бешенства . . . . .	271
Профилактические препараты . . . . .	272
Тема 32. Вирусологическая диагностика аденовирусных инфекций . . . . .	273
Диагностические препараты . . . . .	275
Тема 33. Вирусологическая диагностика натуральной оспы . . . . .	276
Профилактические и лечебные препараты . . . . .	280
<b>Микробиологические исследования при заболеваниях, вызываемых простейшими . . . . .</b>	<b>282</b>
Тема 34. Микробиологические исследования при амебиазе, малярии, лейшманиозе, токсоплазмозе . . . . .	282

ИБ 1748

**Руководство к лабораторным занятиям  
по микробиологии**

Редактор *С. А. Ефремова*  
Художественный редактор *О. А. Четверикова*  
Корректор *Л. В. Кудряшова*  
Техн. редактор *Н. И. Любковская*  
Переплет художника *В. И. Микриковой*

Сдано в набор 25.12.78. Подписано к печати  
23.03.79. Т-03506. Формат бумаги 84×108<sup>1</sup>/<sub>32</sub>.  
Бум. тип. № 2. Обычн. гарн. Печать высокая.  
Усл. печ. л. 15,96. Уч.-изд. л. 16,08. Тираж  
50 000 экз. (1-й завод 1—25 000). Заказ № 1182.  
Цена 90 к.

Ордена Трудового Красного Знамени издатель-  
ство «Медицина», Москва, Петроверигский пер.,  
6/8.

Московская типография № 11 Союзполиграф-  
прома при Государственном комитете Совета  
Министров СССР по делам издательств, поли-  
графии и книжной торговли. 113105, Москва,  
Нагатинская, 1.

## *К сведению читателей!*

**«Из плана выпуска литературы издательства «Медицина»  
на 1980 год:**

**ПЯТКИН К. Д., КРИВОШЕИН Ю. С. Микробиология.** — 4-е изд., перераб. и доп. — М.: Медицина, 1980.—40 л., ил. — 75 000 экз.

Учебник медицинской микробиологии с вирусологией и иммунологией представляет собой систематизированное изложение основных разделов курса в полном соответствии с программой, утвержденной Министерством здравоохранения СССР в 1975 г. и современным уровнем науки. Книга состоит из введения и двух частей: общая микробиология (таксономия и классификация, физиология, генетика микроорганизмов, учение об инфекции, учение об иммунитете и др.) и частной микробиологии (бактерии и вызываемые ими заболевания, вирусы и вызываемые ими заболевания, грибы и вызываемые ими заболевания, простейшие и вызываемые ими заболевания, микробиология полости рта). Систематика и название микроорганизмов даны по новой международной классификации и номенклатуре. Морфология, химический состав бактерий и вирусов изложены на основании современных данных о структуре микробных клеток и вирионов, полученных при помощи световой, электронной микроскопии и физико-химических методов. В специальной части представлена краткая характеристика наиболее распространенных патогенных групп микроорганизмов с описанием их морфологии, генетического аппарата, культивирования, антигенной структуры и других свойств.

Учебник написан в соответствии с программой, утвержденной Министерством здравоохранения СССР, и предназначен для студентов медицинских институтов.

План 1980 г.

**Книги издательства «Медицина» поступают для продажи в специализированные книжные магазины и магазины, имеющие отделы медицинской литературы.**