

С.І. Климнюк
І.О. Ситник
М.С. Творко
В.П. Ширококов

П Р А К Т И Ч Н А М І К Р О Б І О Л О Г І Я

*Рекомендовано Центральним методичним кабінетом
з вищої медичної освіти МОЗ України як навчальний посібник
для студентів вищих медичних навчальних закладів IV рівня акредитації
(протокол № 2 від 30.03. 2004 р.)*

Тернопіль
“Укрмедкнига”
2004

ББК 28.4я73

П 69

УДК 616-093/-098(075.8)

Рецензенти: зав. кафедри імунології, алергології та ендокринології
Буковинської державної медичної академії,
доктор мед. наук, проф. *І.Й. Сидорчук*;
зав. кафедри мікробіології, вірусології та імунології
Дніпропетровської державної медичної академії,
доктор мед. наук, проф. *Г.М. Кременчуцький*.

Климнюк С.І., Ситник І.О., Творко М.С., Ширококов В.П.

П 69 Практична мікробіологія: Посібник. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2004. –
440 с.

ISBN 966-673-059-6

Матеріал посібника подано відповідно до навчальної програми з курсу мікробіології, імунології та вірусології. Він складається з шести частин. Частина перша – “Загальна мікробіологія” – містить дані про організацію і режим роботи бактеріологічних лабораторій, методи дослідження морфології, фізіології, екології та генетики мікроорганізмів, визначення чутливості їх до антибіотиків. Друга частина присвячена імунологічній діагностиці інфекційних хвороб, методам їх специфічної профілактики та лікування. В третій частині описані основні властивості збудників бактеріальних інфекцій і методи їх лабораторної діагностики. Четверта частина присвячена характеристиці і класифікації вірусів та методів класичної і експрес-діагностики вірусних інфекцій. У п’ятій частині представлені основні відомості про найбільш поширені гриби, їх морфологічні особливості та лабораторні методи діагностики мікозів. Шоста частина містить дані про мікроскопічні дані найбільш поширених збудників протозоозів і методи діагностики захворювань, викликаних найпростішими.

Посібник призначений для студентів медичних факультетів вищих навчальних закладів IV рівнів акредитації.

ББК 28.4я73

УДК 616-093/-098(075.8)

ISBN 966-673-059-6

© Климнюк С.І., Ситник І.О.,
Творко М.С., Ширококов В.П., 2004.

Передмова

У XXI столітті постали важливі і невідкладні проблеми в галузі інфекційної патології. Економічна нестабільність життя населення, масова міграція людей призвели до значного погіршення епідеміологічної ситуації відносно особливо небезпечних інфекцій (чума, холера, сибірка, туляремія, лептоспіроз, та ін.). Значно зросла захворюваність на туберкульоз, дифтерію, гонорею, сифіліс, харчові токсикоінфекції.

Швидке постаріння людей, несприятлива екологічна ситуація, збільшення кількості осіб із супровідними бактерійними, грибовими і протозойними захворюваннями зумовило зростання патологічних процесів, викликаних умовно-патогенними мікроорганізмами. Широке розповсюдження мають госпітальні, хронічні, змішані та ендогенні інфекції. З року в рік зростає кількість таких нозологічних форм, як сепсис, септикопіємії, неспецифічні інфекції, і згійно-септичні захворювання шлунково-кишкового тракту, інфікування післяопераційних, опікових і посттравматичних ран, мікробіологічна діагностика яких розроблена ще недостатньо.

Бурхливий розвиток вірусології, збільшення частоти таких вірусних інфекцій як грип, гепатити, СНІД, геморагічні гарячки, енцефаліти, герпес, краснуха та ін. вимагають ретельного вивчення студентами особливостей їх лабораторної діагностики.

У програмах і навчальних планах чільне місце відводиться вивченню важливих проблем імунології, освоєнню методів імунологічної діагностики інфекційних хвороб, визначенню тестів імунологічного статусу людини, знайомству з методами виготовлення вакцин, діагностикумів, імунних сироваток тощо. Окрім того, у ВНЗ введено курс клінічної імунології, а в окремих з них створені навіть кафедри імунології. Це вимагає детального викладу постановки необхідних реакцій і тестів, методика і оцінка яких зазнали чималих змін.

У даному посібнику описані способи і методики мікроскопічної, бактеріологічної (вірусологічної), серологічної, імунологічної, біологічної та алергологічної діагностики інфекційних хвороб. Велика увага приділена використанню експрес-діагностики, новітнім люмінесцентно-серологічним дослідженням, реакціям коагулінації і латекс-аглютинації, застосуванню таких високочутливих методів як імуоферментний, імуоелектронний, радіоімунний, визначення імунних комплексів, моноклональних антитіл, реакцій гальмування гемаглютинації, непрямой гемаглютинації та ін.

Назви мікроорганізмів, схеми їх класифікацій подано відповідно до міжнародної системи та номенклатури, викладених у "Bergey's manual of systematic bacteriology" (1994).

Усі критичні зауваження і побажання щодо покращання посібника автори приймуть із щирою вдячністю.

Список умовних скорочень

АО – антитоксична одиниця
БУО – бляшкоутворююча одиниця
ВІЛ – вірус імунодефіциту людини
ГНТ – гіперчутливість негайного типу
ГСТ – гіперчутливість сповільненого типу
ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота
ІФА – імуноферментний аналіз
КОА – коагутинація
КУО – колонієутворююча одиниця
ЛАГ – латекс-аглютинація
МО – міжнародна одиниця
МПА – м'ясо-пептонний агар
МПБ – м'ясо-пептонний бульйон
ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція
РА – реакція аглютинації
РГА – реакція гемаглютинації
РГадс – реакція гемадсорбції
РГГА – реакція гальмування гемаглютинації
РГГадс – реакція гальмування гемадсорбції
РГНГА – реакція гальмування непрямой гемаглютинації
РЗК – реакція зв'язування комплементу
РЗНГА – реакція зворотної непрямой гемаглютинації
РІА – радіоімунний аналіз
РІФ – реакція імунофлуоресценції
РНГА – реакція непрямой гемаглютинації
РН – реакція нейтралізації
РНК – рибонуклеїнова кислота
РП – реакція преципітації
РПГ – реакція преципітації в гелі
СНІД – синдром набутого імунодефіциту

Частина I

ЗАГАЛЬНА МІКРОБІОЛОГІЯ

Розділ I

ОРГАНІЗАЦІЯ, УСТАТКУВАННЯ, РЕЖИМ РОБОТИ БАКТЕРІОЛОГІЧНИХ, ІМУНОЛОГІЧНИХ І ВІРУСОЛОГІЧНИХ ЛАБОРАТОРІЙ

Бактеріологічні лабораторії – спеціальні науково-дослідні, науково-практичні або практичні установи, в яких проводять мікробіологічні, біологічні та серологічні дослідження. Їх організовують при профільних науково-дослідних інститутах, навчальних закладах, клінічних лікарнях, санітарно-епідеміологічних станціях (СЕС). Мікробіологічні лабораторії в лікувально-профілактичних установах виконують відповідні аналізи з метою діагностики інфекційних хвороб, визначення строків виписування хворих з лікувальних закладів, визначення чутливості збудників до антибіотиків та інших препаратів, здійснюють контроль за ефективністю хіміотерапії, дотриманням санітарно-протиепідемічного режиму.

Бактеріологічні лабораторії районних СЕС проводять санітарно-бактеріологічні аналізи води і харчових продуктів, мікробіологічні дослідження випорожнень, сечі, жовчі, блювотних мас, промивних вод шлунка з метою виявлення хвороботворних і умовно-патогенних бактерій, виділення гемокультур при черевному тифі, паратифах, сепсисі та інших захворюваннях. Досить часто тут роблять аналізи харкотиння, слизу з рото- і носоглотки для виділення збудників туберкульозу, дифтерії, коклюшу, назофарингіту, проводять серологічну діагностику тифів, туляремії, бруцельозу, дослідження крові на виявлення малярійних плазмодіїв.

Бактеріологічні лабораторії міських і обласних СЕС, окрім вищеперелічених досліджень у більш повному обсязі, проводять аналізи повітря, посіви перев'язувальних матеріалів та лікарських препаратів на стерильність, змивів з рук, інструментів та інвентаря лікарняних і дитячих закладів, підприємств громадського харчування, за епідеміологічними і санітарними показаннями, а також для перевірки якості поточної і заключної дезінфекції. У лабораторіях такого рангу проводять повний аналіз на кокову, анаеробну і кишечну мікрофлору, постановку реакцій нейтралізації правцевого, ботулінового і стафілококового токсинів, визначення чутливості виділених збудників до антибіотиків методом серійних розведень, серологічні та люмінесцентно-серологічні дослідження при інфекційних захворюваннях, фаготипування і бактеріоцинотипування сальмонел і стафілококів, визначення видів атипичних мікробних культур. З метою попередження або виявлення госпіталь-

них інфекцій проводять дослідження носійства стафілококів, сальмонел та інших мікроорганізмів серед медичного персоналу, а також серед працівників харчоблоків і служб водопостачання для профілактики харчових токсикоінфекцій, здійснюють діагностику дисбактеріозів.

Планування, організація, устаткування і режим роботи бактеріологічної лабораторії повинні забезпечити основні вимоги до таких специфічних установ, тобто створити умови, які б забезпечили проведення досліджень при дотриманні стерильності, гарантували безумовне виключення можливого зараження персоналу і відвідувачів та спонтанну контамінацію мікробами доквілля, живильних середовищ, виділених чистих культур та інших матеріалів.

У структуру звичайної мікробіологічної лабораторії входить ряд приміщень спеціального призначення: одна або декілька лабораторних кімнат, бокс із передбокником, приміщення для приготування живильних середовищ (кухня), автоклавна (стерилізаційна), термостатна, мийка, препаратурська, кімната для забору або прийому досліджуваного матеріалу і його реєстрації, віварій для лабораторних тварин. Усі приміщення розташовують так, щоб заразний (“брудний”) матеріал не стикався і не перехреснувався з “чистим”.

Функціональні кабінети мають бути світлими, просторими, теплими, з підведенням гарячої і холодної води, електричного струму, з виходом вікон на північ або північний захід. Стіни, двері, підлогу виготовляють із матеріалів, які легко миються і дезінфікуються.

Лабораторна кімната – основне приміщення для проведення досліджень. Жорсткий протиепідемічний режим роботи вимагає її щоденного вологого прибирання та щомісячного проведення дезінфекції підлоги, стін, столів і обладнання. Робочі столи покриваються спеціальним пластиком або склом. У лабораторії доцільно виділити й обладнати окремі робочі місця та закріпити їх за кожним співробітником.

На робочому столі лікаря-мікробіолога повинні знаходитись тільки предмети, необхідні для проведення бактеріологічних досліджень: газовий пальник (спиртівка), пастерівські й градуйовані піпетки, пінцети, бактеріологічні петлі, шпатель, предметні та покрівні скельця, пробірки, штативи, чашки Петрі, аглютиноскоп, лупа, мікроскоп, банка з дезінфікуючим розчином. Біля стола повинна стояти посудина з дезрозчином, куди опускають відпрацьований заразний матеріал, який потім автоклавується.

Меблі бактеріологічної лабораторії мають бути простими, зручними, які легко миються і дезінфікуються. Сучасна лабораторія оснащується мікроскопами, автоклавами, термостатами, сушильними шафами, центрифугами, дистиллятором, апаратом для згортання сироватки, рН-метром, холодильником, лабораторною вагою, фотоелектроколориметром, апаратом для автоматичного підрахунку колоній, бактерійними фільтрами, комп’ютером, бактерицидними лампами.

Для проведення мікробіологічних досліджень в особливо стерильних умовах відводять окрему кімнату або бокс. Його площа повинна розраховуватись для роботи двох чоловік (5-8 м²), мати окремий вхід через тамбур (передбокник).

Меблі, які встановлюють у боксі (стіл, стільці, невелика шафа для стерильного посуду, середовищ тощо), мають бути простими, краще металевими, що спрощує їх знезараження. Стіни покривають облицювальною плиткою або світлою масляною фарбою, підлогу вистилають гладенькими плитами або лінолеумом. У тамбурі має бути водопровідний кран і умивальник для миття рук.

Сучасні бокси мають систему подачі стерильного повітря або ламінарних його потоків, що створює найкращі умови стерильності й безпеки. Перед початком і після роботи проводять вологе прибирання, дезінфекцію та опромінення бактерицидними лампами протягом 1-2 год. Повітря боксів систематично перевіряють на обсіменіння мікробами.

Для малих об'ємів роботи існують переносні настільні бокси або бокси-столи. Робочу його частину складає невелика скляна камера (100×70×70 см), яка має два отвори для рук, оснащені спеціальними нарукавниками. Кращим варіантом таких боксів є бокс з ламінарним потоком стерильного повітря.

Окрім звичайних бактеріологічних лабораторій в усіх обласних центрах, а також у великих морських портах організовують лабораторії для проведення діагностики особливо небезпечних інфекцій (чума, холера, сибірка, туляремія, бруцельоз, сап, меліюдоз, лептоспіроз, геморагічні гарячки та ін.). У цих лабораторіях встановлюють більш жорсткий протиепідемічний режим, який регламентується спеціальними інструкціями. Тут працює спеціально підготовлений персонал; особи, які мають протипоказання для проведення щеплень, до роботи в таких лабораторіях не допускаються.

Вірусологічні лабораторії – установи, які вивчають віруси, проводять діагностику вірусних інфекцій, виготовляють різноманітні вірусні препарати (вакцини, діагностичними, противірусні імунні сироватки тощо). Устрій та їх оснащення дещо відрізняються від бактеріологічних лабораторій. У структурі вірусологічної лабораторії обов'язково повинен бути бокс з тамбуром і ряд підсобних приміщень для обробки і стерилізації посуду, виготовлення живильних середовищ для вирощування клітинних культур, інкубатора для розвитку курячих ембріонів, устаткуванням для ліофілізації вірусів, віварій та ін.

Окрім звичайного лабораторного оснащення, необхідно мати гомогенізатори для подрібнення тканин, камери для глибокого і надмірного заморожування до температур -30-70 °С, холодильники, які можуть тримати температуру -20 °С, центрифуги на 2-3, 12-15 і 60 тис. об/хв. Для збереження клітинних культур потрібні судини Д'юара з рідким азотом.

Перед і після роботи проводять вологе прибирання та дезінфекцію приміщень таким же способом, як і бокси в бактеріологічних лабораторіях.

У **мікологічних лабораторіях** проводять мікроскопічні дослідження та ідентифікацію культур патогенних грибів з метою діагностики мікозів, рідше – ставлять досліди на тваринах. Режим їх роботи повинен попередити розсіювання зараженого грибами матеріалу, щоб уникнути інфікування персоналу. Робочі місця тримають у зразковому порядку, особистий одяг і речі зберігають у спеціально відведеному місці.

Лабораторні столи покривають листовим склом, одну половину якого знизу фарбують у чорний колір, другу – в білий. На чорному фоні краще помітні світлі культури грибів, на білому – відтінки пігменту досліджуваних колоній. Необхідно мати лампу з фільтром Вуда для відбору ураженого волосся при освітленні ультрафіолетовими променями.

При роботі з пліснявими грибами, які утворюють величезну кількість летючих спор, для захисту дихальних шляхів необхідно користуватись марлевими пов'язками (масками). Досліджуваний матеріал беруть лише за допомогою інструментів: ложечок Фолькмана, лопаточок, манікюрних кусачок, епіляційних, анатомічних та хірургічних пінцетів, платинових петель, препарувальних голок тощо. Знезараження відпрацьованих матеріалів проводиться такими ж способами, як і в бактеріологічних лабораторіях.

Діагностичні мікологічні лабораторії організовують при шкірно-венерологічних диспансерах. Із збудниками особливо небезпечних мікозів (бластомікоз, гістоплазмоз, кокцидіомікоз) працюють лише в спеціально оснащених лабораторіях.

Паразитологічні лабораторії – науково-практичні й практичні діагностичні установи, в яких здійснюються макроскопічні, мікроскопічні та імунологічні дослідження з метою діагностики паразитарних хвороб. Їх організація і устаткування принципово мало відрізняються від оснащення бактеріологічних лабораторій. Обов'язково мають бути мікроскопи з окулярними мікрометрами та нагрівальними столиками.

Макроскопічні методи дослідження полягають у виявленні паразитів на зовнішніх покривах хворого або в його випорожненнях. За допомогою мікроскопічних методів виявляють збудників у мазках крові, інших біологічних рідинах, шматочках м'язів, взятих при біопсії, а також у харкотинні, фекаліях та інших виділеннях. Останнім часом досить широко використовують імунологічні методи діагностики паразитарних хвороб, особливо аскаридозу, трихінельозу і ехінококозу.

Для попередження проникнення паразитів із досліджуваних матеріалів у рот необхідно користуватися піпетками з гумовими грушами. При дослідженні фекалій препарати з них слід виготовляти у витяжній шафі.

Весь заразний і відпрацьований матеріал треба кип'ятити, автоклавувати або обробляти дезінфікуючим розчином.

Імунологічні лабораторії виникли лише в другій половині ХХ століття. До цього серологічні дослідження проводили в звичайних бактеріологічних лабораторіях. Бурхливий розвиток імунології, розробка оригінальних методик і діагностичних тестів призвели до створення спеціальних імунологічних лабораторій, які можуть бути самостійними структурними одиницями або існувати в складі мікробіологічних лабораторій. Вони оснащуються термостатами, холодильниками, центрифугами, спеціальним посудом і приладами чи пристроями для проведення імунологічних реакцій у великих кількостях.

У сучасних імунологічних лабораторіях визначають біля 30 показників гуморального й клітинного імунітету (кількість Т- і В-лімфоцитів, концентрації ос-

новних класів імуноглобулінів, фагоцитарна реакція лейкоцитів, реакція бласт-трансформації лімфоцитів, циркулюючі імунні комплекси та ін.).

Для діагностики багатьох бактерійних, вірусних, паразитарних і протозойних хвороб широко використовують різні варіанти реакцій аглютинації, преципітації, нейтралізації, зв'язування комплементу, імунофлуоресценції, імуоелектрофорезу, радіоімунного та імуоферментного аналізу тощо.

При проведенні бактеріологічних і вірусологічних досліджень у лабораторіях відповідного профілю співробітники повинні дотримуватись протиепідемічного режиму і встановлених правил роботи:

1. До роботи в бактеріологічній (вірусологічній) лабораторії допускаються особи, які обізнані з правилами роботи в ній.

2. Кожен співробітник повинен працювати лише на закріпленому за ним робочому місці.

3. Персонал лабораторії повинен мати індивідуальний спецодяг (халат, шапочку, взуття). У боксі працюють у стерильних халатах, шапочках і марлевих масках. При зараженні й розтині тварин одягають ще й фартух, нарукавники й гумові рукавички.

4. Курити, вживати їжу й зберігати харчові продукти в лабораторії категорично заборонено.

5. Матеріал, що надходить у лабораторію для дослідження, завжди вважають заразним, його обов'язково записують у спеціальному журналі і маркують.

6. Відпрацьовані культури мікробів і заразні матеріали підлягають обов'язковому щоденному знищенню. Робочі столи і використані інструменти дезінфікують.

7. Переливати рідини, які містять патогенні мікроорганізми, необхідно над посудиною з дезінфікуючим розчином. При набірні таких рідин у піпетки потрібно користуватися гумовими балонами або грушами.

8. Коли при розбиванні колби чи пробірки заразний матеріал або жива культура потрапляє на робочий стіл, інші меблі, одяг, руки, підлогу, треба негайно повідомити про це завідувача лабораторії або лікаря-бактеріолога і в його присутності провести дезінфекцію заражених ділянок, потім обробити руки дезрозчином і ретельно їх вимити.

9. У лабораторії не дозволяються зайві ходіння, різні рухи, непотрібні розмови. Виконання цих вимог попереджує проникання сторонніх мікробів із повітря й ротової порожнини в досліджуваний матеріал.

10. Необхідно завжди уникати втрат і виносу з лабораторії заразного матеріалу, живих культур та інфікованих тварин. Усі термостати, рефрижератори та сейфи з культурами потрібно обов'язково пломбувати. Контролює виконання цих правил завідувач лабораторії або лікар-бактеріолог.

11. Музейні або виділені культури, якщо це необхідно, зберігають в агарових стовпчиках під вазеліновим маслом або в запаяних ампулах у ліофілізованому стані.

12. Після закінчення роботи столи дезінфікують, проводять вологе прибирання лабораторії з використанням дезінфікуючих розчинів. Предмети, матеріали, інструменти, інфіковані під час роботи, збирають у баки (відра) і в той же день стерилізують.

Правила поводження з живими культурами, виділеними в процесі дослідження, а також із музейними штамами мікроорганізмів, залежно від ступеня їх патогенності, регламентуються відповідними інструкціями.

Робота в лабораторіях, де проводять мікробіологічну діагностику особливо небезпечних інфекцій, вимагає ще більш жорсткого протиепідемічного режиму. Перед входом до лабораторії в гардеробній з індивідуальними шафами співробітники знімають верхній одяг і білизну.

Залежно від об'єму і характеру роботи одягають один із чотирьох типів протичумних костюмів у певній послідовності: піжама, шкарпетки, тапки, капюшон (косинка), протичумний халат, чоботи. Респіратор (маску) одягають так, щоб закрити рот і ніс, закладають ватні тампони з обох боків носа, потім надівають окуляри, гумові рукавички, за пояс халата з правого боку закладають рушник, змочений у дезрозчині.

По закінченні роботи руки в рукавичках занурюють у 5 % розчин лізолу на 2 хв. Протичумний костюм знімають у зворотній послідовності, за винятком рукавичок, які, не знімаючи з рук, занурюють у ємкість із дезінфікуючим розчином після зняття кожного предмета одягу і знімають останніми. Одяг складають зовнішньою стороною всередину і дезінфікують або автоклавують. Окуляри поміщають у 70 % спирт.

Після розтину трупів тварин усі інструменти кип'ятять у розчині лізолу протягом 40 хв, а самі трупи та відпрацьовані матеріали спалюють або автоклавують.

Розділ 2

МЕТОДИ ЛАБОРАТОРНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

При проведенні мікробіологічної діагностики інфекційних хвороб з метою їх раннього і остаточного розпізнавання у сучасних лабораторіях використовують різні методи дослідження.

Мікроскопічний (бактеріоскопічний, вірусоскопічний, протозооскопічний) – виготовлення й забарвлення мазків із досліджуваного матеріалу від хворого і вивчення його під мікроскопом. Він дає змогу швидко виявити характерні морфологічні особливості збудника й має важливе значення при діагностиці гонореї, менігококового менінгіту, туберкульозу, лепри, сифілісу, поворотного тифу, віспи, малярії, лейшманіозу, токсоплазмозу тощо.

Бактеріологічний метод зводиться до посіву матеріалу від хворого на відповідні живильні середовища, виділення чистої культури збудника й визначення його виду, а, отже, і встановлення остаточного діагнозу захворювання. Він має вирішальне значення при діагностиці черевного тифу, дизентерії, холери, дифтерії, чуми та інших хвороб.

Серологічний метод базується на виявленні специфічних антитіл у сироватці крові хворих до певного збудника. Для цього використовують різні імунологічні (серологічні) реакції: аглютинації, преципітації, зв'язування комплементу тощо. Так, наприклад, при черевному тифі часто ставлять реакцію аглютинації Відаля, при бруцельозі – реакцію Райта, при хронічній гонорей – реакцію зв'язування комплементу Борде-Жангу та ін.

Біологічний (експериментальний) метод полягає у зараженні чутливих лабораторних тварин виділеною чистою культурою збудника, досліджуванним матеріалом або введенні бактерійних токсинів і відтворенні типової картини захворювання. Для цього використовують білих мишей, щурів, гвінейських свинок, кроликів. Цим методом визначають і вірулентність мікробів. З діагностичною метою біологічну пробу часто використовують при чумі, сибірці, туляремії, правці, ботулізмі анаеробній газовій інфекції, кліщовому енцефаліті тощо.

Алергічний метод дає змогу встановити діагноз за допомогою внутрішньошкірних алергічних проб, які виявляють стан підвищеної чутливості до збудника чи продуктів його життєдіяльності (алергенів). Цим методом широко користуються при діагностиці туберкульозу (проба Манту), бруцельозу (проба Бюрне), туляремії та багатьох інших хвороб.

Для глибокого розуміння, засвоєння і логічного застосування бактеріоскопічного методу діагностики важливе значення має фундаментальне вивчення морфології й ультраструктури мікробів, методів їх простого й складного забарвлення, виявлення окремих структур і включень у бактерійній клітині. З цією метою в лабораторії широко використовують сучасні мікроскопи — високоінформативні оптичні прилади.

Мікроскопічні методи дослідження мікроорганізмів

Мікроорганізми і віруси дуже малі за своїми розмірами, тому побачити їх неозброєним оком неможливо. У той же час морфологія мікробів, їх розміри, форма, взаємне розташування клітин, наявність чи відсутність джгутиків, внутрішня ультраструктура є дуже важливою їх характеристикою і часто служить основою класифікації. Зважаючи на це, одним з найважливіших методів дослідження будови мікроорганізмів є мікроскопія. В основі сучасних мікроскопічних методів дослідження лежить світлова мікроскопія з численними її різновидами, такими як темнопольна, фазово-контрастна, аноптральна, поляризаційна, інтерференційна, люмінесцентна та ін. При вивченні анатомії й ультраструктури вірусів використовують електронну мікроскопію.

Сучасна промисловість випускає багато видів мікроскопів залежно від їх призначення. У практичній роботі рутинних баклабораторій найчастіше користуються мікроскопами МБР-1, МБР-3 (рис. 1).

Мікроскоп складається з механічної, оптичної й освітлювальної частин. До механічної входять штатив, тубус, револьвер, предметний столик, макро- й мікрогвинт, до оптичної – об'єктиви й окуляри, до освітлювальної – дзеркало й конденсор.

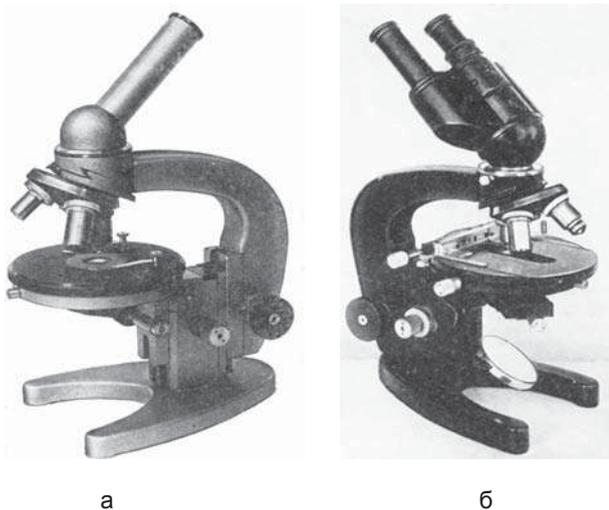


Рис. 1. Мікроскопи МБР-1 (а) і МБР-3 (б).

У верхній частині штатива є тубус, в який вставляється окуляр, а знизу він має револьвер, в отвори якого вгвинчені 3-4 об'єктиви. Обертаючи револьвер, можна встановити будь-який об'єктив під отвір тубуса. Останній підіймається і опускається за допомогою макро- й мікрометричного гвинтів. Для грубого наведення зображення користуються макроговинтом. Більш точно це робиться за допомогою мікрогвинта. Мікрометричний гвинт є однією з найбільш тендітних частин мікроскопа й вимагає обережного поводження з ним.

Предметний столик має круглу або прямокутну форму. В його центрі знаходиться отвір, над яким розміщують предметне скло з препаратом (мазком). У більш досконалих мікроскопах є дуже зручні предметні столики, які за допомогою спеціальних пристроїв переміщують предметне скло у двох взаємно перпендикулярних напрямках.

Найціннішою частиною мікроскопа є об'єктиви, які складаються з кількох лінз у загальній металевій оправі. Об'єктиви поділяються на сухі ($\times 8$, $\times 40$) та імерсійні ($\times 90$, $\times 120$). Сухими називають такі об'єктиви, між фронтальною лінзою яких і предметним склом знаходиться повітря. При цьому, у зв'язку з різницею показників заломлення скла й повітря (відповідно 1,52 і 1,0), частина світлових променів не потрапляє в око мікроскопіста. Імерсійними називають такі об'єктиви, між фронтальною лінзою яких і досліджуванним об'єктом знаходиться кедрова, персикова олія чи "імерсіол", коефіцієнт заломлення світла яких такий самий, як і в скла. При дослідженні морфології мікроорганізмів користуються переважно імерсійними об'єктивами, які часто називають імерсійною системою.

Найважливішою характеристикою будь-якого об'єктива є його роздільна здатність. Це та найменша відстань між двома точками, при якій вони ще видимі роздільно, тобто не зливаються в одну. Роздільна здатність об'єктива обмежена такими явищами, як хроматична й сферична аберації, дифракція та ін. Якщо обидва види аберації можна усунути, то явище дифракції існує в будь-якій оптичній системі і його усунути або принаймі зменшити практично неможливо. Дифракція в значній мірі обмежує роздільну здатність мікроскопів. Цю величину можна вираховувати за формулою:

$$A = 0,61 \frac{\lambda}{n \cdot \sin \alpha},$$

де A – роздільна здатність; $0,61$ – коефіцієнт геометричних величин при вирахованні освітленості першого дифракційного максимуму; λ – довжина світлової хвилі; $n \cdot \sin \alpha$ – постійна величина для кожного об’єктива, яка називається числовою або нумеричною апертурою. У сучасних сухих об’єктивах вона не перебільшує $0,95$, а в імерсійних – від $1,25$ до $1,60$. Нумеричні апертури вигравірувані на оправі кожного об’єктива. Роздільна здатність об’єктивів прямопропорційна їх нумеричній апертурі й обернено пропорційна довжині хвилі світла.

При мікроскопії у видимому світлі з довжиною хвилі $0,55$ мкм та імерсійним об’єктивом з максимальною числовою апертурою $1,60$ роздільна здатність дорівнює:

$$A = 0,61 \frac{0,55}{1,60} = 0,2 \text{ мкм}$$

Отже, при користуванні навіть найкращими імерсійними об’єктивами неможливо побачити об’єкти, які мають розміри менші за $0,2$ мкм. Корисне збільшення об’єктива не може перевищувати нумеричну апертуру більше, ніж у 1000 разів. Таким чином, максимальне корисне збільшення сучасних мікроскопів при використанні імерсійних об’єктивів з апертурою $1,40$ - $1,60$ досягає 1400 - 1600 .

Окуляр складається з двох лінз і тільки збільшує зображення, яке виходить від об’єктива, не додаючи до нього будь-яких деталей. Існують окуляри з такими збільшеннями: $\times 7$, $\times 10$, $\times 15$. Ці цифри позначені на них.

Освітлювальний апарат знаходиться під предметним столиком і складається із дзеркала та конденсора з діафрагмою. Дзеркало спрямовує пучок світла в конденсор, а через нього – в об’єктив мікроскопа. Один бік дзеркала увігнутий, другий – плоский. При мікроскопуванні з конденсором необхідно користуватись лише плоским дзеркалом. Конденсор Аббе складається з системи лінз для збирання пучка променів в одній точці (фокус), яка знаходиться в площині досліджуваного препарату. При роботі з денним освітленням конденсор потрібно підіймати до рівня предметного столика, з штучним – опускати доти, поки зображення джерела світла не з’явиться в площині препарату. При дослідженні незабарвлених препаратів конденсор також опускають.

Об’єм світла відповідно до потреб дослідження регулюється діафрагмою, яка знаходиться під конденсором. Вона може звужуватись і розширюватись подібно до зіниці ока (звідси назва іріс-діафрагма). Забарвлені препарати розглядають при відкритій, а незабарвлені – при звуженій діафрагмі.

Сучасні мікроскопи мають ряд удосконалень, завдяки яким покращується зображення та розширюються межі видимості. Перше досягнуто випуском мікроскопів-бінокулярів, друге – дослідженням у темному полі зору. Бінокулярний мікроскоп має спеціальну насадку з двома тубусами (бінокулярна насадка). Це створює ряд переваг при мікроскопуванні. Досліджуваний препарат розглядають відразу обома очима, що не викликає перевтоми органа зору. При цьому одночасно досягається більша чіткість глибини зображення і його пластичність.

З метою фундаментальних досліджень морфології мікроорганізмів та інших клітин оптична промисловість випускає більш досконалі мікроскопи. Одним із них

є мікроскоп універсальний біологічний дослідницький МБД-15. За його допомогою можна проводити широкий об'єм мікроскопічних досліджень: візуальне спостереження, використання світлого і темного полів зору в прямому, косому та відбитому світлі, метод фазових контрастів, люмінесцентну та інтерференційну мікроскопію. Для мікрофотографування досліджуваних об'єктів мікроскоп оснащений фотоапаратом з автоматичним затвором, фотоекспонетром та імпульсною лампою.

При вивченні динаміки розвитку і розмноження мікроорганізмів, дії на них різних фізичних і хімічних факторів, утворення L-форм та інших проблем виготовляють спеціальні мікроскопи з мікроустановками для цейтраферної (переривчастої) мікрокінозйомки, особливо з використанням методу фазових контрастів.

Правила роботи з імерсійною системою:

1. Підняти конденсор Аббе до рівня предметного столика, повністю відкрити іріс-діафрагму.

2. Користуючись об'єктивом 8, за допомогою плоского дзеркала домогтися максимального освітлення поля зору.

3. На предметному столику розмістити забарвлений препарат-мазок, нанести на нього кедрову олію і закріпити клемами.

4. Повертаючи револьвер, встановити над препаратом імерсійний об'єктив 90, під контролем зору занурити його в краплю кедрової олії.

5. Дивлячись в окуляр лівим оком (не закриваючи правого), спочатку за допомогою макрогвинта знайти контури зображення, потім, користуючись мікрогвинтом, досягти максимальної чіткості, вивчити і замалювати препарат.

6. Після закінчення роботи підняти тубус, зняти предметне скло, обережно витерти імерсійний об'єктив від кедрової олії, повернути його вбік, опустити тубус.

Освітлення за методом Келлера. Найкращі результати мікроскопії при суб'єктивних дослідженнях і мікрофотографуванні можна отримати лише при умові чіткого центрування всіх оптичних частин мікроскопа, включаючи і систему освітлення. Цього досягають при використанні методу Келлера.

1. Фабричний освітлювач з "точковим" джерелом світла встановлюють на віддалі 25-30 см від мікроскопа так, щоб плоске дзеркало відкидало світлову пляму діаметром біля 8 мм на закриту діафрагму конденсора. За цим процесом слідкують за допомогою дзеркальця, покладеного на праву ніжку мікроскопа.

2. На предметний столик вміщують препарат, користуючись сухими об'єктивами ($\times 8$, $\times 40$), наводять чітке зображення, знімають окуляр і на верхній кінець тубусу кладуть матове скельце. На ньому видно зображення об'єкта в центрі світлової плями. При необхідності установку коригують. Відкривають до оптимального діаметра отвір діафрагми конденсора.

3. Встановлюють необхідний об'єктив і окуляр (краще $\times 10$) і приступають до вивчення або фотографування досліджуваного об'єкта.

Препарати-мазки слід виготовляти на предметних скельцях товщиною не більше 1,1-1,4 мм.

Темнопольна мікроскопія відрізняється від звичайної імерсійної світлової способом освітлення препарату. У звичайному мікроскопі об'єкт досліджують при

світлі, яке проходить, у темнопольному – при боковому освітленні. Для мікроскопії в темному полі використовують замість конденсора Аббе спеціальний параболоїд-конденсор (кардіоїд-конденсор), в якому бокова поверхня дзеркальна, а центральна частина нижньої лінзи затемнена, в результаті чого утворюється темне поле зору. Яскраві бокові промені, відбиваючись від дзеркальної поверхні, фокусуються в площині об'єкта, але в очі мікроскопіста не потрапляють. В об'єktiv проникають лише ті промені, які відбиваються частинками препарату завдяки заломленню або дифракції. Отже, на темному полі зору мікробні клітини й інші дрібні частинки виглядають дуже яскравими. Картина нагадує миготливі зірки на темному небі.

Темнопольний мікроскоп дає змогу розглядати об'єкти розміром 0,02-0,04 мкм, тобто значно менші, ніж під звичайним світловим мікроскопом. Тому темнопольний мікроскоп часто називають ультрамікроскопом. Мікроскопію в темному полі зору використовують для дослідження рухливості бактерій, виявлення збудників сифілісу, лептоспірозу, поворотного тифу. Але при цьому не можна добре вивчити внутрішню структуру мікроорганізмів. Для цієї мети запропоновані видозмінені методи оптичної мікроскопії: фазово-контрастна, аноптральна та люмінесцентна.

Фазово-контрастна мікроскопія – спосіб мікроскопічного дослідження прозорих, не поглинаючих світла об'єktiv, який базується на підсиленні контрасту зображення. Він полягає в тому, що живі клітини (бактерії), слабо поглинаючи світло, все ж таки здатні змінювати фазу проникних променів. У різних ділянках клітини товщина, щільність, а, отже, й показники заломлення світла будуть неоднакові. Ці різниці у фазах ні орган зору, ні фотоплівка не помічають. Але їх можна зробити видимими за допомогою спеціального фазово-контрастного пристрою (рис. 2). Він включає в себе конденсор з набором кільцевих діафрагм, які забезпечують освітлення препарату повним конусом світла, та фазово-контрастні об'єktivи. Вони відрізняються від звичайних об'єktivів тим, що в їх головному фокусі розташовується напівпрозора фазова пластинка у вигляді кільця. Саме вона викликає здвиг фази світла, що проходить через неї. Це дозволяє зробити незабарвлені препарати чітко видимими.

При роботі з фазово-контрастним пристроєм клітини можуть виглядати темними (позитивний фазовий контраст) або світлими (негативний контраст) у порівнянні з оточуючим фоном. Цей вид мікроскопії не збільшує роздільної здатності, але дозволяє виявити нові деталі внутрішньої структури живих бактерій, стадії їх розвитку, зміни під впливом антибіо-

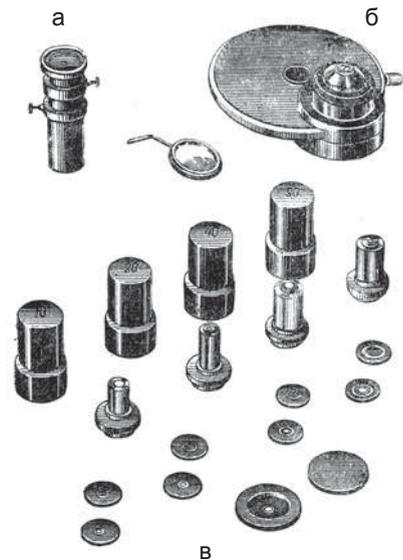


Рис. 2. Фазово-контрастний пристрій: а – допоміжний мікроскоп; б – револьверний конденсор з діафрагмами; в – спеціальні об'єktivи-ахромати.

тиків та інших хіміопрепаратів. Він має й деякі недоліки: слабка контрастність зображень, наявність сяючих ореолів навколо досліджуваних об'єктів. Значні переваги перед фазово-контрастним пристроєм має аноптральний мікроскоп.

Аноптральна мікроскопія – різновид фазово-контрастної, при якій використовують об'єктиви зі спеціальними пластинками, нанесеними на одну з лінз у вигляді затемненого кільця кіптяви або міді. Це обумовлює поглинання близько 10 % світла, яке проходить через об'єктив і робить фон поля зору сіро-коричневим. Широкий центральний отвір в шарові кіптяви чи міді випускає з об'єктиву основну частину дифрагованого світла, у той час як темний шар кільця затримує небажане периферійне дифраговане світло. За рахунок цього в значній мірі усувається ореол навколо досліджуваних клітин.

Аноптральна мікроскопія успішно використовується при вивченні таких малоконтрастних живих об'єктів як бактерії, гриби, найпростіші і навіть деякі віруси. При цьому досягається більша контрастність, роздільна здатність, стереоскопічність і чіткість зображення. Досліджувані мікроорганізми при цьому набувають різних відтінків: від білого до золотаво-коричневого.

Інтерференційна мікроскопія базується приблизно на тих же принципах, що й фазово-контрастна. Але на відміну від останньої вона дає можливість вивчати деталі прозорих об'єктів і проводити їх кількісний аналіз. Це досягається завдяки роздвоєнню світлового променя: один промінь проходить через частинку об'єкта, а другий – поза нею. В окулярі обидва промені з'єднуються та інтерферують між собою. Різницю виникаючих фаз можна виміряти, визначаючи тим самим масу різних структур у клітині. Так визначають товщину об'єкта, концентрацію в ньому сухої речовини, вміст води, що дає змогу зробити побічні висновки про проникність мембран, активність ферментів, метаболізм клітин.

Інтерференційну мікроскопію використовують у цитологічних дослідженнях, при кількісному аналізі клітинних структур живих об'єктів, наприклад, найпростіших, культур тканин тощо.

Люмінесцентна мікроскопія останнім часом широко використовується в мікробіологічних дослідженнях. Цей метод дозволяє спостерігати первинну або вторинну люмінесценцію (світіння) мікроорганізмів, клітин, тканин та окремих їх структур. Зображення в люмінесцентному мікроскопі настає через світіння самого препарату, яке виникає при освітленні його короткохвильовими променями. Метод побудований на використанні явища флуоресценції. Оскільки більшість хвороботворних мікробів не мають первинної (власної) люмінесценції, їх спочатку обробляють слабкими розчинами спеціальних барвників (флуорохромів), які зв'язуються певними структурами живих бактерій, не завдаючи їм шкоди. Найчастіше застосовують такі флуорохроми: акридиновий оранжевий, аурамін, корифосфін, ізотіоціанат флуоресцеїну, трипафлавін та ін.

Промені світла від сильного джерела, наприклад, ртутної лампи надмірного тиску, пропускають через синьо-фіолетовий світлофільтр. Під дією такого опромінення забарвлені флуорохромом бактерії починають світитися червоним, зеленим, жовтим або іншим світлом. Так, при забарвленні дифтерійних паличок корифос-

фіном вони набувають жовто-зеленого світіння, а при обробці аураміні-родаміном збудник туберкульозу світиться золотаво-оранжевим кольором.

Метод люмінесцентної мікроскопії набагато чутливіший порівняно з іншими мікроскопічними дослідженнями. Він дозволяє виявити таку малу кількість збудника, яку іншими методами не знаходять. За характером люмінесценції диференціюють окремі хімічні речовини, що входять до складу мікробних клітин. Використання люмінесцентного мікроскопа має ряд переваг: кольорове зображення, висока контрастність, можливість досліджувати як живі, так і вбиті мікроорганізми.

Люмінесцентну мікроскопію широко застосовують для виявлення антигенів і антитіл (метод імуофлуоресценції). За її допомогою можна побачити мікроби, які містять певні антигени. Для їх виявлення необхідно мати специфічні люмінесцентні сироватки, які викликають флуоресценцію саме даного антигена. Цей метод успішно використовують для експрес-діагностики багатьох бактерійних і вірусних захворювань.

Окрім люмінесцентного пристрою ОІ-17 та спеціальних освітлювачів ОІ-18, ОІ-28, ОСЛ-1, бактеріологічні лабораторії оснащені люмінесцентними мікроскопами МЛ-2, МЛД-1 та ін. Модель МЛ-2 має великий комплект оптики, фільтрів, фотонасадку, дає змогу проводити одночасно комбіновані спостереження: люмінесцентне – при освітленні препарату зверху і фазово-контрастне – в проникному світлі (рис. 3).

Електронна мікроскопія. Для вивчення будови мікроорганізмів на субклітинному і молекулярному рівнях, а також для дослідження структури і архітекtonіки вірусів використовують електронний мікроскоп. Це високовольтний вакуумний прилад, у якому збільшене зображення отримують за допомогою потоку електронів. Він має високу роздільну здатність і може давати збільшення від 20 тис. до 5 млн разів. За принципом дії розрізняють просвічуючі (трансмисивні), скануючі (растрові) й комбіновані електронні мікроскопи.

Принципова схема просвічуючого електронного мікроскопа мало чим відрізняється від звичайного оптичного. Можливості світлового мікроскопа обмежені не якістю лінз, а великою довжиною світлових хвиль (0,29-0,8 мкм). Мала довжина хвилі електронів (0,0002 мкм і навіть менше) дозволяє значно збільшити роздільну здатність електронного мікроскопа. Замість світла в ньому використовують потік електронів, джерелом яких є вольфрамова нитка, що нагрівається електричним струмом (електронна пушка). Роль лінз оптичного мікроскопа виконує кругове електромагнітне поле. Пучки електронів, проходячи через досліджуваний об'єкт, відхиляються під різними кутами залежно від неоднакової товщини та

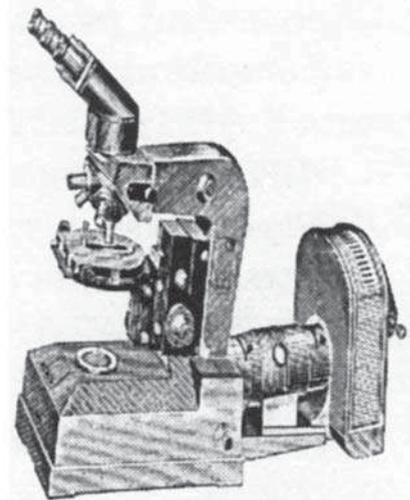


Рис. 3. Люмінесцентний мікроскоп.

щільності різних ділянок препарату і потрапляють в об'єктивну лінзу. В ній появляється перше корисне збільшення об'єкта.

Після об'єктивної лінзи електрони потрапляють у проміжну лінзу, яка слугує для плавного збільшення зображення. Проекційна лінза створює кінцеве збільшене зображення об'єкта, яке направляється на флуоресціюючий екран. Завдяки взаємодії швидких електронів з люмінофором екрану виникає видиме зображення об'єктів. Після наведення чіткості проводять фотографування.

Електронна мікроскопія вимагає спеціальної підготовки об'єктів дослідження. Необхідна спеціальна фіксація тканин або бактерій, їх ретельне зневоднення, заливка в епоксидні смоли, виготовлення ультратонких зрізів. Для підвищення чіткості зображення використовують методи позитивного й негативного контрастування та відтінення.

Досліджуваний об'єкт спочатку зафіксують особливими фіксаторами, потім наносять на надзвичайно тонку колодієву або целюлозну плівку, вміщену на спеціальну сіточку-підкладку. При напыленні на поверхню препарату під певним кутом у вакуумі наносять тонким шаром важкі метали, хром, золото, паладій. Розпоршені частинки металу осідають на піднесених чи заглиблених ділянках бактерій або вірусів. При дослідженні таких препаратів деталі їх структури проявляються рельєфно й контрастно (позитивне контрастування). Негативне контрастування зводиться до нанесення на препарат розчинів з атомами важких металів, наприклад, фосфорно-вольфрамової кислоти. Осідаючи навколо білкових частинок досліджуваного об'єкта й заповнюючи всі проміжки між ними, атоми важких металів "забарвлюють" фон, на якому виступають найменші деталі будови мікроорганізмів.

Широко також використовують ультратонкі зрізи клітин, бактерій, що дає змогу вивчити їх структуру на субклітинному й молекулярному рівнях.

Сучасна українська й зарубіжна промисловість випускає багато моделей електронних мікроскопів (рис. 4), які мають величезні можливості для вивчення мікроскопічного світу.

Методи електронної мікроскопії привели до великих успіхів у розвитку таких наук як цитологія, бактеріологія, генетика і, особливо, вірусологія. Успішно розвивається імунна електронна мікроскопія, яка дає змогу визначити родову належність вірусів, що використовується для

експрес-діагностики багатьох вірусних інфекцій.

Бактеріологічний, серологічний, біологічний та алергічний методи діагностики інфекційних хвороб детально викладені в наступних розділах.

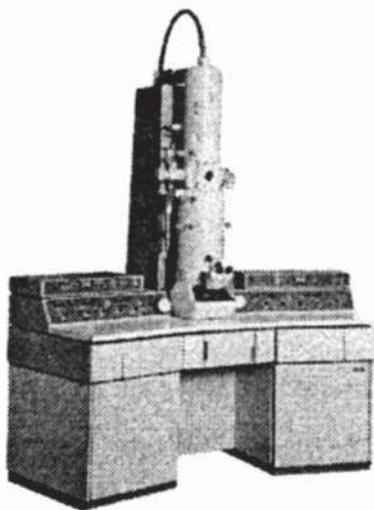


Рис. 4. Електронний мікроскоп.

Розділ 3

МОРФОЛОГІЯ МІКРООРГАНІЗМІВ

У даному розділі розглядаються методи дослідження морфологічних особливостей основних представників різноманітних мікроорганізмів: бактерій, актиноміцетів, грибів, найпростіших, рикетсій. Всі вони належать до одноклітинних організмів, мають різну форму і внутрішню структуру, які досліджують за допомогою вищеописаних методів мікроскопії.

Виготовлення мазків і методи їх забарвлення

Бактеріоскопічне дослідження будь-якого клінічного матеріалу, де знаходяться збудники інфекційних хвороб, є однією з найпоширеніших мікробіологічних методик. У лабораторній практиці частіше проводять мікроскопію фіксованих забарвлених мазків і рідше нативних препаратів у вигляді стисненої чи висячої крапель. Їх виготовляють на заздалегідь підготовленому і оснащеному робочому місці.

На столі повинні бути лише необхідні матеріали, інструменти і пристрої: клінічний матеріал (кров, гній, слиз, харкотиння, сеча, випорожнення та ін.), культури мікроорганізмів у пробірках або чашках Петрі, бактеріологічні петлі, піпетки, пінцети, штативи, предметні скельця, газовий пальник, ізотонічний розчин хлориду натрію, розчини барвників, лотки з рейками для фарбування мазків, промивалка з водою, фільтрувальний папір, банка з дезрозчином для знезараження використаних препаратів і піпеток. Доцільно в лабораторії обладнати окремий столик для забарвлення мазків.

Препарати-мазки виготовляють на предметних скельцях, товщина яких через оптичні властивості конденсора Аббе не повинна перебільшувати 1-1,2 мм. Скельця необхідно заздалегідь ретельно знежирити. Для цього протягом доби їх витримують у концентрованій сірчаній кислоті або кип'ячать у суміші 6 % розчину двохромового калію і сірчаної кислоти, ретельно промивають проточною водою, переносять у банку з 96° спиртом, де вони зберігаються до використання. Можна знежирені і витримані в спирті скельця витерти насухо лляною тканиною і зберігати в герметично закритій скляній банці. Крапля води, нанесена на холодне знежирене скло, повинна рівномірно розтікатися, а не збиратись у дрібні крапельки.

Виготовлення препаратів-мазків із щільного (густого) клінічного матеріалу або з культури на твердому середовищі. Знежирене предметне скельце проводять через полум'я газового пальника і після охолодження кладуть на робоче місце. Для виготовлення мазка матеріал чи культуру беруть бактеріологічною петлею з платиного або хромонікелевого дроту довжиною 5-6 см. Петлю закріплюють у петлетримачі. Кінець її згинають у вигляді замкнутого кільця розміром 1x1,5 чи 2x3 мм. Для деяких робіт потрібно мати цей інструмент у вигляді голки, коли кінець не згинають у кільце, а залишають прямим (рис. 5).

Бактеріологічну петлю прожарюють у полум'ї, тримаючи її як олівець вертикально у правій руці. Два-три рази проводять через полум'я і нижню третину петле-

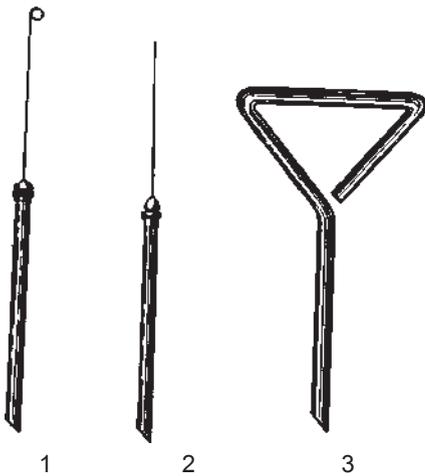


Рис. 5. Бактеріологічна петля (1);
бактеріологічна голка (2); шпатель
Дригальського (3).

тримача. Не випускаючи петлі, лівою рукою беруть пробірку з 0,9 % стерильним розчином натрію хлориду, а 4-им і 5-им пальцями правої руки затискають ватно-марлеву пробку, витягують її, і вінець пробірки проносять через полум'я пальника, тримають на віддалі 15-20 см від полум'я, не випускаючи пробки. Петлю вводять у пробірку і охолоджують її, торкаючись стінки. Занурюючи петлю в рідину, набирають краплю фізрозчину. Виймають петлю, проводять пробку і відкритий край пробірки через полум'я, після чого її закривають і ставлять у штатив. На центр скельця бактеріологічною петлею наносять взятую краплю ізотонічного розчину.

Петлю знову стерилізують, у ліву руку беруть пробірку з досліджуванним матеріалом

чи культурою мікроорганізмів. Відкривають пробірку із дотриманням усіх правил, охолоджують петлю і набирають нею невелику кількість матеріалу чи культури. Петлю виймають, а пробірку закривають і ставлять у штатив. Взятий матеріал (або культуру) наносять на скло біля краплі фізрозчину і, поступово розтираючи його та емульгуючи в краплі, готують тонкий, рівномірний мазок округлої чи овальної форми діаметром 1-1,5 см. Після цього петлю прожарюють і ставлять у штатив.

Виготовлення мазків із рідкого клінічного матеріалу або з культури на рідкому середовищі. Бактеріологічною петлею набирають краплю досліджуваного матеріалу або культури з рідкого середовища із дотриманням правил стерильності, як вище описано. Взятий матеріал наносять на предметне скельце і роблять рівномірний тонкий мазок.

Якщо для забору матеріалу використовують стерильну пастерівську піпетку, її також тримають у правій руці і проводять через полум'я перед внесенням у пробірку. Тонкий кінчик піпетки після охолодження біля стінки пробірки занурюють у рідкий досліджуваний матеріал чи бульйонну культуру, тримаючи верхній кінець її відкритим. Після попадання в піпетку досліджуваного матеріалу чи культури верхній кінець її закривають вказівним пальцем, виймають з пробірки. Останню закривають і ставлять у штатив. На поверхню предметного скла з піпетки випускають краплю матеріалу і опускають її в дезрозчин. Простерилізованою бактеріологічною петлею роблять мазок.

Виготовлення мазків із харкотиння або гною. При готуванні мазків із матеріалів, які погано розтираються (гній, харкотиння), використовують два предметних скла. Невелику кількість матеріалу стерильною бактеріологічною петлею або пастерівською піпеткою наносять на середину знежиреного предметного скла і покривають його другим склом так, щоб 1/3 верхнього і нижнього скла залишалась вільною. Обидва скла сильно затискають між пальцями, роздавлюють дослі-

джуваний матеріал і за вільні кінці розводять їх у сторони. Таким способом одержують два однакових мазки (рис. 6).

Виготовлення мазків із крові. Скарифікатором роблять прокол пучки 4-го пальця лівої руки. Після появи краплі крові до неї торкаються поверхнею біля краю знежиреного стерильного предметного скла, яке швидко кладуть на стіл. Краєм іншого трохи вужчого і шліфованого скла торкаються краплі і нахиливши його під кутом 45° швидко і обережно проводять ним у напрямку до дальшого краю. Внаслідок капілярності кров захоплюється краєм верхнього скла і під час руху розмазується по нижньому склі (рис. 7). Правильно виготовлений препарат виходить тонким, дещо просвічується та має жовтувате забарвлення.

Із крові виготовляють також препарат “товстої краплі”. На предметне скло наносять роздільно 2-3 звичайні краплі крові, злегка змішують їх скляною паличкою, петлею або кутом іншого предметного скла так, щоб утворилась плоска кров’яна пляма діаметром біля 1,5 см. Такі препарати виготовляють зокрема для діагностики малярії, поворотних тифів.

Мазки-відбитки роблять із органів трупів людей і тварин, харчових продуктів щільної консистенції (сир, м’ясо, шинка, ковбаса, риба та ін.), а також з поверхні молодих колоній грибів, актиноміцетів, рідше — бактерій. Розжареним у полум’ї скальпелем припікають поверхню органа або харчового продукту. Потім стерильними ножицями з цієї ділянки вирізають шматочок тканини. Поверхнею зрізу торкаються предметного скла у 2-4 місцях, роблячи мазок-відбиток. Такі ж мазки-відбитки можна виготовити з ділянки шкіри або слизової оболонки. Притискання досліджуваного об’єкта до скла повинно бути строго вертикальним тривалістю 1-2 с. Мазки-відбитки з колоній роблять на покрівних скельцях.

Висушування і фіксування препаратів-мазків. Виготовлені мазки висушують при кімнатній температурі або в термостаті. Тонкі мазки швидко висихають на повітрі, більш товсті можна висушувати над полум’ям газового пальника. Предметне скло при цьому тримають за ребра 1-им і 2-им пальцями правої руки мазком догори. Щоб не допустити денатурації білків бактерій і порушення їх внутрішньої структури ступінь нагрівання контролюють середнім пальцем, який знаходиться під предметним склом.

Висушені препарати необхідно фіксувати до поверхні скла. Незафіксований мазок є заразним, тому при роботі з ним треба бути дуже обережним, не торкатись до нього руками. При фіксації одночасно відбувається прикріплення бактерій до скла та їх знезараження. До того ж вбиті мікроорганізми значно краще забарвлюються.

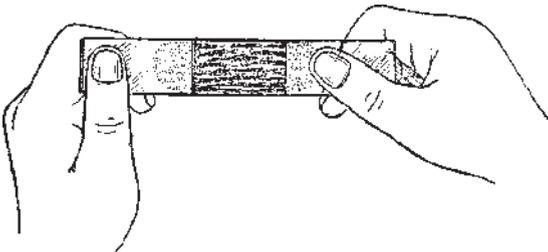


Рис. 6. Виготовлення мазка з харкотиння.

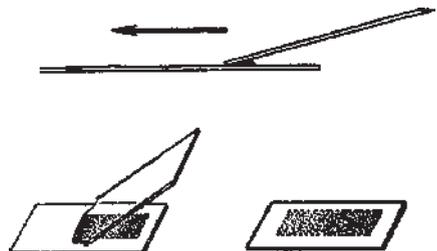


Рис. 7. Виготовлення мазка з крові.

У лабораторній практиці найпоширенішим методом фіксування мазків є фламбування – тобто фіксація в полум'ї газового пальника або спиртівки. При цьому мазок тримають так само, як при висушуванні і тричі проводять його через полум'я. Весь процес фіксації триває 5-6 с, а дія жару – 2 с. Більш тривале фіксування жаром зменшує якість препарату, а недофіксований мазок при наступній обробці змивається і таїть в собі небезпеку зараження.

При вивченні деяких структур мікробних клітин, а також мазків крові, відбитків органів використовують такі фіксуючі рідини як етанол (протягом 10-15 хв), метанол (5 хв), ацетон (5 хв), суміш Никифорова (10-15 хв), пари формаліну або осмієвої кислоти (декілька секунд). При такому обережному фіксуванні значно краще зберігаються і виявляються всі структури клітин і бактерій.

Забарвлення препаратів-мазків. Морфологію бактерій вивчають, як правило, на зафіксованих і забарвлених препаратах. Незабарвлені мікроорганізми, за винятком грибів, погано видно у світловому мікроскопі через їх малу контрастність. Для фарбування мазків у бактеріологічних лабораторіях широко вживають анілінові барвники. Вони поділяються на кислі, нейтральні та основні. Останні добре забарвлюють як ядерний апарат, так і цитоплазматичні структури. Позитивно заряджена фарбуюча частина їх молекули швидше і повніше вступає в сполуку з негативно зарядженою бактерійною клітиною. Кислі ж барвники фарбують мікробів значно слабше. Здатність та індивідуальна особливість бактерій фарбуватись тими чи іншими барвниками називають їх тинкторіальними властивостями.



Рис 8. Флакони для барвників і пристрій для промивання забарвлених препаратів.

У повсякденній лабораторній практиці найчастіше вживають такі барвники: червоні – фуксин основний (діамантфуксин, солянокислий розанілін або парарозанілін), фуксин кислий, нейтральний червоний, сафранін, конго червоний; фіолетові – генціан-, кристал- і метил-фіолет; сині – метиленовий і толуїдиновий синій, трипановий голубий; зелені – малахітовий, брильянтовий зелений; жовто-коричневі – везувін, хризоїдин та ін.

Для забарвлення мазків необхідно мати набір фарбуючих розчинів у флаконах з піпетками і гумовими балончиками. Їх зручно розміщувати у дерев'яному штативі (колодці з гніздами). Змивання барвників і прополоскування препаратів роблять за допомогою спеціальних пристроїв (рис. 8).

Запропоновані численні методи забарвлення бактерій. Вони поділяються на прості й складні.

Прості способи забарвлення бактерій

Простий метод забарвлення дає можливість дослідити загальну морфологію мікробів, їх розміри, форму, кількість, локалізацію, взаємне розташування клітин тощо. Але за його допомогою неможливо вивчати внутрішню структуру бактерій та їх різне відношення до декількох барвників.

Простим забарвленням називають таке, при якому застосовують лише один барвник. Найчастіше використовують основний розведений фуксин Пфейфера і лужну метиленову синьку Леффлера. Фуксином фарбують 1-2 хв, а синькою – 3-5 хв. Препарати, що містять, окрім бактерій, тканинні й клітинні елементи макроорганізму, краще забарвлювати метиленовою синькою, яка фарбує фон препарату порівняно слабко, а бактерії – значно інтенсивніше.

На зафіксований препарат наносять піпеткою таку кількість барвника, щоб він покривав увесь мазок. Після фарбування препарат промивають водопровідною водою і висушують на повітрі, або притискають фільтрувальним папером, потім проводять над полум'ям, щоб випарувались залишки води. Якщо на препараті залишиться вода, то, з'єднавшись з імерсійною олією, вона утворить емульсію, яка заважатиме чіткому зображенню.

При висушуванні мазків за допомогою листків фільтрувального паперу потрібно кожного разу користуватися новими, оскільки при повторному вживанні переносяться забарвлені бактерії з одного мазка на інший, що може призвести до неправильних висновків.

Виготовлення барвників для простого забарвлення

1. **Фуксин основний** готують у вигляді концентрованого фенолового фуксину Циля. Він дуже стійкий, може зберігатись протягом декількох місяців. У концентрованому вигляді вживається лише для фарбування спор і кислотостійких бактерій. Для простого забарвлення та за методом Грама його розводять дистильованою водою 1:10, отримуючи так званий розведений, або водний фуксин Пфейфера. Цей розчин дуже нестійкий і його готують безпосередньо перед вживанням.

Феноловий фуксин Циля

<i>Основний фуксин</i>	<i>1 г</i>
<i>Етанол 96°</i>	<i>10 мл</i>
<i>Фенол кристалічний</i>	<i>5 г</i>
<i>Гліцерин</i>	<i>кілька крапель</i>
<i>Вода дистильована</i>	<i>100 мл</i>

Спочатку фуксин з кристалами фенолу і гліцерином розтирають у ступці до однорідної маси, потроху додаючи спирт, потім, весь час перемішуючи, доливають дистильовану воду. Розчин витримують при кімнатній температурі протягом 48 год і фільтрують. З нього потім виготовляють водний фуксин.

Фуксин Пфейфера

Фуксин Циля	1 мл
Вода дистильована	9 мл

2. Метиленова синька. Спочатку готують насичений спиртовий розчин метиленової синьки, який дуже стійкий. При зберіганні його фарбуючі властивості, а також здатність давати метахроматичне забарвлення нуклеїнових сполук (напр. волютинових зерен) значно підвищується за рахунок утворення азурів.

Насичений спиртовий розчин метиленової синьки

Метиленової синьки	10 г
Етанол 96°	100 мл

Із даного розчину готують лужну метиленову синьку за Леффлером, яку дуже широко використовують для простого методу забарвлення.

Метиленова синька за Леффлером

Спиртовий розчин метиленової синьки	30 мл
Гідроксид натрію або калію 1 %	1 мл
Дистильована вода	100 мл

Водно-спиртовий розчин метиленової синьки

Спиртовий розчин метиленової синьки	10 мл
Дистильована вода	100 мл

Лужна метиленова синька за Леффлером, як і її водно-спиртовий розчин, можуть давати забарвлення різної інтенсивності у різних видів бактерій.

До простих методів забарвлення можна віднести і *негативний спосіб Буррі*. При ньому за рахунок туші створюють темний фон, а бактерії залишаються незабарвленими. Для стабільних і чітких результатів необхідно дуже ретельно підготувати суспензію туші. Вибирають найкращі сорти рідкої китайської туші й розводять її дистильованою водою 1:10. Можна натерти сухої китайської туші й довести її до такої ж густоти. Суспензію туші довго центрифугують при 3 тис. об/хв. Верхній шар відсмоктують піпеткою і в надавленій краплі під імерсійним об'єктивом перевіряють її на відсутність грубих частинок. Якщо суспензія хороша, її натягують у тонкі капіляри по 0,1-0,2 мл, запаюють і стерилізують в автоклаві.

При дослідженні краплю туші з капіляра випускають на предметне скло, добавляють крапельку матеріалу (рідину з сифілітичної виразки, культуру капсульних бактерій, лептоспір та ін.) і ретельно перемішують петлею. Шліфованим предметним склом зі зрізаними кутами готують тонкий препарат так само, як мазок крові, висушують, не фіксують. При мікроскопії тіла бактерій, спірохет, лептоспір виглядають білими, чітко окресленими на темному димчасто-сірому фоні. Замість туші можна використати 2-10 % розчини опалового синього, конго червоного, нігрозину, коларголу та ін. В такому разі фон буде мати інший колір.

Необхідно враховувати, що мікроорганізми в таких препаратах не вбиті і можуть стати джерелом зараження, як і в мазках, обережно фіксованих у полум'ї пальника.

При вивченні забарвлених препаратів царства прокаріот виділяють чотири основні форми бактерій:

1) кулясті (сферичні), або кокоподібні; 2) паличкоподібні (циліндричні); 3) спіралеподібні (звивисті); 4) ниткоподібні (трихобактерії).

Кокоподібні бактерії (від гр. kokos – зерно, кісточка) мають правильну кулясту форму діаметром 1,0-1,5 мкм. Деякі з них набувають бобоподібної, ланцетоподібної та еліпсоподібної форми (рис. 9). За способом ділення та взаємного розташування в мазках всі коки поділяють на такі групи:

1. Мікрококи (від лат. mikros – малий). Вони діляться в одній площині, розташовуються поодинокі й хаотично; серед них хвороботворних видів для людини немає.

2. Диплококи (від лат. diplos – подвійний). Ділення їх проходить в одній площині з утворенням подвійних парних клітин, які мають форму kwasoli (*Neisseria meningitidis*), або вістря ланцета (*Streptococcus pneumoniae*).

3. Стрептококи (від гр. streptos – ланцюг, намисто). Після поділу в одній площині мікроби не розходяться, а формують різної довжини ланцюжки, щонагадують намисто. Частина з них є сапрофітами, представниками нормальної мікрофлори людини (напр., ротові стрептококи). Інші види (*Streptococcus pyogenes*) викликають такі тяжкі захворювання як сепсис, остеомієліт, скарлатину, бешиху, ревматизм.

4. Стафілококи (від лат. staphyle – гроно). Вони діляться в декількох площинах, а утворені клітини розташовуються у вигляді скупчень, що нагадують виноградні грона. Стафілококи спричиняють більше 100 різноманітних захворювань у людей і тварин, а один із типових видів *Staphylococcus aureus* є найчастішим збудником багатьох гнійно-септичних процесів.

5. Тетракоки (від лат. tetra – чотири). Після поділу у двох взаємно перпендикулярних площинах клітини не розходяться, а розташовуються тетрадами. Вони, як правило, не патогенні для людини.

6. Сарцини (від лат. sarcio – зв'язую) – коки, які діляться в трьох взаємно перпендикулярних площинах і після поділу не розходяться, а розташовуються у вигляді паків з 8, 16, 32, 64 клітин. Серед них є умовно-патогенні представники.

Паличкоподібні бактерії не менш різноманітні за своєю формою і розташуванням у мазках. Середні розміри їх



Рис. 9. Основні форми бактерій:

1-6 – сферичної форми: 1 – стафілококи; 2-3 – диплококи; 4 – стрептококи; 5 – тетракоки; 6 – сарцини; 7-9 – паличкоподібні; 10-12 – спіралеподібні форми: 10 – вібріони; 11 – спірили; 12 – спірохети.

1,0-10 мкм завдовжки і 0,5-2,0 мкм завширшки (рис. 9). Вони поділяються на бактерії, бацили і клостридії. Власне бактерії (від гр. *bacteria* – паличка) – мікроорганізми, що не утворюють спор. Бацили (від лат. *bacillus* – паличка) мають спори, які не перебільшують діаметр мікробної клітини. Клостридії (від лат. *clostridium* – веретеноподібний) утворюють спори, що перебільшують поперечний розмір клітини і дещо деформують її.

Форма паличкоподібних бактерій може бути овальна, циліндрична, еліпсоподібна, веретеноподібна, у вигляді барабанної палички, тенісної ракетки. Їх кінці бувають заокруглені, загострені, булавоподібні, рівні, нібито обрублені тощо. Паличкоподібні бактерії розмножуються шляхом поперечного поділу.

За аналогією з коками, залежно від взаємного розташування в мазках, паличкоподібні мікроорганізми поділяють на такі групи:

1. Монобактерії при поділі розташовуються поодинокі (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi*).

2. Монобацили також розташовані поодинокі, але мають спори (*Bacillus subtilis*, *Clostridium tetani*).

3. Диплобактерії розташовуються в мазках парно (*Klebsiella pneumoniae*).

4. Диплобацили – парне розташування споривих мікроорганізмів.

5. Стрептобактерії – безспорові палички, які розташовані у вигляді ланцюжків (*Haemophilus ducreyi*).

6. Стрептобацили – спорові мікроби, що розташовуються ланцюгом (*Bacillus anthracis*).

Спіралеподібні (звивисті) бактерії (рис. 9) за кількістю і характером завитків, а також за діаметром клітини поділяють на три групи:

1. Вібріони (від гр. *vibrio* – звиваюся) мають одну характерну зігнутість, яка не перебільшує чверті витка спіралі, але може мати і форму прямої палички. Прикладом хвороботворного виду є *Vibrio cholerae*.

2. Спірили (від гр. *speira* – завиток, спіраль) – товсті звивисті мікроорганізми, які мають малу кількість завитків (2-3), що надає їм форму штопора. Патогенна для людини *Spirillum minor* викликає содоку (хворобу укусу щурів). До цієї групи мікробів належать також кампілобактерії та гелікобактерії, які здатні спричинити у людини захворювання шлунково-кишкового тракту, сечостатевого органів.

3. Спірохети (від гр. *speira* – завиток, *haite* – волосся) – тонкі штопороподібні бактерії, які мають велику кількість завитків. Серед них є хвороботворні види (*Treponema pallidum* – викликає сифіліс, *Borrelia recurrentis* – поворотний тиф, *Leptospira interrogans* – лептоспіроз).

Ниткоподібні бактерії належать до вільноіснуючих сапрофітних мікроорганізмів (напр. залізо- і сіркобактерії). Для людини вони не патогенні і в медичній мікробіології не вивчаються.

Окрім того, останнім часом виявлені мікроби, які мають трикутну, квадратну, зіркоподібну і тарілкоподібну форми. Вони беруть участь у процесах біодеградації різноманітних природних сполук.

Особливості морфології інших груп мікроорганізмів

Спірохети. Особлива група грамнегативних звивистих бактерій, що мають вигляд довгих тонких, спірально закручених ниток, дістала загальну назву спірохет. Довжина їх коливається в межах 7-50, товщина – 0,3-0,5 мкм. Вони належать до порядку *Spirochaetales*, до складу якого входять три патогенних для людини роди: *Treponema*, *Borrelia*, *Leptospira*. Між собою вони відрізняють рядом ознак.

Центральною структурою спірохет є цитоплазматичний циліндр, що має постійну спіралеподібну форму. Зовні він покритий цитоплазматичною мембраною і клітинною стінкою. Органом руху спірохет є периплазматичний джгутик (джгутики), розташований між циліндром і цитоплазматичною мембраною. Спірохети мають різні типи рухів: згинальний, поступальний, обертальний, маятникоподібний.

Число і форма дрібних завитків характерні для кожного виду спірохет. Вони формують завитки першого порядку. У трепонем є 8-14 таких завитків, однакових за формою та величиною. Лептоспіри мають 12-18 дуже дрібних первинних завитків. На їх кінцях є вторинні завитки, які надають їм S- або C- подібної форми і роблять їх схожими на гачок (рис. 10).

Патогенними представниками для людини є *Treponema pallidum*, яка викликає сифіліс, *Borrelia recurrentis* – збудник епідемічного поворотного тифу, *Leptospira interrogans*, що спричиняє лептоспіроз.

Методи виявлення спірохет у досліджуваному матеріалі можуть бути різними. При діагностиці сифілісу, бореліозу і лептоспірозу найчастіше використовують метод темного поля. На тонких предметних скельцях (1,0-1,2 мм) виготовляють з матеріалу надавлену краплю і вміщують на предметний столик. При дослідженні використовують темнопольний конденсор. Дуже важливо при цьому досягти точної центровки всіх оптичних систем мікроскопа і встановити освітлення за методом Келлера. На верхню лінзу конденсора необхідно нанести краплю кедрового масла, уникаючи бульбашок повітря. Значно рідше використовують метод забарвлення за Романовським-Гімзою. При цьому трепонеми фарбуються в рожевий колір, борелії – в синьо-фіолетовий, лептоспіри – в блідо-рожевий. При срібрітті мазків за методом Морозова спірохети при мікроскопії мають коричнево-чорний колір на жовтому фоні.

Актиноміцети. Це одноклітинні грампозитивні, прямі або трохи зігнуті, паличкоподібні бактерії, які раніше вважали грибами через здатність клітин галузитись. Вони часто утворюють ниткоподібні форми довжиною 10-50 мкм. Характерною особливістю актиноміцетів є здатність утворювати добре виражений міцелій. У одних видів він довгий і рідко розгалужується, у інших – короткий і з вітви-



Рис. 10. Патогенні спірохети:
1 – трепонеми; 2 – борелії;
3 – лептоспіри.

стістю і брунькуванням. Паличкоподібні форми схожі за будовою до звичайних бактеріальних клітин, можуть мати цитоплазматичні вклучення. Актиноміцети належать до родин *Actinomycetaceae*, *Nocardiaceae* і *Streptomycetaceae*, які охоплюють понад 400 видів. Переважна їх більшість є сапрофітами. Вони вільно живуть у ґрунті, забезпечуючи його родючість і свєрідний запах. Часто зустрічають у воді, повітрі інших об'єктах зовнішнього середовища. Багато з них є продуцентами антибіотиків (тетрациклін, стрептоміцин та ін.).

До патогенних представників відносяться *Actinomyces israelii*, *A. bovis*, *A. naeslundii*, які викликають у людей актиномікоз, а також *Nocardia asteroides*, що спричиняє нокардіоз. Окремі представники роду *Streptomyces* можуть викликати у людини міцетому ступні.

Морфологічне дослідження актиноміцетів можливе як у нативних (нефарбованих) препаратах, так і в мазках, забарвлених за Грамом. У першому випадку гній чи виділення з нориць обробляють 15% розчином КОН, потім відбирають окремі шматочки (пісчинки розміром із макові зерна), кладуть їх між двома предметними скельцями й обережно роздавлюють. Отримують два препарати-мазки, які краще мікроскопувати за допомогою фазово-контрасного чи аноптального мікроскопа. При цьому актиноміцети розташовуються у вигляді друз (своєрідних скупчень переплетених гіф, які радіально розходяться як промені сонця). Забарвленні мазки мікроскопують як звичайно.

Патогенні гриби. Гриби являють собою особливу групу одноклітинних і багатоклітинних еукаріотів (понад 100 тис. видів), які широко розповсюджені в природі. Біля 400 видів є хвороботворними і спричиняють у людини грибкові хвороби (мікози).

Клітини більшості грибів мають щільну оболонку, до внутрішнього шару якої прилягає цитоплазматична мембрана. В цитоплазмі міститься одне або декілька ядер, вакуолі, мітохондрії, мікросоми, лізосоми, рибосоми, комплекс Гольджі, різноманітні вклучення. Молоді клітини мають яйцеподібну форму, зрілі стають циліндричними а старі – булаво-, грушо- та веретенноподібними. Основу тіла гриба становлять особливі трубчасті нитки – гіфи, сукупність яких називають міцелієм. У гіфів нижчих грибів починають появлятися перегородки, які є характерною ознакою у вищих грибів. Кінцеві розгалуження міцелію мають своєрідну форму, за

якою можна диференціювати окремі види. Це органи плодоносіння грибів, які мають ендоспори. Прикладом утворення ендоспор може бути мукова пліснява *Mucor mucedo*, яка має несептований міцелій, одноклітинний плодоносящий гіф спорангієносець, на кінці якого знаходиться круглий спорангій, наповнений ендоспорами (рис. 11, 3). Ектоспори можна

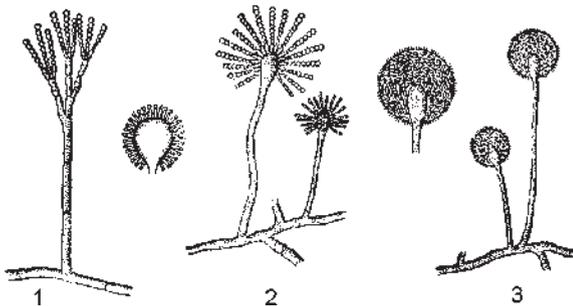


Рис. 11. Нитчасті гриби:

1 – *Penicillium*; 2 – *Acervillus*; 3 – *Mucor*.

спостерігати у лійкової плісняви *Aspergillus niger*, від плодоносячого гіфа якого – конідієносець – немов би відшнуровуються спори (конідії), що розташовуються радіально і нагадують струмені води, які розбризкуються із садової лійки (рис. 11, 2). У китиценосного гриба *Penicillium glaucum* міцелій і конідієносець багатоклітинний, плодоносне тіло нагадує пензлик (рис. 11, 1).

Гіфи міцелію дерматофітів можуть нагадувати роги оленів, канделябри, булаву, гребінь півня тощо. Будова органів плодоносіння, характер плодових тіл, їх форма, велечина й морфологічні особливості покладені в основу класифікації грибів.

Виділяють нижчі та вищі гриби. До нижчих належать хітридіоміцети, ооміцети, зигоміцети; до вищих – аскоміцети, базидіоміцети та дейтеромицети. Нижчі гриби, як правило, непатогенні для людини. Однак окремі види мукової, аспергілової та пеніцилової плісняви можуть уражати шкіру, очі, слухові проходи, легені, шлунково-кишковий тракт.

Велике значення в медичній практиці мають гриби роду *Candida*. вони часто є представниками нормальної мікрофлори людини. Але при нераціональному застосуванні антибіотиків, імунодефіцитах та авітамінозах здатні викликати серйозні захворювання – кандидомікози. Ще більшого значення в грибковій патології людини набула група недосконалих грибів-дейтеромицетів. Вони можуть викликати епідермофітію, мікроспорию, трихофітію, фавус та ін.

Однак гриби мають і велике корисне значення. Їх використовують у харчовій, парфюмерній, хімічній промисловості. Із окремих видів таких родів як *Penicillium* і *Cephalosporium* виготовляють антибіотики (пеніциліни, цефалоспорини).

Мікроскопічне дослідження грибів проводять як у нативному (незабарвленому) стані, так і за допомогою різних методів фарбування. Частинку подрібненого досліджуваного матеріалу наносять на предметне скло, додають одну краплю 30 % розчину КОН, злегка підігрівають над полум'ям пальника до появи білого обідка по периферії краплі. Після цього препарат накривають покривним скельцем і мікроскопують за допомогою сухих об'єктивів при опущеному конденсорі і звуженій діафрагмі. Ще краще досліджувати нативні препарати під фазово-контрастним або аноптральним мікроскопом.

При дослідженні грибів у забарвленому стані після дії розчину лугу мазок промивають водою, висушують, фіксують і забарвлюють метиленовим синім або фуксином.

Рикетсії. До групи рикетсій належать унікальні мікроорганізми, в яких поєднані морфологічні властивості бактерій і біологічні властивості вірусів. З першими їх єднає типова будова клітин, а з вірусами – облігатний внутрішньоклітинний паразитизм.

Рикетсії мають типову для грамнегативних бактерій клітинну стінку, цитоплазматичну мембрану, ядерний апарат, не обмежений від цитоплазми будь-якою оболонкою. Вони не утворюють спор і капсул. За Здродовським розрізняють 4 морфологічних типи рикетсій (рис. 12):

1 – дрібні овоїдні кокоподібні клітини розміром біля 0,5 мкм, часто утворюють диплоформи у вигляді гантель;

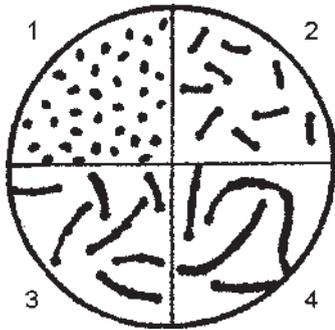


Рис. 12. Основні форми рикетсій: 1 – кокоподібні;

2 – паличкоподібні;

3 – бацилярні; 4 – ниткоподібні.

2 – паличкоподібні двозернисті форми (1-1,5 мкм), у яких зерна розташовані на полюсах і з'єднані слабо забарвленою цитоплазмою;

3 – бацилярні видовжені або зігнуті двозернисті форми (3-4 мкм), інколи мають по 4 зерна, також розташованих на полюсах клітини;

4 – ниткоподібні багатозернисті клітини (20-40 мкм), у яких може бути багато зерен.

Відповідно до класифікації Бергі всі рикетсії об'єднані в порядок *Rickettsiales*. Більшість із них непатогенні для людини. Вони паразитують в організмі членистоногих. Хвороботворні представники входять до трьох родів: *Rickettsia*, *Rochalima*, *Coxiella*. Окремі види з них можуть викликати у

людини такі рикетсіози як висипний тиф, марсельська лихоманка, лихоманка Цуцугамуші, Ку-гарячка та ін. Збудниками цих захворювань відповідно є *Rickettsia prowazekii*, *R. typhi*, *R. tsutsugamushi*, *Coxiella burnetii*. Велику роль у передачі та розповсюдженні рикетсіозів відіграють різні кровососні комахи (воші, блохи, кліщі).

Морфологію рикетсій вивчають під світловим мікроскопом у препаратах забарвлених за Романовським-Гімзою, де вони набувають рожево-червоного кольору. Дуже зручний і простий спосіб їх забарвлення за Здродовським: тонкий зафіксований мазок фарбують розведеним карболовим фуксином (10-15 крапель на 10 мл дистильованої води) протягом 5 хв, потім злегка знебарвлюють препарат 0,01% соляною кислотою і додатково 30 сек фарбують метиленовим синім. Рикетсії стають рубіново-червоними, цитоплазма клітин макроорганізму голубою, а ядра – синіми.

Хламідії. До патогенних бактерій роду *Chlamidia* віднесені грамнегативні нерухомі мікроорганізми, що не утворюють спор і капсул. Вони є облигатними внутрішньоклітинними паразитами, не ростуть на штучних середовищах. Протягом свого життєвого циклу хламідії проходять три стадії:

1) дрібні елементарні тільця розміром 0,2-0,5 мкм, які мають компактний нуклеоїд і тришарову ригідну оболонку;

2) крупні ретикулярні тільця (0,8-1,5 мкм) сферичної форми з фібрилярним нуклеоїдом і тонкою клітинною стінкою;

3) проміжні тільця, що являють собою перехідні морфологічні форми між елементарними і ретикулярними тільцями.

Елементарні тільця є інфекційною, а ретикулярні – вегетативною формою цих бактерій.

Окремі види хламідій (*Chlamidia trachomatis*, *C. psittaci*) викликають у людини трахому, орнітоз, паховий лімфогрануломатоз, уретрити, кон'юнктивіти, поліартрити, менінгоенцефаліти та інші захворювання.

Для мікроскопічного дослідження хламідій в інфікованих клітинах і тканинах організму виготовлені мазки забарвлюють за методом Романовського-Гімзи. Тільця

хламідій фарбуються в голубий або фіолетовий колір. Їх можна виявити і в нативних препаратах (надавлена крапля) за допомогою фазово-контрастної мікроскопії.

Мікоплазми. Патогенні мікоплазми представляють собою групу унікальних дрібних поліморфних мікроорганізмів, які не мають ригідної клітинної стінки. Вони виглядають як сферичні або овоїдні тільця діаметром 0,1-0,2 мкм, або як кулясті форми розміром до 1,5 мкм. Рідше зустрічаються нитковидні клітини довжиною до 100-150 мкм, які здатні галузитись.

Клітини мікоплазм не мають типової для бактерій оболонки. Вони оточені лише тришаровою цитоплазматичною мембраною. У деяких із них зовнішній шар мембрани значно товстіший і нагадує капсулу. У цитоплазмі містяться нуклеоїд, рибосоми, кільцеподібні мембрани, які зв'язані з ядерним апаратом. Спор і джгутиків не утворюють, грамнегативні.

Мікоплазми часто знаходяться в ґрунті, стічних водах, паразитують в організмі багатьох видів тварин. У людини вони спричинюють пневмонії, бронхіоліти, ангіни, уретрити, простатити, артрити, ендокардити тощо. Найчастіше захворювання викликають *Mycoplasma pneumoniae*, *M. hominis*, *Ureaplasma urealyticum*.

Морфологію мікоплазм досліджують у живому стані в препаратах надавленої краплі під фазово-контрастним мікроскопом або за допомогою електронної мікроскопії ультратонких зрізів їх клітин. При вивченні мікоплазм у забарвлених мазках краще користуватись методом Романовського-Гімзи.

Патогенні найпростіші. Протисти, або найпростіші, – це високоорганізовані одноклітинні еукаріотичні організми тваринного походження. Вони належать до типу *Protozoa* і, відповідно, класів саркодових, джгутикових, споровиків та інфузорій.

Будова їх складніша за бактерійну клітину. Їх розміри коливаються від 2 до 150 мкм. Вони мають чітко уособлене ядро або декілька ядер з типовою двоконтурною оболонкою (каріолемою), пронизаною порами. В цитоплазмі багатьох найпростіших розрізняють дві частини – більш щільну гомогенну ектоплазму і більш рідку внутрішню ендоплазму. Досить часто самий поверхневий шар ектоплазми становиться ще більш ущільненим і утворює периферійну плівку, або пелікулу, яка являє собою особливий вид міцної еластичної мембрани, що надає клітині постійної форми і виконує захисну функцію. Окрім того у деяких видів є парні фібрили і мінеральний скелет.

Цитоплазма найпростіших містить велику кількість життєво важливих структур: ендоплазматичний ретикулум, мітохондрії, пластинчастий комплекс (апарат Гольджі), лізосоми, рибосоми, різноманітні вакуолі.

Багато видів найпростіших здатні активно рухатись. У одних форм рух здійснюється за рахунок псевдоподій (амеби), у інших за допомогою джгутиків або війок.

Найпростіші мають складні цикли розвитку. Вони здатні розмножуватись простим (безстатевим) і множинним поділом або їх поєднанням (плазмодії малярії).

При несприятливих умовах деякі види (амеби, лямблії, балантидії) перестають жити, втрачають органелли, покриваються товстою оболонкою і перетворюються в цисти, що є своєрідною захисною реакцією. Саме цисти відіграють велику роль у розповсюдженні протозойних захворювань.

Найпростіші широко розповсюдженні в природі. Більшість з них не патогенні для людини. Однак деякі представники мають високі інфекційні властивості і можуть викликати амебіаз, трипаносомоз, лейшманіоз, уrogenітальний та кишковий трихомоноз, малярію, балантідіаз. Всі ці захворювання характеризуються тривалим і важким перебігом, ураженням численних органів і систем.

Мікроскопічне дослідження найпростіших направлено на виявлення їх у нативних і забарвлених препаратах-мазках. Найчастіше для фарбування останніх використовують методи Романовського – Гімзи, Лейшмана, Гейденгайна. В крові паразитів виявляють шляхом виготовлення й забарвлення товстої краплі і тонких мазків (плазмодії малярії, трипаносоми, рідше – лейшманії). У фекаліях, дуоденальному вмісті, мазках із статевих органів виявляють амеби, балантідії, лямблії, трихомонади. Детальніше методи виявлення найпростіших та лабораторна діагностика протозойних захворювань викладені у 18 розділі.

Складні методи забарвлення бактерій

Складні (диференціюючі) методи забарвлення базуються на фізико-хімічних особливостях будови мікробних клітин. Суть їх полягає у фарбуванні мазка двома барвниками, один з яких є основним, другий – доповнюючим (контрастним). Після дії першого барвника мазок знебарвлюють кислотою, лугом, спиртом або ацетоном. Деякі мікроорганізми легко, інші важко знебарвлюються. Одні з них є кислотостійкими, другі тільки кислотостійкими. Спори бактерій дуже важко піддаються дії знебарвлюючих речовин, вони водночас є і фарбостійкими об'єктами.

Складні методи забарвлення вживають для детального вивчення структури бактерійних клітин, а також для характеристики і диференціації одних мікроорганізмів від інших. Отже, вони мають важливе діагностичне значення. У лабораторній практиці найчастіше використовують складні методи Грама, Ціля-Нільсена, Нейссера, Буррі-Гінса та ін.

Забарвлення за Грамом

Цей метод розробив Кристіан Грам у 1884 р. Серед складних методів фарбування він є найбільш універсальним. Він має важливе диференціально-діагностичне значення, оскільки допомагає визначати таксономічне положення тих чи інших бактерій.

Особливості забарвлення за методом Грама дозволяють поділити всі мікроорганізми на дві групи: грампозитивні та грамнегативні, хоча в практиці трапляються випадки, коли одні й ті ж бактерії характеризують як грамваріабельні.

Принцип методу полягає в тому, що клітини грампозитивних мікробів здатні утворювати міцну сполуку з генціанвіолетом та йодом, яка не вимивається з бактерій спиртом, отже, вони забарвлюються в темно-фіолетовий колір. У грамнегативних бактерій цей комплекс вимивається спиртом, тому вони потім забарвлюються фуксином у червоний колір.

До грампозитивних відносяться стафілококи, стрептококи, бацили, клостридії, дифтерійні та туберкульозні палички. Грамнегативними є нейсерії (менінго- і го-

нококи), кишкові палички, сальмонели, шигели, рикетсії, всі звивисті бактерії (вібріони, спірили, спірохети, лептоспіри).

Механізм забарвлення за Грамом досить складний і ще остаточно не вивчений. Грампозитивні бактерії мають товсту клітинну стінку, яка складається з 5-6 шарів пептидоглікану (муреїну) та полімерів тейхоевих кислот. Ці структури легко сприймають і міцно утримують фарбуючий комплекс генціанвіолет + йод і при дії спирту протягом 30-60 с не знебарвлюються. Грамнегативні бактерії мають значно тоншу оболонку, що складається з 1-2 шарів пептидоглікану, не містить тейхоевих кислот, а, отже, не втримують комплекс основного барвника при знебарвленні спиртом. При додатковій обробці мазка фуксином Пфейфера вони фарбуються в червоний колір. Саме в цьому полягає основний механізм забарвлення за методом Грама. Окрім того, різне забарвлення мікроорганізмів пов'язане з більш високою концентрацією комплексу протеїн-рибонуклеїнату магнію в клітинах грампозитивних бактерій, більш кислим значенням рН і різним співвідношенням РНК:ДНК у цитоплазмі (у грампозитивних 8:1, а грамнегативних 1:1).

Виготовлення реактивів для забарвлення за Грамом. Найчастіше в лабораторії готують такі барвники: 1) феноловий генціанвіолет, 2) розчин Люголя, 3) фуксин Пфейфера, 4) етанол 96°.

1. Феноловий генціанвіолет

Генціан фіолетовий	1 г
Фенол кристалічний	2 г
Етанол 96°	10 мл
Вода дистильована	100 мл

Феноловий генціанвіолет готують так само, як і феноловий фуксин Циля. Генціан фіолетовий можна замінити кристалвіолетом, або водним розчином метилвіолету, який є досить стійким. Його готують за таким прописом:

метилловий фіолетовий	0,2 г
вода дистильована	100 мл

2. Розчин Люголя

Йодид калію	2 г
Йод кристалічний	1 г
Вода дистильована	300 мл

Спочатку йодид калію розчиняють у невеликій кількості води, потім всипають кристалічний йод, після розчинення якого добавляють дистильовану воду до 300 мл.

3. Фуксин Пфейфера готують із концентрованого фенолового розчину цього барвника, розводячи його в 10 разів дистильованою водою. Необхідно використовувати лише свіжовиготовлений барвник.

Техніка забарвлення. Найбільш поширений, так званий стандартний спосіб забарвлення за Грамом, проходить у декілька етапів:

1. На фіксований жаром мазок кладуть трохи коротшчу і вужчу від предметного скла смужку фільтрувального паперу. Зверху на неї наносять достатню кількість

розчину генціанвіолету (основний барвник) на 1-2 хв, зливають його і знімають папірець.

2. Після прополоскування мазка водою наносять розчин Люголя на 1-2 хв (до сильного потемніння препарату).

3. Зливають розчин Люголя і, не промиваючи мазок, знебарвлюють його 96° етанолом протягом 30-60 с (до відходження сіро-фіолетових струмочків фарби).

4. Препарат ретельно промивають водою і додатково забарвлюють фуксином Пфейфера (доповнюючий контрастний барвник) протягом 2 хв.

5. Мазок промивають водою, висушують, наносять краплю кедрової олії, мікроскопують з імерсійним об'єктивом.

Мікроскопічна картина: при правильному забарвленні грампозитивні мікроорганізми фарбуються в темно-фіолетовий колір, грамнегативні бактерії, тканини, клітини органів – у рожевий (див. вкл., рис. 1).

Запропоновано ряд модифікацій цього методу, з яких найпоширенішим є варіант Синьова. Він полягає в тому, що замість розчину генціанвіолету (метилвіолету, кристалвіолету) використовують смужки фільтрувального паперу заздалегідь просочені одним із вказаних барвників і висушені. При забарвленні за Синьовим на мазок наносять декілька крапель води, опускають і притискають пінцетом до скла просочену фарбою смужку паперу. Через 2 хв її знімають. Наступні етапи забарвлення такі самі, як і при стандартному методі Грама. Модифікація Синьова особливо зручна для використання на практичних заняттях та в похідних лабораторіях. Вона дає значну економію барвника.

Забарвлення кислотостійких бактерій. Кислотостійкі мікроорганізми (збудники туберкульозу, прокази, актиноміцети та ін.) містять велику кількість високомолекулярних ліпідів, восків і міколової кислоти. Вони важко фарбуються звичайними аніліновими барвниками. Але при забарвленні їх концентрованим феноловим фуксином Циля з підігріванням міцно утримують його і не знебарвлюються розчинами кислот, лугів і спиртів. Клітини тканин, лейкоцити, слиз, інші бактерії при такій обробці легко віддають барвник. У зв'язку з цим при додатковому забарвленні препаратів метиленою синькою всі ці елементи після знебарвлення мазків фарбуються в синій колір, а кислотостійкі бактерії залишаються червоними.

Метод Циля-Нільсена. Остаточний варіант методу автори запропонували в 1884 р. Техніка забарвлення включає декілька етапів:

1. На фіксований у полум'ї мазок із харкотиння хворого кладуть смужку фільтрувального паперу, наливають на нього фуксин Циля і забарвлюють, тричі підігріваючи до появи парів (але не доводячи до кипіння), після чого препарат із фарбою залишають ще на 1-2 хв для охолодження; зливають барвник, знімають папірець, промивають водою.

2. Препарат знебарвлюють 5 % сірчаною або соляною кислотою до появи жовтуватого відтінку (10-30 с) і декілька разів промивають водою.

3. Додатково забарвлюють мазок метиленою синькою Леффлера, промивають водою, висушують і досліджують під мікроскопом.

Мікроскопічна картина: на загальному синьому (голубому) фоні кислотостійкі бактерії виглядають рубіново-червоними (див. вкл., рис. 2).

Щоб відрізнити палички туберкульозу від збудника прокази використовують метод Семеновича-Марциновського: спочатку мазок забарвлюють втричі розведеним фуксином Циля протягом 2 хв, промивають водою і додатково фарбують метиленовим синім 5 хв. При цьому туберкульозні палички взагалі не сприймають забарвлення, а збудник прокази набуває червоного кольору.

При забарвленні кислотостійких бактерій замість класичного методу Циля-Нільсена дуже зручно користуватися його модифікацією за Синьовим.

Фільтрувальний папір просочують концентрованим розчином фуксину Циля, висушують, нарізають на смужки розміром з предметне скло і зберігають у герметично закритій банці. На фіксований мазок наносять декілька крапель дистильованої води, накладають зафарбовану смужку паперу, тричі нагрівають до появи парів. Далі продовжують забарвлення так само, як і за оригінальним методом Циля-Нільсена.

Забарвлення за Романовським-Гімзою є одним із основних і найпоширеніших методів забарвлення мазків крові в гематології. За цим способом добре фарбуються різні структурні елементи паразитів крові – малярійних плазмодіїв, трипаносом, лейшманій. Його також часто застосовують для виявлення токсоплазм, спірохет, рикетсій, личинок нематод тощо.

Поліхромний барвник Гімзи складається з азура, еозину й метиленового синього. Краще вживати готовий його розчин фабричного виробництва. Безпосередньо перед вживанням стандартний розчин розводять дистильованою водою нейтральної або слабко лужної реакції (рН 7,0-7,2) із розрахунку 1-2 краплі барвника на 1 мл води. Препарати-мазки фіксують метанолом протягом 3-5 хв і висушують на повітрі. Приготований розчин наносять на мазок, а ще краще предметне скельце з мазком опускають у склянку з барвником. Забарвлення триває від 30 хв до двох і більше годин. Товсті краплі крові фарбують протягом 30 хв. Потім барвник зливають, препарати промивають водою і добре висушують на повітрі у вертикальному положенні. Мікроскопію проводять із використанням імерсійних об'єктивів.

Будучи в розчині синьо-фіолетовим, поліхромний барвник Романовського-Гімзи фарбує цитоплазму в голубий колір, а ядра клітин, тіла бактерій, їх капсули, слиз – у червоно-фіолетовий. У дифтерійних паличок ядерні елементи забарвлюються в темний червоно-фіолетовий колір, а волутинові зерна – у вишнево-червоний; цитоплазма має рожевий колір.

Забарвлення окремих структур мікробної клітини

З науковими й діагностичними цілями в бактеріологічних лабораторіях досліджують не тільки форму, розміри, загальні тинкторіальні властивості мікроорганізмів, а й окремі елементи важливих структур: нуклеоїд, цитоплазму, включення, клітинну стінку, цитоплазматичну мембрану, капсулу, спори, джгутики тощо.

Нуклеоїд. У прокариотів ще немає морфологічно оформленого ядра, а є лише його попередник – нуклеоїд. Він представлений однією або кількома хромосомами, що складаються з ДНК і вільно розташовані в цитоплазмі, не відмежовані від

неї будь-якою мембраною. Морфологічно дослідити цю структуру під світловим мікроскопом дуже важко.

Розроблені спеціальні мікрохімічні реакції на виявлення ДНК. Однією з них є реакція Фельгена. Після легкого гідролізу мазка розчином соляної кислоти при підігріванні від дезоксирибофосфату відщеплюються пурини й піримідини, які переходять в альдегіди. Останні реагують з безбарвною фуксинсірчистою кислотою реактиву Шиффа, при цьому нуклеоїд забарвлюється в червоно-фіолетовий, а цитоплазма в світло-рожевий колір.

Ядерну субстанцію можна виявити за методом Пікарського. Фіксований метиловим спиртом або сумішшю Никифорова мазок обробляють 1 % розчином соляної кислоти, підігріваючи його до 60 °С протягом 7 хв. Після промивання його забарвлюють барвником Гімзи 10-20 хв, промивають дистильованою водою, висушують і мікроскопують. Ядерні елементи фарбуються в темно-червоний, а цитоплазма клітин – у рожевий колір.

Ще краще можна виявити нуклеоїд і дослідити його структуру за допомогою електронної мікроскопії ультратонких зрізів бактерійних клітин.

Цитоплазма та її включення. Цитоплазма бактерій – складна колоїдна система. У молодих клітин вона гомогенна, у старих набуває зернистої або волокнистої структури. При забарвленні аніліновими барвниками цитоплазма фарбується рівномірно й монотонно.

У процесі життєдіяльності бактерій у цитоплазмі з'являються метахроматичні (волютинові) зерна, краплини нейтральних ліпідів, воску, сірки, гранульози, глікоген, пігмент та ін. Вони є для клітини запасним джерелом енергії.

У лабораторній практиці найбільше значення має виявлення волютинових зерен. Волютиновими їх назвали тому, що вперше ці включення відкриті у *Spirillum volutans*. Їх ще називають метахроматичними, оскільки вони дають явище метахромазії – здатність забарвлюватись у тон, що відрізняється від основного кольору поліхромного барвника. Наприклад, при фарбуванні метиловим синім зерна набувають пурпурово-синього кольору через надзвичайно сильну спорідненість їх з азурами, які завжди присутні в метиловому синьому барвнику. Поява пурпурового відтінку і обумовлена здатністю давати метахромазію. Ці включення називають також зернами Бабеша-Ернста за іменами авторів, які вперше описали їх. Розташовуються вони переважно на полюсах бактерій, рідше – по всій довжині клітини. Волютинові зерна є характерною диференціальною ознакою для збудника дифтерії – *Corynebacterium diphtheriae*.

Для виявлення цих включень використовують методи Леффлера, Нейссера, П'ю, Мейера, Раскіної та ін.

Метод Леффлера. Фіксований мазок забарвлюють лужним спиртово-водним розчином метиленового синього протягом 4-5 хв, висушують і мікроскопують. При цьому волютинові зерна забарвлюються в темно-синій, а цитоплазма – в блідо-голубий колір (див. вкл., рис. 3).

Метод Нейссера належить до складних методів забарвлення. Він проводиться за таким алгоритмом:

1. На фіксований препарат наносять оцтово-кислу синьку Нейссера і фарбують протягом 1 хв, зливають барвник і промивають водою.
2. Діють на мазок розчином Люголя протягом 20-30 с.
3. Не промиваючи препарат водою, наносять розчин везувіну (або хризойдину) і забарвлюють протягом 1-3 хв.
4. Забарвлений мазок промивають водою, висушують і досліджують під мікроскопом.

Мікроскопічна картина: цитоплазма бактерійних клітин фарбується в світлий жовто-коричневий відтінок, метахроматичні зерна – в темно-синій, майже чорний колір (див. вкл., рис. 4).

Виготовлення барвників для фарбування за методом Нейссера

Оцтово-кислий метиленовий синій за Нейссером

Метиленовий синій	0,1 г
Етанол 96°	2 мл
Льодяна оцтова кислота	5 мл
Дистильована вода	100 мл

Везувін	12 г
Етанол 96°	60 мл
Дистильована вода	40 мл

Хризойдин	1 г
Дистильована вода	150 мл

Барвник розчиняють у киплячій воді.

Метод П'ю. Готують спеціальний барвник: до 2 мл етанолу добавляють 0,2 г толуїдинового синього, потім 100 мл 5 % розчину оцтової кислоти. Барвник стійкий, зберігається довго. На фіксований мазок наливають приготовлений барвник і підігрівають до появи парів протягом 1-2 хв, охолоджують, промивають водою, висушують і мікроскопують. Волутинові зерна мають темно-синє забарвлення. Метахромазія особливо чітко виступає при штучному освітленні.

Метод Мейера. Окрім метахромазії, забарвлений волутин має ще й значну кислотостійкість. Саме ця властивість і лежить в основі методу. З досліджуваного матеріалу роблять два тонких мазки (подібно до мазків крові), фіксують їх на полум'ї (або в рідині Карнуа) і забарвлюють метиленовим синім протягом 10 хв. Один мазок занурюють на 5 хв у 1 % водний розчин сірчаної кислоти, другий – на такий же час у 4 % розчин калію карбонату. Обидва мазки, не промиваючи водою, висушують фільтрувальним папером. Перший препарат помічають літерою К (кислота), другий – Л (луг). Мазок К додатково забарвлюють хризойдином (або 0,25 % розчином світлого зеленого). Цитоплазма бактерій у мазку К забарвлюється у світло-коричневий (або зелений) колір, волутинові зерна – у вишнево-червоний. У мазку Л цитоплазма виглядає слабо забарвленою, а на місці метахроматичних зерен видні пустоти (знебарвлений волутин).

Метод Мейера дає найвірогіднішу можливість встановити волутинову природу включень.

Метод Раскіної. Барвник готують за таким прописом: фенолового фуксину Циля – 4 мл, льодяної оцтової кислоти – 5 мл, етанолу 96° – 95 мл, дистильованої води – до 200 мл. Його наливають на фіксований жаром препарат, підігрівають на полум'ї газового пальника до повного випаровування барвника, промивають водою, висушують і мікроскопують. Цитоплазма бактерій забарвлюється в світло-червоний колір, а зерна волютину – в чорно-синій.

Оболонка бактерій складається з цитоплазматичної мембрани, клітинної стінки й капсули.

Цитоплазматична мембрана – м'яка, пластична, тришарова поліфункціональна структура. Вона здатна утворювати інвагинати, які називаються мезосомами, і відіграють важливу роль у життєдіяльності клітини.

Клітинна стінка – своєрідний захисний шар, який визначає і зберігає постійну форму бактерій, захищає цитоплазму від дії механічних та осмотичних сил і виконує ряд інших важливих функцій, є унікальним структурним компонентом, властивим тільки бактеріям (окрім мікоплазм). Морфологічно стінка складається з двох шарів: зовнішнього – пластичного і внутрішнього – ригідного, пружного.

Зовні мікробні клітини можуть бути вкриті речовиною слизового характеру, яку називають капсулою. У бактерій розрізняють мікрокапсулу, капсулу й слизовий шар. Мікрокапсула складається з мукополісахаридних фібрил, які невидимі під світловим мікроскопом, а виявляються лише при електронній мікроскопії.

Капсула – це міцно зв'язаний з клітинною стінкою особливий слизовий шар. Одні бактерії утворюють капсули тільки в організмі людей і тварин (збудники сибірки, чуми, крупозної пневмонії), в інших – вона завжди є в усіх середовищах (клебсієли). Інколи капсула оточує разом декілька клітин (сибіркова бацила, лейконосток), тоді такі структури називають зооглеями. Окремі види мікробів виділяють слизові екзополімери у великій кількості, вони неміцно зв'язані з клітинною стінкою, утворюючи рихлий слизовий шар.

При повсякденних діагностичних лабораторних дослідженнях потреба виявляти клітинну стінку чи цитоплазматичну мембрану майже не виникає. Під світловим мікроскопом ці структури можна виявити за допомогою явищ плазмолізу або плазмоптізу. Якщо бактерій помістити в гіпертонічний розчин, виникає їх сильне зневоднення, цитоплазма клітин зморщується й відстає від клітинної стінки (плазмоліз). Під мікроскопом видно контури бактерій, тобто їх клітинні стінки. Якщо ж помістити мікроби в дистильовану воду (або гіпотонічний розчин), спостерігається протилежне явище – плазмоптіз. Вода направляється в клітину, яка згодом набрякає й лопається. При мікроскопії таких клітин спостерігають лише їх контури (чохли).

Розроблені також методи спеціального забарвлення клітинної стінки. Найбільш відомими з них є методи Пешкова, Гутштейна, Кнайзі.

Метод Пешкова. Мазок спочатку обробляють спеціальним фіксатором (60 мл 90 % етанолу, 30 мл хлороформу і 10 мл оцтової кислоти) протягом 15 хв, потім протравлюють у 10 % розчині таніну 5 хв, промивають водою і забарвлюють водним розчином основного фуксину протягом 30-60 с. Препарат висушують

на повітрі й мікроскопують. Оболонка виглядає як тонкий червоний обідок навколо бактерійної клітини.

Надійний спосіб забарвлення клітинної стінки, як варіант *методу Гутштейна*, описав Сінай. Препарат фіксують рідиною Карнуа, протравлюють 2-5 хв 10 % розчином таніну, промивають водою і розглядають в надавленій краплі 0,02 % водного розчину кристалічного фіолетового. Забарвлюються оболонки в фіолетовий колір вже через 5-10 с.

Метод Кнайзі. Зафіксований у полум'ї пальника мазок протравлюють у спеціальному розчині (насичений водний розчин калійних галунів – 70 мл, 20 % розчин таніну – 30 мл), промивають водою, наносять краплю фенолового фуксину, накривають покрівним скельцем і розглядають під мікроскопом. Клітинна стінка фарбується в червоний колір.

Забарвлення капсул. Капсули бактерій містять складні гетерополісахариди і поліпептиди, мають гелеподібну консистенцію. При звичайних методах фарбування вони погано сприймають барвники. Лише у препаратах-відбитках з уражених тканин і органів, мазках із гною, харкотиння вони виявляються при будь-якому методі фарбування у вигляді незабарвлених зон (ореолів) між забарвленими тілами бактерій і субстратом (рис. 13). Для фарбування самих капсул запропоновані різні методи.

Спосіб Ребігера. Нефіксований мазок забарвлюють насиченим розчином генціанового фіолетового у 40% формаліні протягом 15-20 с, швидко промивають водою і висушують. Капсули фарбуються у червоний, а бактерії – в темно-фіолетовий колір.

Метод Гінса. З досліджуваного матеріалу роблять негативний препарат за способом Буррі. Мазок фіксують сумішшю Никифорова, або метанолом, промивають водою і забарвлюють 3-5 хв за Гінсом феноловим фуксином Циля, розведеним 1:3. Промивають водою, висушують, мікроскопують під імерсійним об'єктивом. На темному димчасто-сірому фоні контрастно виділяються незабарвлені капсули, всередині яких знаходяться яскраво-червоні тіла бактерій (див. вкл., рис. 5).

Метод Гісса. Тонкий мазок фіксують у спирт-формолі або суміші Никифорова (але не жаром), фарбують розчином основного фуксину (1 ч насиченого спиртового розчину барвника + 19 ч дистильованої води) з підігріванням до появи парів, потім залишають на 30 с для охолодження. Препарат промивають великою кількістю розчину мідного купоросу, висушують, не промиваючи водою, і мікроскопують. Капсули забарвлюються в голубий колір, тіла мікробів – у темно-червоний.

Метод Романовського-Гімзи. На мазок, фіксований метанолом або сумішшю Никифорова, наносять розведений барвник Гімзи (2 краплі на 1 мл дистильованої води), фарбують 20-30 хв, швидко змивають водою, висушують і мікроскопують. Бактерії забарвлюються в синій колір, капсули – у блідо-рожевий. Метод постійно дає хороші результати. Інші способи забарвлення капсул менш демонстративні.

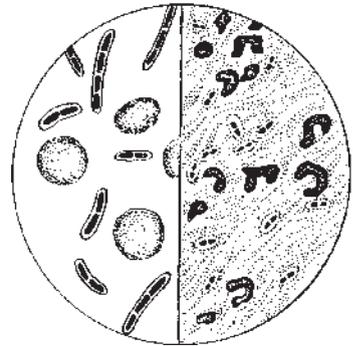


Рис. 13. Капсули бактерій.

Забарвлення спор. Деякі бактерії при несприятливих умовах здатні утворювати ендоспори. При дослідженні незабарвлених мазків із старих агарових культур спори виявляються у вигляді круглих, або овальних утворень, які сильно заломлюють світло, і виглядають пустотами. Вони погано забарвлюються аніліновими барвниками при звичайних методах фарбування.

Розміри спор можуть не перебільшувати діаметр мікробної клітини (*Bacillus*) або бути більшими за нього (*Clostridium*). Спори в клітині можуть розміщуватись центрально (збудник сибірки), субтермінально (палички ботулізму, газової гангренни) або термінально (палички правця).

Для виявлення спор розроблені спеціальні методи їх забарвлення. Всі вони основані на дії протрав, які розрихлюють міцні оболонки спор і полегшують проникнення барвників.

Метод Ожешки. На приготовлений густий незафіксований мазок споронної культури бактерій наливають 0,5 % розчин соляної кислоти й підігрівають 3-4 рази до появи парів (протрава). Препарат промивають водою, висушують фільтрувальним папером і фіксують у полум'ї пальника. Потім мазок забарвлюють за методом Циля-Нільсена, промивають водою, висушують і мікроскопують. Тіла бактерій фарбуються в голубий колір, спори – в червоний (див. вкл., рис. 6).

Метод Пешикова – простий і надійний спосіб забарвлення спор, який не вимагає хімічних протрав і диференціювання в кислоті чи спирті. Його проводять за таким алгоритмом:

1. Виготовляють мазок, висушують і фіксують у полум'ї газового ріжка, або в спиртовому формаліні.

2. На препарат наливають лужний метиленовий синій і доводять його до кипіння, періодично вносячи в полум'я на 15-30 с.

3. Барвник змивають водою і додатково фарбують 0,5 % водним розчином нейтрального червоного впродовж 30-40 с. Промивають дистильованою водою, висушують, розглядають за допомогою масляної імерсії. Спори виглядають синіми, або голубими, цитоплазма – рожевою.

Метод Мюллера. На зафіксований в полум'ї мазок наливають 5 % водний розчин хромової кислоти на 2-3 хв, промивають водою, висушують і забарвлюють за методом Циля-Нільсена, мікроскопують. Спори набувають червоного кольору, а цитоплазма бактерій – синього.

Метод Шеффера-Фултона. Густий мазок фіксують у полум'ї, наливають 5 % водний розчин малахітового зеленого, 3-4 рази нагрівають до появи парів, промивають струменем проточної води 30-40 с і додатково забарвлюють 0,5 % водним розчином сафраніну, промивають водою і мікроскопують. Тіла бактерій забарвлюються в червоний, а спори – в зелений колір.

Забарвлення джгутиків. У деяких видів плаваючих бактерій є спеціальні органи руху – джгутики, розміри яких досягають 0,02-0,04 мкм у ширину і 6-80 мкм у довжину. Вони містять особливий скоротливий білок флагелін. За кількістю і розташуванням джгутиків рухливі бактерії поділяють на 4 групи:

1. Монотрихи – один полярно розташований джгутик (холерний вібріон);

2. Лофотрихи – пучок джгутиків на одному кінці (псевдомонади);
3. Амфитрихи – поодинокі або пучки джгутиків на обох кінцях бактерій (спірили);
4. Перитрихи – багато джгутиків, розташованих навколо клітини (збудник черевного тифу, кишкова паличка).

Число, спосіб розміщення і розміри джгутиків є постійними ознаками для певного виду бактерій, що враховують при проведенні їх систематики.

Виявити джгутики можна за допомогою прямих та непрямих методів. При прямих методах джгутики забарвлюють барвниками або солями металів. Обов'язково вживають протрави, які сприяють осіданню на джгутиках препаратів срібла або заліза, що призводить до штучного збільшення їх діаметра. Вони стають видимими під світловим мікроскопом. До прямих методів виявлення джгутиків відносяться і дослідження їх під електронним мікроскопом на ультратонких зрізах.

При непрямих методах спостерігають за рухом бактерій у висячій або надавленій краплі за допомогою світлової, темнопольної, фазово-контрастної та аноптральної мікроскопії.

Забарвлення джгутиків – одна з найтонших, складних і вимогливих бактеріоскопічних методик. Запропоновано багато складних методів їх фарбування: Леффлера, Грея, Морозова, Уварова, Бенін'єтті та ін. Найнадійнішим із них є метод Леффлера.

Метод Леффлера. Важливою умовою для успішного забарвлення є виготовлення мазків із молоді (12-18 год) агарової культури на ідеально чистих і знежирених скельцях. Бактеріологічною петлею беруть невелику кількість культури і вносять її в 5-6 мл водопровідної води, не емульгуючи, а залишаючи петлю до тих пір, поки бактерії самі розійдуться в рідині. Пастерівською піпеткою з тонко відтягнутим капіляром наносять на скельце 5-6 окремих крапель суспензії бактерій у воді, висушують на повітрі. Фіксують дуже обережно, один раз швидко провівши препарат через полум'я.

Для забарвлення необхідно приготувати такі розчини:

1. Протрава: 1 мл насиченого спиртового розчину основного фуксину, 10 мл 20 % водного розчину таніну, 5,5 мл насиченого на холоді водного розчину сірчанокислого закисного аміачного заліза. Розчин готують за 1-2 доби до вживання, перед використанням обов'язково фільтрують.

2. Концентрований феноловий фуксин Циля, наполовину розведений водою і профільтрований.

На фіксований препарат наносять надлишок протрави й залишають її протягом 10-15 хв, промивають дистильованою водою до повного видалення протрави. Фарбують профільтрованим фуксином Циля протягом 3-5 хв, промивають водою, висушують і мікроскопують. Тіла бактерій забарвлюються в темний червоно-коричневий колір, джгутики виглядають світлішими, такого ж відтінку.

Метод Бенін'єтті. Суспензію бактерій і мазок роблять так само, як і за методом Леффлера. Протраву і забарвлення проводять одним фарбуючим розчином, який завжди готують *ex tempore*: розчин 1 – сірчанокислого цинку 1 г, таніну 10 г, дистильованої води 100 мл; розчин 2 – насичений спиртовий розчин генціана фіолетового.

Змішують 5 мл першого і 3 мл другого розчинів. Суміш наносять на препарат-мазок, тричі нагрівають до появи парів, охолоджують, добре промивають водою. Висушують і мікроскопують. Тіла бактерій фарбуються в темно-фіолетовий колір, джгутики мають більш ніжне забарвлення.

Мікроскопічне дослідження живих мікробів

Для прижиттєвого вивчення мікроорганізмів використовують методи надавленої й висячої краплі та спеціальні камери для тривалого спостереження за їх ростом, розмноженням, дією різних хіміотерапевтичних препаратів тощо. Перевагою цих методів є можливість досліджувати бактерії в неушкодженому вигляді, тоді як обробка мазків при їх висушуванні, фіксації та забарвленні часто супроводжується зміною мікробних клітин. Значно легше, простіше і швидше можна виявити рухливість, що свідчить про наявність джгутиків. Цим широко користуються в практичних лабораторіях при диференціально-діагностичному визначенні видів збудників.

Однак, ці методи мають і ряд недоліків. У живих бактерій, що активно рухаються, важко виявляти деталі структури. При такому дослідженні можна мати лише загальне уявлення про їх морфологію. Разом з тим, дослідження у живому стані крупніших мікроорганізмів (гриби, найпростіші) дає змогу вивчати тонку структуру їх клітин краще, ніж у забарвлених препаратах. Ця перевага стає особливо виразною при дослідженні живих незабарвлених мікробів за допомогою фазово-контрастної та аноптальної мікроскопії.

Необхідно завжди пам'ятати, що робота з живими збудниками більш небезпечна, вимагає виняткової обережності і навичку. Після мікроскопії потрібно обов'язково занурювати препарати в дезінфікуючий розчин.

Надавлена крапля. На середину предметного скла бактеріологічною петлею або піпеткою наносять краплю молододі (12-18 год) теплої бульйонної культури або іншого досліджуваного матеріалу. При густому рості культури її розбавляють фізіологічним розчином, оскільки наявність великої кількості мікробних тіл у полі зору утруднює спостереження за окремими бактеріями та їх рухливістю. Нанесену краплю накривають покрівним скельцем, обережно накладаючи його пінцетом, щоб у надавленій краплі не з'являлись бульбашки повітря. Для цього покрівне скельце краще не накладати зверху, а ставити його ребро біля краю краплі і повільно опускати, витісняючи повітря між предметним і покрівним скельцями. Вдало зроблена крапля заповнює весь простір між ними, але при цьому рідина не виступає за краї покрівного скельця. Якщо вона виступає, зайву її частину відсмоктують шматочком фільтрувального паперу, утримуючи його пінцетом, після чого папір занурюють у дезінфікуючий розчин. Недоліком надавленої краплі є її швидке висихання. При необхідності довго розглядати препарат, краї покрівного скла заздалегідь змащують вазеліном.

Висяча крапля – метод мікроскопічного дослідження живих мікроорганізмів, розроблений Р. Кохом в 1876 р. За його допомогою можна спостерігати розмно-

ження бактерій, характер їх рухливості, проростання спор у вегетативні форми, явище хемотаксису, дію фізичних і хімічних факторів, імунних сироваток тощо. Його також широко використовують для вивчення морфології грибів, найпростіших і спірохет. Як і в методі надавленої краплі, досліджують молоді культури, вирощені в рідкому або на щільному середовищі.

Для виготовлення висячої краплі необхідні спеціальні предметні скельця, в центрі яких є напівсферичне заглиблення (лунка). Невелику краплю негустої суспензії бактерій петлею або піпеткою наносять на середину чистого, але не знежиреного покрівного скельця. Предметне скло з лункою, краї якої попередньо змащують вазеліном, обережно накладають на покрівне скельце, слідкуючи, щоб крапля культури знаходилась в центрі заглибини, і швидко перевертають його. Крапля повинна звисати в лунці, але не торкатись її дна. Звідси походить назва препарату висяча крапля. Змащування країв лунки вазеліном створює своєрідну герметичну вологу камеру. Така крапля не висихає і придатна для спостереження протягом довгого часу (рис. 14).

Мікроскопічне дослідження живих об'єктів як в надавленій, так і висячій краплях проводиться за допомогою сильних сухих або імерсійних систем при опущеному конденсорі, звуженій діафрагмі та освітленні плоским дзеркалом. Спочатку при малому збільшенні ($\times 8$) знаходять край краплі, чітко видимий як лінія в дещо затемненому полі зору. По один бік цього краю є багато дрібнесеньких краплинок конденсату, які осіли на внутрішній поверхні покрівного скельця. По другий бік лінії видно рівномірний сіруватий фон. Це й є крапля. Знайдений край краплі переміщують у центр поля зору мікроскопа й переходять на сильніший сухий ($\times 40$), а при потребі й на імерсійний об'єктив ($\times 90$). Трохи відкривають діафрагму конденсора й починають спостерігати характер руху. Рухливі бактерії проходять з однаковою швидкістю значну віддаль, часом через усе поле зору, роблячи кругові та гвинтові рухи. Найбільш швидкі й прямолінійні рухи роблять монотрихи й лофотрихи. Перитрихам і амфітрихам властива менш енергійна й безладна рухливість. Мікроскопіст-початківець може помилково прийняти молекулярний (броунівський) рух за справжній. При цьому нерухливі бактерії постійно коливаються між двома близькими точками, ніби "танцюють" на місці.

Одним із суттєвих недоліків методу висячої краплі є слабка чіткість контурів мікробів через кривизну лунки. Для усунення цього недоліку можна користуватись камерою Беттхера. Її легко виготовити в будь-якій лабораторії. До звичайного предметного скла за допомогою воску, парафіну або відповідного клею прикріплюють скляне або пластмасове кільце з діаметром отвору біля 10 мм і висотою 6-7 мм. Верхній край приклеєного кільця змащують вазеліном і на нього накладають покрівне скельце з живими бактерія-

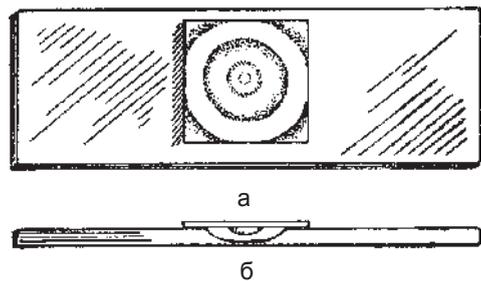


Рис. 14. Висяча крапля:
а – вид зверху; б – вид збоку.

ми в краплі, що звисає донизу в цій вологій камері. За допомогою такої камери можна навіть проводити цейтраферну кінозйомку живих об'єктів.

Для збільшення контрастності досліджуваних об'єктів в надавленій чи висячій краплях можна застосувати прижиттєве (вітальне) забарвлення. Для цього використовують малотоксичні й майже нешкідливі барвники: метиленовий і толудіновий синій, конго і нейтральний червоний, акридиновий оранжевий, янус зелений та ін. Суспензію мікробів вносять у краплю 0,001 % водного розчину барвника, готують надавлену або висячу краплю і мікроскопують.

Можна проводити прижиттєве забарвлення бактерій і флуорохромами. Тоді дослідження проводять за допомогою люмінесцентної мікроскопії.

Ще кращі можливості для довготривалого вивчення живих мікроорганізмів створюються у спеціально сконструйованих камерах. Найбільш відомі з них запропонували Пешков і Фонбрюн.

Ш-подібна камера Пешкова. На предметне скло наливають шар розтопленого агару товщиною 0,2 мм. Після застигання стерильним скальпелем вирізають дві канавки і отримують Ш-подібний шар середовища. Посів мікробів проводять методом стікаючої краплі лише на середню смужку агару і негайно закривають стерильним покрівним скельцем. Середовище, що виступає за межі покрівного скла, обрізають і розтопленим парафіном герметично закривають краї препарату. Смужка агару, що межує з боків із повітрям канавок, гарантує нормальний розвиток аеробних і факультативно анаеробних мікробів.

Масляна камера Фонбрюна. На предметному склі товщиною 0,5 мм за допомогою густого спиртового розчину Шеллака приклеюють дві вузькі скляні смужки такої ж товщини на відстані 10 мм одна від одної. Покрівне скельце з тонким шаром засіяного мікробами агару накладають на скляні бортики попередньо змазані сумішшю воску й каніфолі. Гумовою грушею продувають камеру, щоб випарувати конденсаційну вологу, і пастерівською піпеткою негайно заливають її вазеліновим маслом, обережно підпускаючи його під покрівне скельце. Масло заливають доти, поки весь шар агару знизу буде ним покритий. Краплю масла не слід доводити до країв камери, необхідно завжди залишати невеличкий зазор.

За допомогою камер Пешкова й Фонбрюна можна вивчати найтонші зміни клітинних структур при розмноженні бактерій і проводити їх цейтраферну кінозйомку особливо при використанні фазово-контрастної й аноптральної мікроскопії.

Макроскопічне виявлення рухливості бактерій. Окрім забарвлення джгутиків, дослідження за допомогою надавленої та висячої крапель, рухливість мікроорганізмів можна досить просто встановити й неозброєним оком. Для цього досліджувану культуру сіють уколком у стовпчик напіврідкого живильного середовища. Посів інкубують у термостаті протягом 18-20 год. Якщо бактерії не мають джгутиків, їх ріст (інтенсивне помутніння) буде тільки впродовж лінії уколу. Рухливі бактерії дадуть дифузний ріст по всій товщині живильного середовища.

Розділ 4

ФІЗІОЛОГІЯ БАКТЕРІЙ

Фізіологія мікроорганізмів як окремий розділ мікробіології вивчає біохімічні й енергетичні процеси, що відбуваються в бактеріальній клітині й забезпечують відтворення її структурного матеріалу та енергетичні потреби. Адже бактерії є складними живими організмами, в яких відбуваються різноманітні біохімічні перетворення. Вони зумовлюють ріст, розмноження, продукцію ферментів, токсинів та інших біологічно активних речовин, відповідають за регуляцію функціональної активності клітин, їх високу пластичність і здатність адаптуватись до умов зовнішнього середовища.

Культивування мікроорганізмів

Вимоги до живильних середовищ. Для вирощування бактерій у лабораторних умовах, дослідження їх різноманітних властивостей, тривалого зберігання використовують живильні середовища. Вони повинні відповідати певним стандартам, створюючи оптимальні умови для росту, розмноження й життєдіяльності мікроорганізмів.

У першу чергу, бактерії потребують азоту, вуглецю та водню для побудови власних білків. Водень і кисень для клітин постачає вода. Джерелом азоту виступають численні речовини, в основному, тваринного походження (м'ясо яловиче, риба, м'ясо-кісткова мука, казеїн), а також білкові гідролізати, пептиди, пептони. Можна використовувати й замітники м'яса – плаценту, кров'яні згустки, дріжджі. Отже, до складу середовищ повинні бути введені джерела живильних речовин і вода, а також ростові фактори (вітаміни групи В, ферменти). Універсальним джерелом їх служать екстракти з білків тваринного й рослинного походження, білкові гідролізати. Для мікробів з більш складними харчовими потребами до складу середовищ включають нативні субстрати – кров, сироватку, асцитичну рідину, яєчний жовток, шматочки печінки, нирок, мозкової тканини та ін.

Середовища повинні бути збалансованими за мікроелементним складом і містити іони заліза, міді, марганцю, цинку, кальцію, натрію, калію, мати у своєму складі неорганічні фосфати.

Допускається застосування речовин, які усувають дію інгібіторів росту і токсинування мікробів (окремі амінокислоти, твіни, активоване вугілля тощо). Важливим є стабілізація оптимуму рН середовища, його високої буферності та рівень окисно-відновного потенціалу (Eh), який для аеробних мікроорганізмів досягає понад 0,08 В, а для анаеробних бактерій коливається в межах 0,12-0,60 В.

Середовища повинні мати певну в'язкість, густину, мати певну вологість (до 20 % води), бути ізотонічними, прозорими й обов'язково стерильними.

Основні живильні середовища. Численні потреби мікроорганізмів зумовлюють велике розмаїття живильних середовищ, а для окремих видів бактерій існують спеціальні середовища. Частина їх готують у лабораторіях безпосередньо

перед посівом, але з кожним роком з'являються все нові й нові середовища заводського виготовлення (сухі), які здатні задовольнити найвибагливіші потреби мікробіологів. Вони зберігаються тривалий час, мають стандартний склад.

Середовища поділяються на природні й штучні. Як природні використовують згорнуту сироватку, молоко, яйця, м'язову тканину. Штучні середовища створюють шляхом комбінування різноманітних субстратів, що забезпечують ті чи інші потреби мікроорганізмів. Їх використовують в основному для експериментального вивчення окремих ланок метаболізму бактерій.

Залежно від своєї густини, середовища поділяються на рідкі, напіврідкі та щільні. Напіврідкі та щільні середовища готуються з рідких, додаючи відповідно 0,3-0,7 % та 1,5-2,0 % агару. Останній представляє собою волокнистий матеріал, який добувають з морських водоростей. Складається він з полісахаридів (70-75 %), білків (2-3 %), основними складниками є високомолекулярні агароза та агаропептин. Агар розчиняється у воді при підвищеній температурі, а, застигаючи, надає середовищу драгеподібної консистенції та стійкості до ферментних систем бактерій. Саме за ці властивості він набув широкого розповсюдження у мікробіологічній практиці. Для створення щільних середовищ використовують також желатин (10-15 %), згорнуту сироватку крові.

Залежно від потреб бактеріологів живильні середовища поділяються на п'ять основних груп.

Перша група – універсальні (прості) середовища. До них належать м'ясо-пептонний бульйон (МПБ) та м'ясо-пептонний агар (МПА). За своїм складом, наявністю живильних речовин вони придатні для культивування багатьох видів бактерій.

Друга група – спеціальні середовища. Вони використовуються в тих випадках, коли мікроорганізми не ростуть на простих. До них належить кров'яний, сироватковий агар, сироватковий бульйон, асцитичний бульйон, асцит-агар та інші.

Третя група – елективні середовища, на яких мікроорганізми певного виду ростуть швидше, більш інтенсивно, опереджають у своєму розвитку інші види бактерій. Наприклад, 1 % лужна пептонна вода є елективним середовищем для холерних вібріонів, середовища Ру та Леффлера – для збудників дифтерії.

Четверта група селективні середовища, які завдяки додаванню певних компонентів (жовч, фарби, антибіотики та ін.) здатні пригнічувати розвиток одних видів мікроорганізмів, але не впливають на інші види. Так, середовище Мюллера є селективним для тифо-паратифозних бактерій, фуразолідоно-твіновий агар – для коринібактерій і мікрококів. Додавання антибіотиків до складу середовищ робить їх селективними для грибів (напр. середовище Сабуро та ін.).

П'ята група – диференціально-діагностичні середовища. Це велика група середовищ, які дозволяють визначити певні біохімічні властивості мікроорганізмів і проводити їх диференціацію. Вони поділяються на середовища для визначення протеолітичних, пептолітичних, цукролітичних, гемолітичних, ліполітичних, редуруючих властивостей (середовища Ендо, Левіна, Плоскірева, Гісса).

Все ширше застосування в мікробіологічних лабораторіях знаходять численні комерційні тест-системи для біохімічної ідентифікації мікроорганізмів, виготов-

лені на основі різноманітних диференційно-діагностичних середовищ. В одному варіанті виконання вони вносяться в спеціальні полістиролові або інші планшети та висушуються для видалення води. До них належать системи API-20 для ідентифікації стафілококів, коринебактерій, ентеробактерій, анаеробних мікробів, Enterotest 1 і 2, російська система ПБД (пластина біохімічна диференційна) для ідентифікації ентеробактерій (див.вкл., рис. 29). Непогано зарекомендували себе тест-системи Roche та інші.

Інші варіанти подібних тест-систем передбачають адсорбцію диференціюючих субстратів на паперових або полімерних носіях. Серед них розповсюджені системи Auxtab, Minitek, Morlok, Micro-ID.

Подібні системи зручні в користуванні, вони дозволяють одночасно дослідити широкий спектр мікробних ознак, завжди готові до використання в будь-яких мікробіологічних лабораторіях, вони прості й надійні, вимагають невеликих об'ємів посівного матеріалу, тому економлять лабораторний посуд, піпетки. Комп'ютерна обробка одержаних результатів дає змогу швидко визначити й оцінити вид невідомого збудника.

Виготовлення живильних середовищ. До складу будь-яких середовищ входять переважно натуральні тваринні або рослинні продукти і компоненти – м'ясо, рибна мука, яйця, молоко, кров, дріжджовий екстракт, картопля тощо. З них готують спеціальні напівфабрикати у вигляді екстрактів, настоїв, ферментативних і кислотних гідролізатів (м'ясна вода, дріжджовий екстракт, триптичний гідролізат Хоттінгера, пептон та інші), які є основою для подальшого конструювання живильних середовищ. Крім цього, в живильні середовища додають різні неорганічні солі залежно від потреб мікробної клітини. Як правило, концентрація хлориду натрію складає 5,0 г/л, KH_2PO_4 – 0,2-0,5 г/л, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, інші солі додаються із розрахунку 0,001 г/л. У необхідних випадках до складу вводять вуглеводи (цукри, багатоатомні спирти), амінокислоти в концентрації 0,5-1,0 %, а також вітаміни (до 0,001 мг/мл).

Для забезпечення необхідної густини середовища використовують агар-агар, який одержують з морських водоростей. Він є зручним і необхідним компонентом середовищ, оскільки не споживається бактеріями як ростовий субстрат. Утворюючи у воді гель, він плавиться при температурі біля 100 °С, а густіє при 40 °С. Джерелом желатину є багаті на колаген субстрати. Серед них хрящі, сухожилки, кістки тощо. Гель, який отримують внаслідок використання желатину, плавиться при температурі біля 32-34 °С і гусне при 28 °С. Проте численні мікроорганізми здатні розщеплювати желатин, тому використання останнього як наповнювача середовища вважається недоцільним. Найчастіше такі середовища з желатином застосовуються для визначення протеолітичних властивостей бактерій.

Виготовлення живильних середовищ є складним динамічним процесом, який потребує уваги бактеріолога. Цей процес складається з декількох основних етапів. Спочатку до дистильованої води згідно з прописом додають необхідні сухі компоненти середовища, ретельно перемішують, розчиняючи при нагріванні. Обов'язково встановлюють рН середовища, яке визначають або за допомогою іонометра,

або індикаторними папірцями. При цьому слід звернути увагу, що після стерилізації реакція середовища падає на 0,2. Середовища, які містять агар, фільтрують через ватно-марлевий фільтр у гарячому стані, рідкі середовища – через паперові фільтри. Якщо є необхідність, їх освітляють осадженням або за допомогою білка курячого яйця чи сироватки. Середовища розливають у спеціальні матраци, колби, флакони і закривають ватно-марлевими пробками з паперовими ковпачками. Залежно від складу середовища використовують різні режими стерилізації. Так, середовища, які містять вуглеводи, желатин стерилізують в автоклаві 15 хв при температурі 112 °С або текучою парою при температурі 100 °С дробно. Середовища без вуглеводів можна стерилізувати в автоклаві при 115-120 °С протягом 20 хв. Якщо до складу середовищ входять нестійкі до температури компоненти, такі, як нативний білок, сироватка, сечовина, то вони стерилізуються або фільтруванням через бактеріальні фільтри, або їх додають готовим у стерильне середовище. Контроль стерильності середовищ здійснюють шляхом витримування їх у термостаті протягом декількох діб при температурі 37 °С.

Наводимо приклади виготовлення деяких простих живильних середовищ, які найчастіше використовуються в мікробіологічній практиці і можуть бути основою для виготовлення більш складних.

М'ясна вода. Для її виготовлення використовують свіжу яловичину, яку попередньо очищають від жиру, фасцій, сухожилків тощо, розрізають на дрібні шматки і пропускають через м'ясорубку. Отриманий фарш заливають водопровідною водою в співвідношенні 1:2, розмішують і на добу залишають у прохолодному місці. Отриманий настій кип'ятять протягом 30-60 хв, періодично знімаючи накип, а потім відстоюють. Відділяють рідину від фаршу, фільтрують через фільтрувальний папір або полотно і доливають водопровідною водою до первинного об'єму, потім розливають у флакони і стерилізують при 1 атмосфері (температура 120 °С) протягом 30 хв. Стерильна м'ясна вода прозора, має жовтуватий колір, а на стінках флакона і на дні утворюється осад із білків, які згорнулися. Тому при подальшому використанні середовища його знову фільтрують. Активна реакція середовища – 6,2.

М'ясо-пептонний бульйон (МПБ). Щоб виготовити МПБ, до м'ясної води додають 1 % пептону і 0,5 % хлориду натрію, встановлюють необхідне рН за допомогою 20 % розчину NaOH і кип'ятять 30-40 хв, постійно перемішуючи. Бульйон фільтрують через паперовий або полотняний фільтри, розливають у флакони, пробірки, перевіряють активну реакцію середовища і стерилізують при 120 °С протягом 20 хв.

М'ясо-пептонний агар (МПА). До м'ясо-пептонного бульйону додають дрібно нарізаний агар-агар (2-2,5 %). Одержану суміш кип'ятять до розчинення агар-агару, фільтрують, встановлюють рН і розливають у флакони. Стерилізацію проводять протягом 20 хв при температурі 120 °С.

Середовища з кров'ю, сироваткою або асцитичною рідиною. Оскільки ці середовища не можуть довго зберігатись, їх готують безпосередньо перед застосуванням. Для цього до розтопленого і охолодженого до 45-50 °С МПА додають

стерильно 5-10 % свіжої або дефібринованої крові барана, кролика або іншої тварини. Флакони з агаром ретельно перемішують і розливають у чашки Петрі, слідкуючи за відсутністю піни.

Ідентично готують сироватковий (5-10 % сироватки крові) або асцитичний агар (25 % асцитичної рідини).

Триптичний перевар за Хоттінгером. Бульйон із нього економічніший за інші м'ясо-пептонні середовища, оскільки дозволяє з однієї порції м'яса одержати в декілька разів більше бульйону. У цьому середовищі міститься велика кількість амінокислот, отже, підвищується його буферність, і за рахунок цього більш стабільним є значення активної реакції середовища.

Для виготовлення перевару беруть один кілограм м'яса без сухожилків і жиру, порізаний на дрібні шматки розміром до 1-2 см, занурюють у каструлю з подвійним об'ємом води, яка кипить, і кип'ятять 15-20 хв, поки м'ясо не стане сірим, що свідчить про коагуляцію білків. Його виймають з рідини і пропускають через м'ясорубку. У рідині, яка залишилась, встановлюють рН 8,0, опускають туди фарш і охолоджують до 40 °С. Потім додають 10 % (до об'єму рідини) свіжої підшлункової залози, попередньо очищеної від сполучної тканини, жиру і двічі пропускають через м'ясорубку. Замість залози використовують сухий препарат панкреатину (0,5 %). Одержану суміш ретельно збовтують і доводять рН до 7,8-8,0. Через 30 хв перевіряють рН. Якщо активна реакція середовища не змінюється в кислу сторону, це свідчить про недоброякісність ферменту. Коли рН середовища стабілізується, суміш переливають у великі бутлі, заповнюючи їх на 1/3. Додають до 3 % хлороформу, закривають посуд резиновими корками та інтенсивно збовтують для перемішування рідин. Надлишок парів хлороформу випускають. Через 1-2 год знову перевіряють рН середовища, встановлюючи його на 7,4-7,6. Отриману суміш залишають при кімнатній температурі на строк до 16 днів. Протягом перших 3-4 днів щоденно перевіряють і коригують рН середовища, а також збовтують флакони не менше, ніж 3 рази на добу. Пізніше цю процедуру можна не проводити і збовтувати середовище слід не так часто. За 1-2 дні до закінчення циклу перетравлювання збовтування середовища припиняють.

Про завершене якісне переварювання свідчать просвітління рідини, яка набуває солом'яно-жовтого кольору, а також утворення на дні пилоподібного осаду. Рідина легко фільтрується, її перевіряють на наявність триптофану за допомогою проби з бромною водою (до 3-4 мл фільтрату додають 3-4 краплі бромної води). За наявності триптофану (до 2,0-3,0 г/л) колір середовища змінюється на рожево-фіолетовий. Визначають загальний азот, який в нормі досягає 11,0-12,0 г/л, і аміний азот (до 7,0-9,0 г/л).

Гідролізат фільтрують через паперовий або полотняний фільтр, розливають у бутлі та автоклавують при 120 °С протягом 30 хв. У такому вигляді він може зберігатись тривалий час.

Його використовують для отримання бульйону Хоттінгера. З цією метою до 100-200 мл гідролізату додають 800-900 мл дистильованої води, 0,5 % хлориду натрію та 0,2 % однозаміщеного фосфорнокислого натрію. Доводять рН до 7,4-7,6, розливають у флакони і стерилізують 20 хв при 120 °С.

М'ясо-пептонний агар на основі гідролізату Хоттінгера готують за рецептурою звичайного МПА.

Сьогодні, як правило, бактеріологи намагаються користуватися стандартними сухими живильними середовищами, які випускає бактеріологічна промисловість. Такі середовища дозволяють суттєво покращити результати мікробіологічних досліджень і стандартизувати їх.

Основні методи стерилізації

Головний напрям у боротьбі з інфекційними хворобами – профілактичний. У зв'язку з цим у діяльності лікувальних закладів велике значення має попередження попадання збудників захворювань в організм людини або інші об'єкти. Це проводиться добре розробленими й апробованими методами мікробної деконтамінації. Основні з них – стерилізація, дезінфекція, антисептика та асептика.

Стерилізація (від лат. *sterilis* – безплідний, вільний від бактерій) – повне знищення вегетативних і спорових форм усіх мікроорганізмів на предметах, матеріалах, у живильних середовищах.

У медичній практиці стерилізують інструменти, перев'язочний і шовний матеріал, операційну білизну, лікарські препарати. У мікробіологічних лабораторіях – живильні середовища, пробірки, піпетки, колби, чашки Петрі тощо. Тому перед стерилізацією необхідно вміти підготувати інструменти, посуд, пробірки, піпетки, перев'язочний матеріал та інше.

Інструменти обробляють у такій послідовності. Спочатку їх прополіскують у проточній воді, потім замочують у миючому розчині 15 хв, миють у тому ж розчині 0,5-1 хв, прополіскують проточною і дистильованою водою, висушують у сухожаровій шафі при 80-85 °С до повного зникнення вологи.

Пробірки, флакони, колби закривають ватними пробками. Пробірки загортають у папір по 25-30 штук, а чашки Петрі – по 4-5 штук або вміщують у стерилізаційні коробки (бікси). Пастерівські й градуйовані піпетки з широкого кінця затикають ватою, обгортають папером або вміщують у картонні чи металеві пенали по 10-15 штук. Живильні середовища в колбах, флаконах, пробірках також закривають пробками.

У лабораторній практиці використовують такі види стерилізації: а) високою температурою; б) механічна (холодна); в) хімічними речовинами і газами.

Існує багато способів стерилізації з допомогою високої температури. Ефективність такої стерилізації при нагріванні характеризується показником D – часом, який необхідний при даній температурі, щоб отримати десятикратне зменшення популяції бактерій (на 90 %). Його величина вимірюється, як правило, у хвилинах.

Прожарювання в полум'ї пальника – швидкий й абсолютно надійний спосіб. Ним стерилізують бактерійні петлі, пінцети, предметні й покривні скельця.

Кип'ятіння протягом 40 хв у спеціальних стерилізаторах використовують для обробки хірургічних інструментів, шприців, голок, гумових трубок. Для підвищення температури кипіння й усунення жорсткості води додають 1 % бікарбонату

натрію. Цей метод не забезпечує повної стерилізації, оскільки спори деяких видів бацил і клостридій витримують кип'ятіння протягом декількох годин.

Стерилізацію сухим жаром у сухожаровій шафі проводять при 160 °С протягом 120-150 хв, або при 180 °С – 45-60 хв після досягнення заданої температури (рис. 15). Стерилізують переважно скляний посуд. Перевага цього методу над іншими полягає в тому, що не пошкоджується скло, не відбувається корозії металевих інструментів. Його можна використати для стерилізації термостійких порошків та інших речовин. Одним з недоліків даного методу є достатньо тривалий строк стерилізації. Крім того, при високих температурах може відбутися обвуглювання і загоряння ватних пробок, паперу, в який загорнутий посуд.

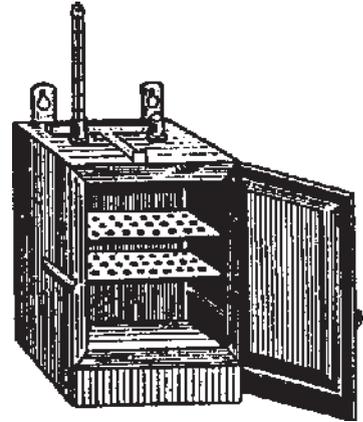


Рис. 15. Сухожарова шафа.

Стерилізація паром під тиском – найнадійніший метод повного знищення бактерій та їх спор. Він досягається дією пари, температура якої під тиском вища, ніж при кип'ятінні. Таку стерилізацію проводять в автоклаві. Стерилізація паром під тиском більш ефективна, ніж дія сухого жару.

Існують різноманітні електричні автоклави, які відрізняються між собою за розмірами, формою, розташуванням (вертикальні та горизонтальні), вони можуть бути з ручним керуванням, напівавтоматичні й автоматичні.

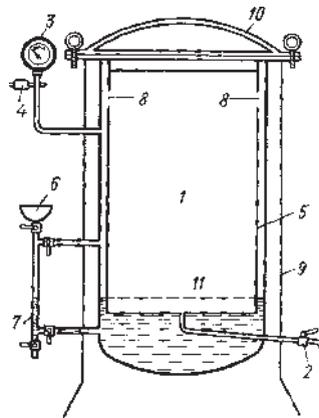
Конструктивно всі типи автоклавів представляють собою двостінний міцний металевий котел циліндричної форми з кришкою, яка герметично закривається, що дозволяє витримати високий тиск (рис. 16). Внутрішня частина автоклаву є стерилізаційною камерою (1), в яку вміщують матеріал, що стерилізується. Вона має спеціальний кран для виходу повітря (2) і манометр (3) із запобіжним клапаном (4). Манометр визначає робочий тиск пари в камері, а запобіжний клапан сприяє виходу надлишку пари з метою запобігання розриву автоклава. Дистильовану воду в водопарову камеру заливають через спеціальну лійку (6), стежачи за її рівнем у спеціальній водомірній трубці (7). Пара із водопарової камери поступає в стерилізаційну камеру через спеціальні отвори в її верхній частині. Сучасні автоклави мають манометри і автоматичні регулятори включення і відключення струму, тримаючи заданий тиск, а отже й задану температуру всередині автоклава. Робота з ним вимагає суворого дотримання правил безпеки, які викладені в інструкції до кожного автоклава.

Основні правила роботи з автоклавом

1. Перед початком роботи слід ретельно оглянути автоклав, його контрольно-вимірну апаратуру, перевірити пружність резинової прокладки, кріплення кришки стерилізаційної камери.

2. Через спеціальну лійку до рівня відмітки на водомірній трубці в автоклав заливають дистильовану воду і закривають кран.

3. Необхідний матеріал вміщують у стерилізаційну камеру і закривають герметично кришкою автоклава. Бажано стежити, щоб предмети не розташовувались



- Схема автоклава:
- 1 – стерилізаційна камера;
 - 2 – кран для виходу повітря;
 - 3 – манометр; 4 – запобіжний клапан; 5 – водопарова камера;
 - 6 – лійка для заливу автоклава водою; 7 – водомірна трубка;
 - 8 – отвори для поступлення пари в стерилізаційну камеру;
 - 9 – захисний кожух;
 - 10 – кришка автоклава;
 - 11 – підставка для розміщення предметів для стерилізації.

Рис. 16. Автоклав.

в автоклаві дуже тісно, оскільки між ним повинна проходити пара. В іншому випадку вони можуть залишитись нестерильними через відсутність нагріву до необхідної температури.

4. Відкривають кран, який з'єднує стерилізаційну камеру з оточуючим середовищем, і включають електричний нагрів.

5. Після того, як почався процес утворення пари, необхідно видалити повітря із стерилізаційної камери. Для цього пару і конденсат відводять у спеціальну посудину з водою або в каналізацію. Чисту пару, яка виходить з автоклава з рівномірним шиплячим звуком, протягом 10 хв пропускають через камеру, а потім закривають паровідвідний кран.

6. Доводять тиск пари до рівня, якого вимагає режим стерилізації. Для цього враховують співвідношення показників тиску манометра і температури кипіння води (табл. 1).

7. По завершенні циклу стерилізації автоклав відключають. Тиск в автоклаві поступово падає і зрівнюється з атмосферним. Тоді відкривають випускний кран і поступово випускають надлишок пари у посудину з водою. Недотримання цих правил може призвести до різкого зниження тиску, внаслідок чого рідина в пробірках, колбах, які стерилізувались, бурхливо закипає, змочуючи ватно-марлеві пробки і навіть виштовхуючи їх. Така ситуація порушує стерильність матеріалу.

В автоклаві при 120 °С протягом 20 хв стерилізують прості живильні середовища (МПБ, МПА), ізотонічні розчини, білизну, перев'язочний матеріал, а при 134 °С – знешкоджують заразні матеріали, відпрацьовані культури бактерій протягом 40 хв. Середовища з вуглеводами не витримують такої обробки, оскільки вони карамелізуються, у зв'язку з чим їх стерилізують текучою парою.

Стерилізація текучою парою (100 °С) проводиться в автоклаві з незагвинченою кришкою. При нагріванні пара проникає між вкладеними об'єктами й стерилізує їх. Таким способом обробляють середовища з вуглеводами. Оскільки од-

Таблиця 1

Залежність між надлишковим тиском пари, температурою кипіння води і тривалістю стерилізації

Тиск пари, атм	Температура, °С	Час стерилізації, хв
0	100	30-60
0,5	112	20-30
1,0	121	15-20
1,5	127	15-20
2,0	134	15

норазова дія пари не вбиває спори, застосовують дробну стерилізацію— 3 дні підряд по 30 хв. Ті спори, які не загинули при першому нагріванні, проростають до наступного дня у вегетативні клітини й гинуть при другій і третій обробці.

Для тих речовин, які не витримують 100 °С (білкові рідини, вітаміни, деякі ліки), застосовують **тиндалізацію** – стерилізацію на водяній бані при температурі 58-60 °С протягом години 5-6 днів підряд. Однак цей метод зараз широко не застосовується, оскільки вимагає значних затрат часу на його проведення.

Пастеризацією вважають одноразове прогрівання матеріалу до температури нижче 100 °С, при якій знищуються, в першу чергу, вегетативні форми мікроорганізмів. Цей спосіб вперше запропонував Л. Пастер для знищення безспорових форм мікробів, переважно патогенних і умовно-патогенних видів. Спори при цьому залишаються живими, а мікроорганізми, що залишилися, стають помітно ослабленими. Метод широко використовують у харчовій промисловості, коли при кип'ятінні можуть втратитись органолептичні властивості продуктів. Так проводять термічну обробку молока, пива, вина, різних соків при 70 °С протягом 30 хв або при 80 °С – 5-10 хв. Пастеризовані продукти зберігаються на холоді.

Згортання (ущільнення) сироватки і яєчних середовищ з одночасною їх стерилізацією проводять у спеціальних згортувачах Коха з електричним підігрівом (рис. 17). Асептично приготовлені сироватки та яєчні середовища у нахиленому положенні прогривають однократно при 80-90 °С одну годину. При підозрі на мікробну контамінацію їх прогривають при тій же температурі три дні підряд.

Механічні методи стерилізації широко використовуються в мікробіологічних лабораторіях. Особливо за тих умов, коли підвищена температура може зруйнувати субстрати. Це стосується рідких середовищ і рідин, які містять білки, вітаміни, антибіотики, вуглеводи, леткі речовини тощо. Метод можна застосувати для очищення бактеріальних токсинів, бактеріофагів від мікроорганізмів. Однак цей метод вважається менш надійним порівняно із класичною стерилізацією.

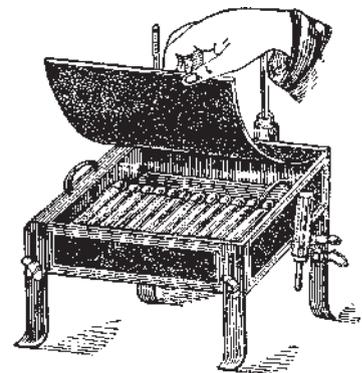


Рис. 17. Апарат для стерилізації і згортання (ущільнення) сироватки.

Механічна (холодна) стерилізація проводиться за допомогою фільтрування через дрібнопористі антибактеріальні чи антивірусні фільтри. Їх створюють із спеціальних матеріалів, пронизаних порами, які мають різну форму та йдуть через фільтр звивисто. Фільтри можна виготовляти із позитивно зарядженого матеріалу, тоді бактерії, що несуть на поверхні негативний заряд ще й взаємодіють з ним електростатично, а не тільки механічно внаслідок різного діаметру бактерій і пор. Щоб попередньо перевірити якість фільтрів, використовують дрібні тест-мікроорганізми (*Serratia marcescens* або *Pseudomonas aeruginosa*). Фільтрат висівають на живильне середовище і витримують при оптимальній температурі протягом 5 днів. При відсутності росту тест-бактерій можна застосовувати фільтр для стерилізації.

Промисловість різних країн випускає найрізноманітніші фільтри, які різняться за матеріалом виготовлення й діаметром пор. Мембранні або колоїдні фільтри, які виготовляють із нітроцелюлози, представляють собою диски діаметром до 35 мм. Нижче наведено характеристики різних фільтрів (табл. 2).

Таблиця 2

Типи фільтрів

Фільтри країн СНД		Фільтри фірми „Мілліпор”		Фільтри фірми „Синпор”	
номер фільтра	діаметр пор, мкм	тип фільтра	діаметр пор, мкм	тип фільтра	діаметр пор, мкм
1	0,35	VF	0,01	1	4,0
2	0,5	VM	0,05	2	2,5
3	0,7	VC	0,10	3	1,5
4	0,9	SLGS	0,22	4	0,85
5	1,2	SLHA	0,45	5	0,60
6	3,5	DA	0,65	6	0,40
		AA	0,8	7	0,30
		RA	1,2	8	0,23
		SS	3,0	9	0,17
		SM	5,0	10	0,12

У мікробіологічних лабораторіях часто використовують фільтри Зейтца (рис. 18). Вони представляють собою пластини (диски або квадрати) товщиною 4-6 мм, які виготовляють із суміші азбесту і целюлози.

Однак ці фільтри мають ряд недоліків, які слід враховувати при роботі з ними. По-перше, можливе забруднення фільтратів сторонніми речовинами, які попадають у нього з фільтра (луги, солі лужних металів, волокна азбесту). По-друге, азбест внаслідок свого негативного заряду зв'язує деякі речовини з рідини, що фільтрується. Крім того, слід ретельно перевіряти фільтри перед роботою, щоб не використовувати ті, які мають механічну деформацію (тріщини, надломи тощо).

Крім азбестових, широко використовуються фарфорові фільтри, вперше запропоновані Пастером і Шамберланом. Їх інакше називають свічки Шамберлана. Виготовляють їх із каоліну й кварцового піску та надають форми порожнистого

циліндра, який закритий з одного кінця. Величина пор позначається L_1 - L_{13} . Фільтри L_5 - L_{13} є антибактеріальними.

Інший тип фільтрів, які виготовляють з інфузорної землі (діатоміту або кізельгуру), одержав назву свічок Беркефельда. За своїм зовнішнім виглядом вони подібні до циліндрів, замкнених з одного з кінців. Свічки маркують літерами V, N і W, що відповідає діаметру пор в межах відповідно 8-12, 5-7 і 3-4 мкм.

Випускаються ще й стерилізуючі фільтри із скла „Пірекс” у вигляді двошарових дисків. Поділяють фільтри за розміром пор на три основних типи: С, М і Р. Розмір пор у них відповідно становить понад 1,7, від 1 до 1,7 і менше 1 мкм.

Перед роботою фільтр закріплюють у спеціальному тримачі. Зокрема, азбестові пластинки вміщують між циліндричною й опорною частиною металевого корпусу апарата Зейтца. Обидві частини з'єднують гвинтами. Зібраний фільтр вставляють у гумовий корок колби Бунзена з боковим відростком. Повністю вмонтований фільтр загортають у папір і стерилізують в автоклаві. Рідину для фільтрування наливають у металевий циліндр, з'єднують боковий відросток колби з вакуумним насосом, щоб створити вакуум у колбі й прискорити фільтрування. Фільтрат у колбі буде стерильним.

Хімічним способом стерилізують вироби з гумових і полімерних матеріалів. Для цього використовують 6 % розчин перекису водню, в який занурюють вироби на 6 год при 18 °С і на 3 год при 50 °С. Можна застосувати розчин дексона з експозицією 45 хв при 18 °С. Після закінчення стерилізації вироби двічі прополіскують у стерильній дистильованій воді, кожного разу змінюючи її, та переносять корнцангом у стерильний бікс.

Інструменти для ендоскопії й автоматичні піпетки можна також стерилізувати спиртом.

Газовий метод стерилізації парами формальдегіду, хлороформу, β -пропіолактону, окисом етилену, окисом пропілену, метилброміду, озonom використовують для знезараження ендоскопічних інструментів, апаратів для штучного кровообігу, радіоелектронного обладнання, пластмасових виробів, кетгуту тощо. Ефективною зарекомендувала себе суміш окису етилену і бромистого метилу в співвідношенні 1:1,44. Для проведення стерилізації газом використовують спеціальні щільні камери, які герметично закриваються. Для кожного діючого фактора розроблено свої режими стерилізації. Після завершення процедури газова суміш викачується з камери і замінюється стерильним повітрям. Предметами, які було

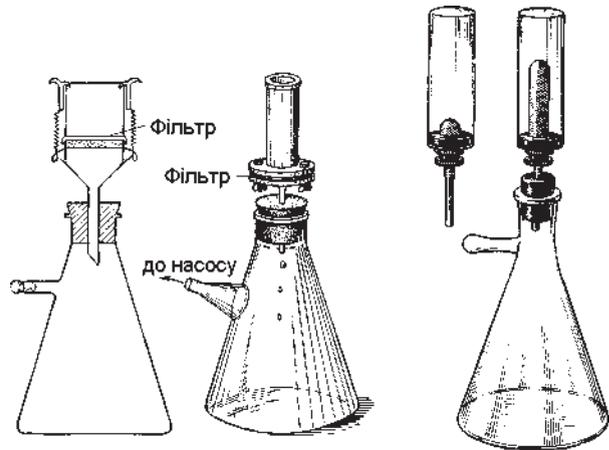


Рис. 18. Фільтр Зейтца. Свічки Шамберлана.

простерилізовано вказаним способом, рекомендується користуватись не раніше, ніж через 24 год, для того, щоб видалився весь газ.

Одним із методів стерилізації є застосування різних типів *опромінення*. У практиці використовуються для цього *електрони, гамма-промені, ультрафіолетові промені, радіочастотне опромінення*.

Електронні прискорювачі дозволяють фокусувати електрони у вузькій спрямований пучок високої потужності. Цей метод використовують для стерилізації в промислових масштабах хірургічного перев'язочного і шовного матеріалів ще на етапі їх виробництва. Недоліком даного методу стерилізації є низька проникність променів.

До гамма-опромінення чутливі вегетативні та спорові форми різноманітних бактерій, грибів, дріжджів, віруси. Опромінення потужністю 2,5 Мрад використовується для знезараження антибіотиків, вітамінів, стероїдних та інших гормонів, пластмасового одноразового устаткування (чашок Петрі, шприців), хірургічного перев'язочного та шовного матеріалів тощо.

Стерилізацію за допомогою ультрафіолетового опромінення проводять для знешкодження бактерій в повітрі операційних, палат, боксів, мікробіологічних лабораторій тощо. Для цього використовують спеціальні бактерицидні лампи різної потужності – БУВ-15, БУВ-30 та ін. Однак слід пам'ятати, що мікроби можуть бути захищені від дії ультрафіолетового опромінення численними органічними речовинами, пилом та іншими факторами. Вегетативні форми бактерій у 3-10 разів більш чутливі до УФО, ніж спори.

Методи радіочастотного опромінення на сьогодні починають інтенсивно розробляти, особливо у харчовій промисловості. Складність їх полягає в небезпеці для обслуговуючого персоналу (наприклад, перешкоди систем зв'язку, різна частота опромінення, яка застосовується для знешкодження мікроорганізмів).

Для перевірки ефективності стерилізації, надійності роботи автоклавів застосовують хімічний та біологічний контроль. Відомі хімічні речовини з певною температурою плавлення: бензонафтол – 110 °С, антипирин – 115 °С, сірка – 119 °С, бензойна кислота – 120-122 °С, манноза і сечовина – 132-133 °С. Саме при таких температурах найчастіше здійснюють стерилізацію. Хімічні речовини вміщують у скляні трубки, додають невелику кількість анілінового барвника (сафранін, фуксин або метиленовий синій), запаюють і кладуть між об'єктами, що стерилізуються. Рівномірне забарвлення препарату в колір барвника в трубці свідчить про належну температуру в автоклаві, а отже й надійність стерилізації. Для біологічного контролю стерилізації в автоклав вміщують спеціальні біотести – смужки фільтрувального паперу, марлі тощо, на яких знаходяться спори бактерій з відомою термостійкістю, спори відомої чисельності та ін. (табл. 3).

Вони розкладаються в біксах, які підлягають стерилізації. Після завершення циклу в пробірці з смужками заливають живильне середовище та інкубують при оптимальній температурі. Відсутність проростання спор бактерій свідчить про ефективну стерилізацію.

У таблиці 4 наведено основні способи стерилізації різних медичних об'єктів.

Таблиця 3

Спори бактерій, які найчастіше використовують як індикатори

Вид мікробів	Метод стерилізації	Величина D, хв
Bacillus subtilis	Окис етилену (600 мг/л) при 54 °С і 50 % відносній вологості	3,0 хв
	Сухий жар (170 °С)	0,8 хв
Bacillus stearothermophilus	Волога пара (≥ 121 °С)	1,5 хв
Clostridium sporogenes	Волога пара (≤ 121 °С)	0,2-0,8 хв

Таблиця 4

Способи стерилізації медичних об'єктів

Спосіб стерилізації	Об'єкти стерилізації
Сухий жар	Скляний посуд, олія, інструменти, голки, порошки
Волога пара	Розчини для парентерального введення, інструменти, середовища, резинові пробки
Фільтрування	Живильні середовища, що не витримують нагрівання, із білками, деякими вітамінами, амінокислотами, гази, рідини, мазі, олії з низькою в'язкістю
Окис етилену	Обладнання для наркозу, катетери, діагностичне обладнання, протези, лабораторне устаткування, допоміжні хірургічні матеріали, оптичні інструменти, пластмасові вироби, пакувальні матеріали
Іонізуюче опромінення	Порошки, перев'язочний матеріал, пробірки для забору крові, щітки, мазі від опіків, центрифужні стакани, шовний матеріал, хірургічний одяг

Дезінфекція. Дезінфекція – це сукупність заходів для повного, часткового або селективного знищення потенційно патогенних для людини збудників на різних об'єктах довкілля з метою попередження передачі збудника від джерела інфекції до сприйнятливого організму.

Оскільки мікроорганізми мають різну чутливість до дезінфікуючих засобів, виділяють чотири ступені дезінфекції: А, В, С, D. Дезінфекційні заходи ступеня А передбачають знищення аспорогенних форм мікробів, рикетсій, мікоплазм, найпростіших. Заходи ступеня В використовуються для ліквідації грибів, деяких вірусів, бактерій, що мають підвищену стійкість (стафілококи, мікобактерії). Боротьба із збудниками особливо небезпечних інфекцій (чуми, холери, висипного тифу, меліоїдозу, сапу) вимагає заходів ступеня С. Знищення спор мікроорганізмів і найпростіших – заходів ступеня D.

Заходи дезінфекції, що використовуються в клініках, мікробіологічних, вірусологічних та інших лабораторіях досить різноманітні. Їх умовно можна поділити на 2 групи: **фізичні** та **хімічні**.

До першої групи можна віднести спалювання використаного перев'язочного матеріалу, відходів, сміття, пропалювання в полум'ї пальника, дію сухого жару, автоклавування за різних режимів, використання ультразвуку. Ефективними захо-

дами є кип'ятіння предметів особливо з поверхнево активними речовинами, дезінфекція повітря за допомогою ультрафіолетового опромінення. Постійно використовуються такі елементарні заходи, як вологе прибирання, миття, очищення, витріпування ковдр, простирадл тощо. Такі заходи хоча й не знищують мікроорганізмів, однак сприяють суттєвому зниженню їх популяцій на різних об'єктах.

Потужним комплексом дезінфекційних заходів виступають численні хімічні препарати – дезінфектанти. До них пред'являють певні вимоги: 1) протимікробний ефект широкого спектра дії; 2) висока розчинність у воді, здатність утворювати з водою або повітрям активні та стійкі суспензії, емульсії, аерозолі; 3) здатність не втрачати протимікробних властивостей при наявності в середовищі органічних домішок; 4) низька токсичність; 5) відсутність алергізуючої дії; 6) відсутність пошкоджуючого ефекту щодо предметів, які ними обробляються; 7) доступність сировини, з якої виготовляються дезінфектанти, її дешевизна тощо.

Існує декілька сотень дезінфікуючих засобів різних груп. Серед них алкоголі, альдегіди, четвертинно-амонієві сполуки. Найширше використання знайшли хлоромістки препарати. До них належать 0,2-1,0 % хлорне вапно, яке виготовляють *ex tempore* з 10 % освітлених розчинів цієї речовини; 0,2-1,0 % розчини хлораміну В або Т; 5 % водні розчини гіпохлориду кальцію; 0,05-0,1 % розчин трихлорізоціанурової кислоти (диконіту); 0,1-0,2 % розчин сульфохлорантину. Окислювачі представлені 1-10 % розчином перекису водню, фенолами та їх похідними – 3-5 % розчинами лізолу, карболової кислоти, фенолу. До групи препаратів із солей важких металів належать мертиолят натрію, сулема. Широке застосування набули 2-3 % розчин формальдегіду, 3-10 % розчин крезолу та інші. Використовуються в практиці й газоподібні дезінфектанти – 40 % водний розчин формальдегіду, суміші окису етилену з вуглекислим газом (1:10) і окису етилену з бромідметилом (1:1).

На практиці виділяють *поточну* та *заключну* дезінфекцію. Поточну дезінфекцію проводять для зменшення мікробної контамінації у вогнищах інфекції. Їй підлягають ліжка, постільна і натільна білизна, рушники, матраци, подушки, меблі, килими, посуд, інструменти, прилади, що знаходяться на поверхні різних об'єктів, повітря, виділення, стічні води тощо.

Зокрема, поверхні столів, вікон, стелі, стіни, меблі дезінфікують протиранням і миттям з допомогою дезінфікуючих розчинів, постільну та іншу білизну перуть у цих розчинах. Ліжка, матраци, подушки обробляють у спеціальних камерах термохімічними методами, м'які меблі – за допомогою спеціальних аерозолів, посуд – зануренням у дезінфікуючі розчини. Обробка виділень і стічних вод проводиться термічними і хімічними методами. Повітря приміщень можна дезінфікувати пропусканням через спеціальні антибактеріальні фільтри, як це роблять в палатах гнотобіологічної ізоляції, або опромінюючи його ультрафіолетовими променями. Медичні інструменти, прилади спочатку очищають, дезінфікують, а потім, у разі потреби, стерилізують відомими способами.

Заключна дезінфекція проводиться з метою знищення збудників інфекційних захворювань у приміщенні, де перебував інфекційний хворий, і предметах, з

якими він був у контакті. Така ситуація складається після виписування його з інфекційного стаціонару, переводу із соматичного відділення в інфекційне тощо.

Для забезпечення догляду за проведенням дезінфікуючих заходів розроблену спеціальну систему контролю. Вона включає в себе: а) зовнішній і внутрішній контроль відділами дезінфекції санітарно-епідеміологічних станцій та лабораторій лікувально-профілактичних закладів, який здійснюється візуальним, бактеріологічним, біологічним, хімічним та іншими методами; б) бактеріологічний контроль проводять, виявляючи у вогнищах інфекції індикаторних бактерій: при кишкових захворюваннях – кишкові палички, при крапельних інфекціях, туберкульозі – стафілококи, у лікувально-профілактичних закладах – умовно-патогенні мікроорганізми; контроль здійснюється 1 раз у місяць – один раз у квартал залежно від рангу лабораторії; в) забір контрольних проб (10-30 штук) проводять не раніше, ніж через 30-45 хвилин після закінчення дезінфекції; площа змивів не повинна бути меншою, ніж 200 см²; г) змиви беруть стерильними ватними тампонами і засівають на живильні середовища з дотриманням всіх правил асептики з метою запобігання контамінації сторонньою флорою; для виділення бактерій групи кишкової палички і золотистих стафілококів користуються спеціальними наборами живильних середовищ і схемами ідентифікації, визначених відповідними інструкціями.

Дезінфікуючі заходи вважаються ефективними, якщо у пробах не визначаються бактерії групи кишкової палички, умовно-патогенні мікроби, золотисті стафілококи.

Бактеріологічне дослідження

Бактеріологічний метод дослідження є найважливішим у практичній діяльності будь-якої мікробіологічної лабораторії. Від правильного його виконання залежить визначення етіологічного чинника, що викликав захворювання, і, відповідно, вибір тактики лікування інфекційного хворого. Важливість цього методу пояснюється тим, що в багатьох випадках лікарі мають справу з мікробними асоціаціями, тоді необхідно встановлювати роль кожного з мікробів у виникненні хвороби.

Тому перед освоєнням основних принципів і методів виділення чистих культур необхідно оволодіти технікою посівів і пересівів бактерій в рідкі й на щільні живильні середовища.

Техніка посівів мікроорганізмів. Посіви проводять як з метою виділення збудників із досліджуваного матеріалу від хворих, так і для нагромадження чистих культур з метою подальшого їх вивчення та ідентифікації. Техніка посівів у рідкі та на щільні живильні середовища має свої особливості (рис. 19).

У ліву руку беруть дві пробірки. В одній знаходиться живильне середовище (щільне або рідке), в іншій – досліджуваний матеріал. Пробірки затискають великим та вказівним пальцями. Для того, щоб можна було спостерігати за вмістом пробірок, їх тримають зверху кисті руки. Пробірки повинні бути дещо нахиленими, і потрібно стежити, щоб при відкриванні їх матеріал або сторонні мікроби з

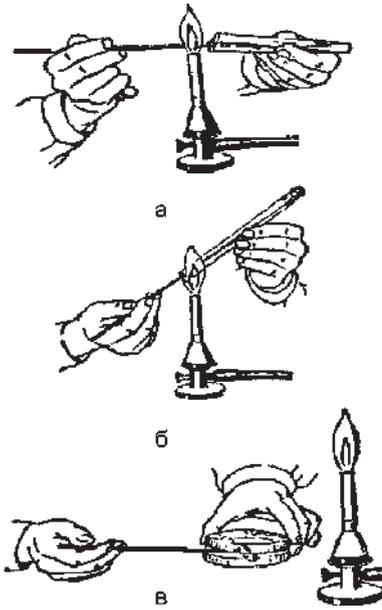


Рис. 19. Посіви бактерій на середовище: а – бактеріальною петлею на скошений агар; б – уколом в сповпчик агару; в – шпательом на агар у чашці Петрі.

повітря та навколишніх предметів з однієї не потрапили в іншу. Корки з пробірок виймають, тримаючи їх 4 і 5 пальцями правої руки. Трьома іншими пальцями правої руки, як олівець, тримають бактеріологічну петлю або піпетку, якими розподіляють досліджуваний матеріал.

Спочатку стерилізують петлю у верхній частині полум'я газового пальника. Пробірки відкривають і край їх проносять через полум'я пальника. Петлю опускають у пробірку, де є досліджуваний матеріал, і, обережно торкаючись стінки, охолоджують. У подальшому петлю опускають у пробірку і набирають матеріал. Якщо він знаходиться у рідкому стані, для посіву достатньо краплі рідини, яка затримується в кільці бактеріологічної петлі. Коли використовують мікроби, що вирости на поверхні середовища, обережно плавним рухом набирають невелику кількість їх, стежачи, щоб не ушкодити живильне середовище. Петлю повільно виймають з пробірки, не торкаючись її стінок, і переносять в іншу пробірку з середовищем. Штриховими рухами від однієї стінки пробірки до іншої, починаючи з нижньої

частини середовища, проводять посів матеріалу по скошеній поверхні агару знизу догори.

Петлю виймають з пробірки, корки і краї пробірок проносять через полум'я і закривають. Петлю прожарюють у полум'ї, щоб знищити мікроорганізми.

При посіві матеріалу на рідке живильне середовище петлю з матеріалом занурюють у рідину. Якщо він не знімається з петлі, його обережно розтирають на стінці пробірки й омивають середовищем.

Матеріал, який набирали пастерівською або градуйованою піпеткою, виливають у живильне середовище, а для рівномірного розповсюдження його пробірку обережно, щоб не замочити корок, струшують або обертають, затиснувши в долонях.

Для посіву матеріалу на щільне живильне середовище у чашках Петрі невелику кількість матеріалу набирають стерильною петлею і втирають у поверхню середовища біля краю чашки. Після цього петлю стерилізують у полум'ї, щоб знищити надлишок матеріалу, охолоджують. Наступний етап посіву починають з місця, де закінчився попередній. Петлю кладуть горизонтально на поверхню агару, де було зроблено посів, проводять один-два рази по поверхні і роблять посів по решті середовища. Необхідно намагатись, щоб штрихи посіву тривали від краю до краю чашки, не пошкоджували поверхню агару і розташовувались близько один до одного. Цим штучно подовжується лінія посіву і створюються можливості для одержання ізольованих колоній.

Посів шпателем і тампоном у чашки Петрі. Матеріал попередньо наносять на поверхню живильного середовища біля краю чашки петлею або піпеткою. Стерильний шпатель проносять через полум'я, охолоджують, торкаючись стінки чашки. Обережними круговими рухами, тримаючи чашку напівзакритою, розподіляють матеріал рівномірно по поверхні середовища.

При посіві тампоном чашку дещо відкривають однією рукою, тампоном торкаються поверхні агару біля краю чашки і починають проводити посів штрихами від краю до краю чашки, втираючи обережно матеріал у поверхню середовища, не пошкоджуючи його, поступово обертаючи тампон. Після проведення посіву чашку обертають на 90° і повторюють посів перпендикулярно до попереднього.

При посіві уколом у стовпчик живильного середовища пробірку з м'ясопептонним агаром, желатином тощо беруть у ліву руку, петлю з матеріалом – у праву і роблять укол до дна пробірки в середовище. Петлю обережно виймають, а пробірку закривають.

Посів матеріалу в товщу живильного середовища. Перед посівом матеріал повинен бути в рідкому стані. Стерильною градуйованою піпеткою набирають 0,1, 0,5 або 1,0 мл матеріалу і виливають його в стерильні чашки Петрі. Після цього матеріал заливають 15-20 мл розтопленого й охолодженого до 45-50°C МПА. Обережно похитуючи чашку, круговими рухами по поверхні стола перемішують в ній матеріал, досягаючи його рівномірного розподілу в середовищі. Чашку залишають закритою до повного застигання агару, а потім перевертають догори дном.

Для того, щоб виділити чисту культуру мікроорганізмів, слід відділити численні бактерії, які знаходяться в матеріалі, одна від одної. Це можна досягнути за допомогою методів, які засновані на двох принципах – *механічному* і *біологічному* роз'єднанні бактерій.

Методи виділення чистих культур, засновані на механічному принципі

Метод послідовних розведень, запропонований Л. Пастером, був одним із найперших, який застосовувався для механічного роз'єднання мікроорганізмів. Він полягає в проведенні послідовних серійних розведень матеріалу, який містить мікроби, в стерильному *рідкому* живильному середовищі. Цей прийом достатньо кропіткий і недосконалий у роботі, оскільки не дозволяє контролювати кількість мікробних клітин, які попадають у пробірки при розведеннях.

Цього недоліку не має **метод Коха (метод пластинчастих розведень)**. Р. Кох використовував щільні живильні середовища на основі желатину або агар-агару. Матеріал з асоціаціями різних видів бактерій розводився у декількох пробірках з розтопленим і дещо охолодженим желатином, вміст яких пізніше виливався на стерильні скляні пластини. Після застигання середовища воно культивувалось при оптимальній температурі. У його товщі утворювались ізольовані колонії мікроорганізмів, які легко можуть бути перенесені на свіже живильне середовище за допомогою платинової петлі для одержання чистої культури бактерій.

Метод Дригальського є більш досконалим методом, який широко розповсюджений в повсякденній мікробіологічній практиці. Спочатку на поверхню сере-

довища в чашці Петрі піпеткою або петлею наносять досліджуваний матеріал. За допомогою металевого або скляного шпателя його ретельно втирають у середовище. Чашку під час посіву тримають привідкритою і обережно обертають, щоб рівномірно розподілити матеріал. Не стерилізуючи шпателя, проводять ним посів матеріалу в іншій чашці Петрі, при потребі – в третій. Тільки після цього шпатель занурюють у дезінфікуючий розчин або прожарюють у полум'ї пальника. На поверхні середовища в першій чашці спостерігаємо, як правило, суцільний ріст бактерій, у другій – густий ріст, а в третій – ріст у вигляді ізольованих колоній (рис. 20).

Метод штрихових посівів сьогодні використовується в мікробіологічних лабораторіях найчастіше. Матеріал, який містить мікроорганізми, набирають бактеріологічною петлею і наносять на поверхню живильного середовища біля краю чашки. Знімають надлишок матеріалу і проводять посів його паралельними штрихами від краю до краю чашки. Через добу інкубації посівів при оптимальній температурі на поверхні чашки виростають ізольовані колонії мікробів (рис. 21).

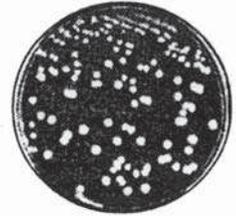
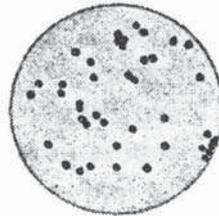
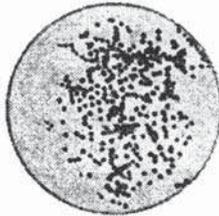


Рис. 20. Ріст бактерій в чашках Петрі при посіві за методом Дригальського.

Рис. 21. Ізольовані колонії бактерій при посіві штрихом.

Для одержання ізольованих колоній можна використати посів тампоном, яким проводили забір досліджуваного матеріалу. Дещо привідкривають чашку Петрі із живильним середовищем, вносять туди тампон і обережними рухами втирають матеріал у поверхню чашки, повертаючи поступово тампон і чашку.

Таким чином, істотна перевага методів пластинчастих розведень Коха, Дригальського і штрихових посівів полягає в тому, що вони створюють ізольовані колонії мікроорганізмів, які при інокуляції на інше живильне середовище перетворюються в чисту культуру

Методи виділення чистих культур, засновані на біологічному принципі

Біологічний принцип роз'єднання бактерій передбачає цілеспрямований пошук методів, які враховують численні особливості мікробних клітин. Серед найпоширеніших методів можна виділити наступні:

1. За типом дихання. Всі мікроорганізми за типом дихання поділяються на дві основні групи: *аеробні* (*Corynebacterium diphtheriae*, *Vibrio cholerae* тощо) та *анаеробні* (*Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* та ін.). Якщо матеріал, з якого слід виділити анаеробні збудники, попередньо прогріти, а потім культивувати в анаеробних умовах, то виростуть саме ці бактерії.

2. За спороутворенням. Відомо, що деякі мікроби (бацили і клостридії) здатні до спороутворення. Серед них *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*. Спори стійкі до дії факторів зовнішнього середовища. Отже, досліджуваний матеріал може бути підданий дії термічного фактора, а потім інокулятивно перенесений в живильне середовище. Через деякий час на ньому виростуть саме ті бактерії, які здатні до спороутворення.

3. Стійкість мікробів до дії кислот і лугів. Деякі мікроби (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*) внаслідок особливостей їх хімічної будови стійкі до дії кислот. Ось чому матеріал, який їх містить, наприклад, харкотиння при туберкульозі попередньо обробляють рівним об'ємом 10 % розчину сірчаної кислоти, а потім висівають на живильні середовища. Стороння флора гине, а мікобактерії внаслідок їх резистентності до кислот, виростають.

Холерний вібріон (*Vibrio cholerae*), навпаки, є галофільною бактерією, тому для створення оптимальних умов росту його висівають на середовища, які містять луг (1 % лужна пептонна вода). Вже через 4-6 год на поверхні середовища з'являються характерні ознаки росту у вигляді ніжної голубуватої плівки.

4. Рухомість бактерій. Деякі мікроби (*Proteus vulgaris*) мають тенденцію до повзучого росту і здатні швидко розповсюджуватись по поверхні дещо вологого середовища. Для виділення таких збудників їх засівають у краплинку конденсаційної рідини, яка утворюється при охолодженні стовпчика скошеного агару. Через 16-18 год вони розповсюджуються на всю поверхню середовища. Якщо взяти матеріал з верхньої частини агару, будемо мати чисту культуру збудників.

5. Чутливість мікробів до дії хімічних речовин, антибіотиків та інших протимікробних засобів. Внаслідок особливостей метаболізму бактерій вони можуть мати різну чутливість до деяких хімічних чинників. Відомо, що стафілококи, аеробні бацили, що утворюють спори, стійкі до дії 7,5-10 % хлориду натрію. Ось чому для виділення цих збудників використовують елективні живильні середовища (жовтково-сольовий агар, маніт-сольовий агар), які містять саме цю речовину. Інші бактерії при такій концентрації хлориду натрію практично не ростуть.

6. Введення деяких антибіотиків (ністатин) використовується для гальмування росту грибів у матеріалі, який сильно контамінований ними. І, навпаки, додавання антибіотика пеніциліну до середовища сприяє інгібуванню росту бактеріальної флори, якщо треба виділити гриби. Додавання фуразолідону в певних концентраціях до живильного середовища створює селективні умови для росту коринебактерій і мікрококів.

7. Здатність мікроорганізмів проникати через неушкоджені шкірні покриви. Деякі патогенні бактерії (*Yersinia pestis*) внаслідок наявності великої кількості ферментів агресії здатні проникати через непошкоджену шкіру. Для цього шерсть на тілі лабораторної тварини голять і в цю ділянку втирають досліджуваний матеріал, який містить збудника і велику кількість сторонньої мікрофлори. За деякий час тварину забивають, а з крові або внутрішніх органів виділяють мікроби.

8. Чутливість лабораторних тварин до збудників інфекційних захворювань. Окремі тварини проявляють високу чутливість до різних мікроорганізмів.

Наприклад, при будь-якому способі введення *Streptococcus pneumoniae* білим мишам у них розвивається генералізована пневмококова інфекція. Аналогічна картина спостерігається при зараженні гвінейських свинок збудниками туберкульозу (*Mycobacterium tuberculosis*).

У повсякденній практиці бактеріологи користуються такими поняттями як **штам і чиста культура** мікроорганізмів. Під штамом розуміють мікроби одного виду, які виділено з різних джерел, або з одного й того ж самого джерела, але в різний час. Чиста культура бактерій – це мікроорганізми одного виду, нащадки однієї мікробної клітини, які виростили на (в) живильному середовищі.

Етапи виділення чистих культур мікроорганізмів та їх ідентифікація

Виділення чистої культури аеробних мікроорганізмів складається з ряду етапів.

У перший день (**I етап дослідження**) у стерильний посуд (пробірка, колба, флакон) забирають патологічний матеріал. Його вивчають за зовнішнім виглядом, консистенцією, кольором, запахом та іншими ознаками, готують мазок, фарбують і досліджують під мікроскопом. У деяких випадках (гостра гонорея, чума) на цьому етапі можна поставити попередній діагноз, а крім того, підібрати середовища, на які засіватиметься матеріал. Посів проводять бактеріологічною петлею (застосовується найчастіше), за допомогою шпателя за методом Дригальського, ватно-марлевым тампоном. Чашки закривають, перевертають догори дном, підписують спеціальним олівцем і ставлять у термостат при оптимальній температурі (37 °C) на 18-48 год. Мета етапу – одержати ізольовані колонії мікроорганізмів.

Однак, деколи з метою нагромадження матеріалу його засівають на рідкі живильні середовища.

На другий день (**II етап дослідження**) на поверхні щільного живильного середовища мікроорганізми утворюють суцільний, густий ріст або ізольовані колонії. **Колонія** – це видимі неозброєним оком скупчення бактерій на поверхні або в товщі живильного середовища. Як правило, кожна колонія формується з нащадків однієї мікробної клітини (клон), тому їх склад досить однорідний. Особливості росту бактерій на живильних середовищах є проявом їх культуральних властивостей.

Чашки ретельно розглядають і вивчають ізольовані колонії, що виростили на поверхні агару. Звертають увагу на величину, форму, колір, характер країв і поверхні колоній, їх консистенцію та інші ознаки. При потребі досліджують колонії під лупою, малим чи великим збільшенням мікроскопа. Структуру колоній досліджують у прохідному світлі при малому збільшенні мікроскопа. Вони можуть бути гіалінові, зернисті, ниткоподібні чи волокнисті, які характеризуються наявністю переплетених ниток у товщі колоній.

Характеристика колоній – важлива складова частина роботи бактеріолога і лаборанта, адже мікроорганізмам кожного виду притаманні свої особливі колонії (рис. 22).

Характеризувати колонії можна за різними ознаками. За величиною (діаметром) їх поділяють на великі (4-6 мм і більше), середні (2-4 мм), дрібні (1-2 мм),

карликові або точкові (менше 1 мм). Форма колоній може бути найрізноманітнішою: правильно кругла, неправильна (амебоподібна), ризоїдна. Вони бувають прозорими, що пропускають світло, і мутними.

За рельєфом і контуром форми у вертикальному розрізі колонії поділяються на плоскі, опуклі, куполоподібні, краплеподібні, конусоподібні, плоскоопуклі, плоскі, що стеляться по поверхні середовища, із вдавненим центром, з припіднятою у вигляді соска серединою.

Поверхня колоній може бути матовою або блискучою, з гляцем, сухою або вологою, гладенькою або шорсткою. Гладенькі колонії позначають як S-форми (smooth – гладенький), а шорсткі – R-форми (rough – шорсткий, нерівний).

Форма шорстких поверхонь також може бути різноманітною: зморшкуватою, гірзною, бородавчастою, шагреневою, мати радіальну посмугованість тощо.

Переважає більшість мікроорганізмів утворює безбарвні колонії або мутно-молочного кольору. Однак деякі з них формують кольорові колонії. Їх колір визначається пігментом, який синтезують бактерії: білі, кремові, жовті, золотисті, сині, червоні тощо.

При доторканні до колонії петлею можна визначити її консистенцію: пасто-подібна, в'язка або слизова, суха, крихка тощо.

З підозрілих колоній готують мазки, забарвлюють за методом Грама для вивчення морфологічних та тинкторіальних властивостей збудників, досліджують рухомість бактерій у “вісячій” чи “надавленій” краплі. Ці ознаки мають надзвичайно велике діагностичне значення при характеристиці окремих видів мікроорганізмів.

Рештки досліджуваних колоній обережно, не торкаючись інших, знімають із поверхні середовища і засівають на скошений агар або на сектори чашки Петрі із живильним середовищем для одержання чистої культури. Пробірки або чашки з посівами поміщають у термостат при оптимальній температурі на 18-24 год.

Сьогодні, як правило, бактеріологи намагаються користуватись стандартними сухими живильними середовищами, які випускає мікробіологічна промисловість. Такі середовища дозволяють суттєво покращити результати мікробіологічних досліджень і стандартизувати їх.

На рідких живильних середовищах бактерії також можуть рости по-різному, хоча особливості проявів росту бідніші, ніж на щільних.

Бактерії здатні викликати дифузне помутніння середовища, колір його при цьому може не змінюватись або набуває кольору пігменту. Такий характер росту найчастіше спостерігається у більшості факультативно-анаеробних мікроорганізмів.

Деколи відбувається утворення осаду на дні пробірки. Він може бути крихто-подібним, гомогенним, в'язким, слизистим та ін. Середовище над ним може зали-

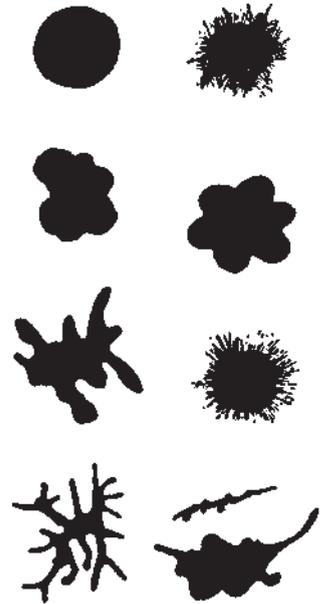


Рис. 22. Види колоній мікроорганізмів.

шатись прозорим або ставати мутним. Якщо мікроби пігменту не утворюють, осад має сірувато-білий або жовтуватий колір. Подібним чином ростуть, як правило, анаеробні бактерії.

Пристінковий ріст проявляється утворенням пластівців, зерен, прикріплених до внутрішніх стінок пробірки. Середовище при цьому залишається прозорим.

Аеробні бактерії мають тенденцію до поверхневого росту. Часто утворюється ніжна безбарвна або голубувата плівка у вигляді ледь помітного нальоту на поверхні, яка зникає при струшуванні або збовтуванні середовища. Плівка може бути волога, товста, мати в'язку, слизисту консистенцію та прилипати до петлі, тягнучись за нею. Однак, зустрічається й щільна, суха, крихка плівка, колір якої залежить від пігменту, що виробляється мікроорганізмами.

У разі потреби виготовляється мазок, забарвлюється, досліджується під мікроскопом, а мікроорганізми засіваються петлею на поверхню щільного живильного середовища для одержання ізольованих колоній.

На третій день (**III етап дослідження**) вивчають характер росту чистої культури мікроорганізмів і проводять її ідентифікацію.

Спочатку звертають увагу на особливості росту мікроорганізмів на середовищі та роблять мазок, фарбуючи його за методом Грама, з метою перевірки культури на чистоту. Якщо під мікроскопом спостерігають бактерії однотипної морфології, розмірів та тинкторіальних (здатність фарбуватись) властивостей, роблять висновок, що культура чиста. У деяких випадках вже за зовнішнім виглядом та особливостями їх росту можна зробити висновок про вид виділених збудників. Визначення виду бактерій за їх морфологічними ознаками називається морфологічною ідентифікацією. Визначення виду збудників за їх культуральними ознаками називають культуральною ідентифікацією.

Однак цих досліджень недостатньо, щоб зробити остаточний висновок про вид виділених мікробів. Тому вивчають біохімічні властивості бактерій. Вони досить різноманітні. Найчастіше досліджують цукролітичні, протеолітичні, пептолітичні, гемолітичні властивості, утворення ферментів декарбоксилаз, оксидази, каталази, плазмокоагулази, ДНК-ази, фібринолізину, перетворення нітратів у нітри ти тощо. Для цього існують спеціальні живильні середовища, які засівають мікроорганізмами (строкатий ряд Гісса, МПБ, згорнута сироватка, молоко та ін.). Визначення виду збудника за його біохімічними властивостями називається біохімічною ідентифікацією.

Для дослідження здатності бактерій розщеплювати білки (протеолітичні властивості) використовують молоко або середовище з желатином. Протеоліз у молоті виражається розчиненням згустка казеїну, який утворено бактеріями, що згортають молоко.

Середовища із желатином готують на м'ясній воді, додаючи 1 % пептону, 0,5 % хлориду натрію та 10-20 % желатину. Посів роблять уколом. Протеоліз проявляється розрідженням стовпчика середовища. Оскільки деякі види бактерій відрізняються за особливостями розрідження желатину, цю ознаку можна враховувати при їх ідентифікації.

Пептолітичні властивості (здатність розщеплювати пептони – продукти неповного гідролізу білка) виявляють за допомогою МПБ і пептонної води. Їх засівають мікроорганізмами, а потім визначають утворення кінцевих продуктів – аміаку, сірководню та індолу. Для знаходження аміаку в пробірку вставляють та притискають пробкою червоний лакмусовий папірець. В атмосфері аміаку він набуває синього забарвлення. Індикатором на сірководень є розчин ацетату свинцю, який за аналогічних умов визначення забарвлює фільтрувальний папір, змочений індикатором, у чорний колір за рахунок утворення сульфиду свинцю.

Індол можна виявити за допомогою смужки фільтрувального паперу, змоченого 12 % розчином щавелевої кислоти. За наявності індолу папірець набуває рожевого кольору. Більш чутливим є метод Ерліха. Згідно із загальноприйнятим методом пробкою пробірки притискають папірець, просякнутий спеціальним індикатором (спиртовий розчин парадиметиламідобензальдегіду). При наявності індолу колір його змінюється на бузково-рожевий або малиновий. В іншому варіанті визначення індолу до 48-годинної бульйонної культури бактерій додають 1-2 мл сірчаного ефіру, а потім – реактив Ерліха. У нижній частині шару ефіру за 1-2 хв з'являється яскраве малинове кільце.

У мікробіологічній практиці широко використовуються диференційно-діагностичні середовища Ендо, Левіна, Плоскирева, які дозволяють виявити розкладання лактози бактеріями. Вони дозволяють проводити первинну диференціацію бактерій кишкового тракту, що надзвичайно важливо для швидкого виділення чистих культур з їх наступною ідентифікацією. Ці середовища є елективними для багатьох представників родини кишкових бактерій. Випускаються вони у сухому вигляді, тому їх приготування в лабораторіях не потребує багато часу.

Середовище Ендо складається з сухого живильного агару, 1 % лактози та індикатора фуксину, знебарвленого розчином сульфату натрію. Свіже середовище має слабе рожеве забарвлення. При рості лактозопозитивних мікроорганізмів, тих, що розщеплюють лактозу (*E. coli*), їх колонії забарвлюються у темно-червоний колір з металевим блиском. Колонії лактозонегативних мікробів (сальмонели, шигели) на цьому середовищі безбарвні.

До складу середовища Левіна також входить МПА, лактоза, однозаміщений фосфат калію, індикатори метиленовий синій, еозин. Нативне середовище має фіолетовий колір. Колонії лактозопозитивних бактерій мають темно-синє забарвлення, а лактозонегативні – рожевий відтінок.

Сухий бактоагар Плоскирева (Бактоагар Ж) містить у складі агар із солями жовчних кислот лактозу, цитрат натрію, гіпосульфід, фосфат натрію, брильянтовий зелений, соду кальциновану, йод і нейтральний червоний. Мікроорганізми, що розщеплюють лактозу, утворюють колонії рожевого кольору, а ті, що її не ферментують – безбарвні.

У мікробіологічній практиці часто виникає потреба дослідити ферментацію не тільки одного, а декількох цукрів відразу. З цією метою використовують середовища Гісса. Вони можуть мати рідку та напіврідку консистенцію.

Основою рідкого середовища є 1 % пептонна вода з 0,5 % натрію хлориду, 1 % вуглеводів (глюкози, мальтози, лактози, сахарози, манніту та ін.). До нього

додають індикатор Андресе (кислий фуксин в 1 н розчині NaOH). Встановлюють рН 7,2, при ньому середовище має жовтий колір. Середовища з різними вуглеводами розливають в окремі пробірки, в які встановлюють поплавок – запаяну з одного кінця скляну трубочку довжиною 3 см відкритим кінцем донизу. Стерилізують парою під тиском 0,5 атм 15 хв.

Після посіву бактерій, якщо вони ферментують вуглеводи, спостерігають появу червоного забарвлення, яке свідчить про зміну рН у кислую сторону (утворення кислоти), а деколи з поплавка витісняється рідина. Тоді роблять висновок про утворення газу. Отже, можливі три варіанти при обліку результатів посіву на середовище Гісса: мікроорганізми не ферментують субстрату (негативна відповідь) або бактерії розкладають вуглеводи (позитивна відповідь) з утворенням кислоти без газу чи кислоти і газу.

Враховуючи, що мікроорганізми по-різному діють на вуглеводи (розкладають або не розкладають), при кінцевому обліку результатів спостерігають пробірки із зміненним або незмінним кольором рідини. Це створює враження строкатості, а такий ряд називають строкатим рядом Гісса.

Зараз у більшості випадків користуються набором сухих середовищ для визначення цукролітичних ферментів, з яких готують напіврідкі строкаті ряди. На відміну від попередньої групи, до їх складу входять індикатори ВР (суміш водного голубого з розоловою кислотою) або бромтимоловий синій чи бромкрезоловий пурпурний. При наявності газу спостерігаються бульбашки або розриви живильного середовища у товщі агару. При підкисленні середовища з індикатором ВР воно стає синім, а при підлужнюванні – червоним (бромкрезоловий пурпурний при утворенні кислоти дає дещо фіолетове та лимонно-жовте забарвлення, а бромтимоловий синій – зеленкувате або лимонне). У лужному середовищі вони мають відповідно інтенсивно фіолетовий та синій колір із зеленкуватим полиском.

Випускаються також сухі середовища Рессела та цукровий агар із сечовиною Олькеницького.

Середовище Рессела є напіврідким агаром із лактозою (1 %) і глюкозою (0,1 %) та індикатором ВР. Після розливання його у пробірки їх кладуть так, щоб утворився стовпчик агару і була скошена поверхня. Мікроорганізми засівають петлею спочатку уколом у стовпчик, а потім по скошеній поверхні. Якщо бактерії ферментують лактозу і глюкозу, спостерігають зміну кольору (підкислення) всього середовища на синій. Якщо мікроби здатні метаболізувати тільки глюкозу, в цьому випадку змінює колір стовпчик середовища. За умови утворення газу спостерігають за появою його бульбашок або розривами агару.

Трицукровий агар із сечовиною Олькеницького – більш складне середовище порівняно з попереднім. Він дозволяє визначити ферментацію лактози, сахарози, глюкози, утворення сірководню та наявність у бактерій ферменту уреазі. До складу середовища відповідно вводять сухий живильний агар, лактозу, сахарозу, глюкозу, комплексну сіль амоній-залізо сульфат, тіосульфат натрію, сечовину, індикатор феноловий червоний. Готове середовище має блідо-рожевий колір.

При розщепленні цукрів феноловий червоний забарвлює середовище в жовтий колір. Оскільки глюкоза наявна в невеликих концентраціях (0,1 %), в аероб-

них умовах (скошена поверхня) бактерії повністю утилізують її за перші години росту. Через 18-24 год вони споживають і пептони як білкову живильну основу. При цьому утворюється аміак, який робить середовище лужним, надаючи йому червоного кольору. Однак у стовпчику агару жовтий колір залишається, тому що там зберігаються кислі кінцеві продукти, які забезпечують низький рівень рН.

Ентеробактерії, які розкладають лактозу й глюкозу, підкислюють середовище в усій пробірці (жовтий колір стовпчика та скошеної поверхні). Оскільки лактози (1 %) в 10 разів більше, ніж глюкози, через 18-24 год інкубації її запаси ще невичерпані, тому зберігається жовтий колір середовища. Однак через 48 год за рахунок розщеплення пептонів можна спостерігати за його почервонінням (зсув рН у лужну сторону).

Якщо бактерії утворюють газ (вуглекислий, водень) при ферментації цукрів, з'являються розриви середовища або відбувається скупчення газу на дні, що піднімає агар у пробірці.

Сірководень мікроби утворюють з неорганічних сполук, завдячуючи ферменту тіосульфатредуктазі. Взаємодіють із сірководнем солі заліза, які, вступаючи з ним у реакцію, утворюють сульфід заліза у вигляді нерозчинного преципітату чорного кольору в стовпчику.

Уреаза, яку продукують бактерії, руйнує сечовину з виділенням великої кількості аміаку, під впливом якого все середовище червоніє. Тому при наявності уреазопозитивних штамів провести облік ферментації цукрів неможливо. В таких випадках необхідно використовувати інші середовища.

За останні роки в практиці мікробіологічних лабораторій почали використовувати спеціальні тест-системи для визначення різноманітних властивостей бактерій: "Roche", "API", "Enterotest", пластини та диски індикаторні біохімічні. Вони зручні для користування, надійні, дозволяють визначати 12-20 і більше різноманітних ознак, значно полегшити ідентифікацію мікробів (див. вкл., рис. 7).

Гемолітична активність мікроорганізмів є однією з найсуттєвіших ознак їх вірулентності, тому її визначення стало рутинною процедурою будь-якої спеціалізованої лабораторії. З цією метою використовують кров'яний МПА. Його готують з розтопленого та охолодженого до 45-50 °С живильного агару, до якого додають 5-10 % дефібринованої або свіжої крові тварини (барана або кролика). Агар з кров'ю ретельно перемішують, не допускаючи утворення піни, і розливають у чашки Петрі. Якщо бактерії продукують гемолізину, навколо колоній або штрихів посіву утворюються зони просвітління на матовому червоному фоні (див. вкл., рис. 8). За кольором гемолізу (безбарвний, зеленкуватий) можна визначити тип гемолізину (α , β , γ тощо).

Щоб виявити ліполітичні властивості мікробів, до складу живильних середовищ вводять ліпіди або жироподібні субстанції – твіни. Бактерії за таких умов утворюють райдужні вінчики навколо колоній при розщепленні ліпідів.

Редукуючі властивості вивчають, додаючи до складу середовищ барвники (метиленовий синій, наприклад), які здатні відновлюватись. Фіксуючи час зміни кольору індикатора, можна судити про ступінь вираження редукуючої активності.

Декарбоксилазну активність бактерій оцінюють на спеціальних середовищах з амінокислотами (лізином, орнітином, глютаміновою кислотою та ін.) і відповідними індикаторами.

З метою встановлення видової належності бактерій часто вивчають їх антигенну будову, тобто проводять ідентифікацію за антигенними властивостями. Кожний мікроорганізм має у своєму складі різні антигенні субстанції. Зокрема, представники родини ентеробактерій (ешеріхії, сальмонели, шигели) містять оболонковий О-антиген, джгутиковий Н-антиген і капсульний К-антиген. Вони неоднорідні за своїм хімічним складом, тому існують у багатьох варіантах. Їх можна визначити за допомогою специфічних аглютинуючих сироваток. Таке визначення виду бактерій носить назву *серологічної ідентифікації*. Його відносять до одного з головних методів встановлення виду виділеної культури. Найчастіше використовується орієнтовна реакція аглютинації на склі. З цією метою на предметне скельце наносять різні діагностичні сироватки (проти окремих збудників або їх антигенів), а потім у кожную краплю вносять стерильною петлею невелику кількість чистої культури. За декілька хвилин спостерігають за феноменом аглютинації. Утворення аглютинату (пластівців) свідчить про гомологічність антигенів збудника та антигін діагностичної сироватки, що дозволяє визначити вид інфекційного агента. При наявності позитивної орієнтовної реакції аглютинації її ставлять у розгорнутому варіанті (реакція аглютинації Грубера).

При деяких інфекційних захворюваннях (дифтерія) ідентифікацію проводять за токсигенними властивостями мікробів. Метод ґрунтується на визначенні токсигенної активності коринебактерій дифтерії за допомогою реакції преципітації. Утворення ліній преципітації між колоніями токсигенних штамів та папірцем, просоченим антитоксичною сироваткою, свідчить про позитивну реакцію.

Інколи ідентифікацію бактерій проводять, заражаючи лабораторних тварин чистою культурою і спостерігаючи за тими змінами, які викликають збудники в організмі (туберкульоз, ботулізм, правець, сальмонельоз тощо). Такий метод називають ідентифікацією за біологічними властивостями. Як об'єкти – найчастіше використовують гвінейських свинок, білих мишей і щурів.

Дуже важливим при виділенні мікроорганізмів є визначення їх чутливості до антибіотиків з метою вибору оптимального препарату для лікування. Найчастіше користуються методом стандартних дисків (метод дифузії в агар, диско-дифузійний метод). Для цього на поверхню спеціального щільного живильного середовища в чашках Петрі засівають культуру мікроорганізмів і накладають паперові диски, просочені різними антибіотиками. Посіви інкубують при оптимальній температурі 18-24 °C і вимірюють зони затримки росту бактерій навколо дисків з антибіотиками. За розмірами цих зон визначають належність бактерій до чутливих, помірно резистентних або стійких штамів.

На підставі вивчення морфологічних, культуральних, біохімічних, антигенних, біологічних та інших властивостей мікробів роблять остаточний висновок про ідентифікацію. Наприклад: “Виділено *Escherichia coli*” або “Виділений збудник належить до виду *Staphylococcus epidermidis*”.

Виділення чистої культури анаеробних бактерій

У лабораторній практиці часто доводиться працювати з анаеробними мікроорганізмами. Вони більш вибагливі до живильних середовищ, ніж аероби, частіше потребують спеціальних ростових добавок, вимагають припинення доступу кисню при їх культивуванні, тривалість росту їх довші. Тому робота з ними складніша, вимагає значної уваги бактеріологів і лаборантів.

Важливим є захист матеріалу, що містить анаеробні збудники від токсичного впливу атмосферного кисню. Тому матеріал із вогнищ гнійної інфекції рекомендується забирати під час їх пункції за допомогою шприца, час між взяттям матеріалу та посівом його на живильне середовище повинен бути максимально коротким.

Оскільки для культивування анаеробних бактерій використовують спеціальні живильні середовища, які не повинні містити кисню і мають низький окисно-відновний потенціал (-20 -150 мВ), до їх складу вводять індикатори – резазурин, метиленовий синій тощо, які реагують на зміну цього потенціалу. При його зростанні відновлені безбарвні форми індикаторів змінюють свій колір: резазурин забарвлює середовище в рожевий колір, а метиленовий синій – в голубий. Такі зміни свідчать про неможливість використання середовищ для культивування анаеробних мікробів.

Сприяє зниженню окисно-відновного потенціалу введення в середовище не менше 0,05 % агару, який, збільшуючи його в'язкість, сприяє зменшенню надходження кисню. Це, в свою чергу, досягається ще й використанням свіжих (не пізніше двох годин після виготовлення) і редукованих живильних середовищ.

Слід врахувати, що через особливості бродильного типу метаболізму анаеробних бактерій вони вимагають багатших на живильні компоненти і вітаміни середовищ. Найчастіше використовують серцево-мозковий й печінковий настої, соєві та дріжджові екстракти, гідролітичний перевар казеїну, пептон, триптон. Обов'язковим є додавання факторів росту, таких як твін-80, гемін, менадїон, цільна або гемолізована кров.

Методи створення анаеробних умов. Враховуючи, що вільний молекулярний кисень є токсичним для облигатно-анаеробних бактерій, обов'язковою умовою культивування таких мікроорганізмів є обмеження його доступу. Існує ряд методів (механічних, фізичних, біологічних), які дозволяють це забезпечити.

Фізичні методи. 1. Перед посівом бактерій на живильне середовище його обов'язково регенерують для видалення надлишку розчиненого кисню. З цією метою середовище кип'ятять протягом 15-20 хв на водяній бані, а потім швидко охолоджують до необхідної температури.

2. Для попередження проникнення кисню в середовище його заливають шаром стерильної вазелінової олії або парафіном.

3. Стовпчик живильного середовища у пробірках повинен бути достатньо високим (10-12 см). Кисень, як правило, дифундує в товщу стовпчика на глибину до 2 см, тому нижче створюються сприятливі умови для культивування анаеробних мікробів.

4. Евакуаційно-замісний метод полягає у використанні анаеростатів. Вони представляють собою герметичні металеві або пластмасові банки, з яких можна викачати кисень і замінити його інертним газом (гелій, азот, аргон). Допускається використання трикомпонентної газової суміші, яка складається з 80 % азоту, 10 % диоксиду вуглецю та 10 % водню. Деколи допустимим вважається використання природного газу. Для поглинання кисню, який залишається в анаеростаті, використовують паладієві каталізатори. З метою поглинання водяної пари використовують хлорид кальцію, силікагель тощо, які поміщають на дно анаеростата.

Хімічні методи. 1. Використання речовин, здатних поглинати кисень. З цією метою допустимим є застосування лужного розчину пірогалолу. При цьому враховують поглинаючу активність речовини: на 100 мл ємності герметичної посудини, в якій знаходяться чашки Петрі, використовують 1 г пірогалолу і 10 мл 2,5 N розчину гідроксиду натрію.

Киснезв'язуючий ефект має також гідросульфід натрію ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$). Для зв'язування кисню в 1 л повітря використовують суміш, яка складається з 100 мл свіжого 20 % розчину $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ і 16 мл 50 % гідроксиду калію.

2. Застосування речовин-редуцентів. Враховуючи, що ріст облигатно-анаеробних бактерій відбувається в середовищах з низьким рівнем окисно-відновного потенціалу, до них додаються спеціальні відновлювачі: цистеїн (0,03-0,05 %), тіогліколеву кислоту або тіогліколат натрію (0,01-0,02 %), сульфід натрію, аскорбінову кислоту (0,1 %), різноманітні цукри.

Функції відновлювачів можуть виконувати шматочки паренхіматозних органів тварин (печінка, нирки, серце) або навіть рослин (картопля, інші коренеплоди).

Ступінь поглинання кисню або ступінь відновлення середовища вимірюють або електрометрично або за допомогою індикаторів (резазурин, нейтральний червоний, феносафранін).

3. Використання спеціальних газогенеруючих систем, які дозволяють створити безкисневі умови в мікроанаеростатах, транспортних пластикових пакетах тощо. Однією з найпоширеніших є система "Gas Generating Box". До її складу входять хімічні генератори водню (борогідрит натрію) та вуглекислого газу (таблетки бікарбонату натрію та лимонної кислоти), а також паладієвий каталізатор, який поглинає кисень.

Чашки з посівами поміщаються в мікроанаеростат, на дні якого знаходиться шар паладієвого каталізатору. Кінчик пакета "Gas Generating Box" надрізають ножицями, і в нього наливають 10-15 мл води. Пакет розташовують у мікроанаеростаті. Через 15-20 хв у ньому створюються анаеробні умови. Водень, який виділяється, взаємодіє з киснем, утворюючи воду, а вуглекислота продукується при взаємодії бікарбонату натрію з лимонною кислотою.

Біологічні методи. 1. Метод Фортнера. Метод полягає в спільному культивування на одному середовищі аеробних і анаеробних мікроорганізмів. Спочатку по діаметру чашки вирізають полоску агару шириною до 0,5-1,0 см. З одного боку засівають досліджуваній метралі, що містить анаеробні збудники, а з іншого – мікроби, що є індикатором анаеробних умов (*Serratia marcescens* або "чудесна па-

личка”). Краї чашки парафінують або закривають пластиліном. За деякий час на поверхні середовища виростають колонії як аеробних, так і анаеробних мікробів. При поглинанні кисню *Serratia marcescens* дає ріст блідо-рожевих або безбарвних колоній, а при порушеннях герметичності – яскраво-червоні. На іншій половині чашки виростають колонії анаеробних мікробів.

2. Метод Хеннеля (“годинникових скелець”). Він є своєрідною модифікацією попереднього. Матеріал, що містить анаеробні збудники, засівається на поверхню живильного середовища діаметром 2-2,5 см. Зверху він покривається “годинниковим склом”, заповненим шаром МПА і засіяним *Serratia marcescens*. Аеробні мікроби, поглинаючи кисень, створюють умови для сприятливого росту анаеробних збудників.

У високо спеціалізованих лабораторіях користуються спеціальною анаеробною технікою, яка включає використання живильних середовищ без кисню із відновлювачами, виконання посівів і пересівів в атмосфері інертних газів, вуглекислоти тощо.

За останні роки створено стаціонарні анаеробні бокси, які містять все необхідне для створення анаеробних умов культивування, включаючи термостати. Як правило, такі камери заповнюються трикомпонентною газовою сумішшю. Бактеріолог працює в камері, перебуваючи зовні, застосовуючи гумові рукавиці, вмонтовані в неї. Таке устаткування має незаперечні переваги, які полягають у тому, що повністю виключається контакт кисню з досліджуванним матеріалом.

Виділення та ідентифікація анаеробних мікроорганізмів

Враховуючи сучасний розвиток мікробіологічної науки, виділяти та ідентифікувати культури анаеробних мікроорганізмів можна аналогічно аеробним бактеріям. Обов’язковим при цьому є дотримання на всіх етапах дослідження умов анаеробіозу, використовуючи для цього трикомпонентну газову суміш (у певному співвідношенні азот, водень та вуглекислий газ) чи систему “Gas Generating Box”.

Однак збудники правця, ботулізму, газової анаеробної інфекції можна виділяти та ідентифікувати за іншою схемою.

На **першому етапі** (1 день дослідження) вивчають макроскопічні особливості клінічного матеріалу, роблять мазок і забарвлюють його за методом Грама. Після цього матеріал засівають на середовище Кітта-Тароцці та молоко. Попередньо середовище регенерують на киплячій водяній бані протягом 10-20 хв і охолоджують. Безпосередньо після посіву матеріалу середовище нагрівають на водяній бані при 80°C протягом 20 хв для знищення вегетативних неспорівих форм мікробів. Середовища ставлять у термостат і при температурі 37 °C культивують 1-3 доби.

На **другому етапі** вивчають прояви росту мікроорганізмів (помутніння, утворення осаду та газу на середовищі Кітта-Тароцці, пептонізація молока). Оскільки середовище Кітта-Тароцці зверху залите шаром вазелінової олії для запобігання доступу кисню, в нього занурюють пастерівську піпетку, набирають рідину, з якої готують мазок, фарбуючи його за методом Грама. Під мікроскопом у мазку можна бачити великі грампозитивні паличкоподібні бактерії. Після цього прово-

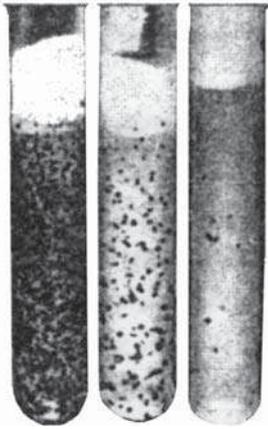


Рис. 23. Ізольовані за методом Вейнберга колонії анаеробів.

дять посів матеріалу за методами Вейнберга або Цейсслера для одержання ізольованих колоній.

За **методом Вейнберга** готують декілька вузьких високих пробірок (3-4) з розтопленим і охолодженим до 42-45 °С цукровим м'ясо-пептонним агаром. Можливе використання середовища Вільсон-Блера. Матеріал із середовища Кітта-Тароцці вносять у першу пробірку за допомогою пастерівської піпетки й ретельно перемішують, потім переносять у другу, а далі – в третю. Для застигання агару їх швидко охолоджують під струменем холодної водопровідної води. За рахунок цього живі мікробні клітини фіксуються в певних ділянках агару. Після застигання агару пробірки культивують при оптимальній температурі протягом 1-2 діб для утворення ізольованих колоній (рис. 23).

Вміст кожної пробірки можна, крім того, всмоктати у пастерівські піпетки або трубки Віньяль-Вейона, стежачи, щоб не було бульбашок повітря. Останні мають довжину біля 30 см і діаметр 0,5-0,6 см. Верхній кінець їх, який закривається ватою, має перетяжку, а нижній витягнутий у вигляді капіляра. Після заповнення піпетки її витягнутий кінець запаюють і кладуть у термостат для культивування. Через 1-2 доби в агарі виростають колонії анаеробних бактерій. Для того щоб їх ізольовати, трубку надрізають напилем на певному рівні, розламують, колонію беруть бактеріальною петлею або голкою, переносять у відповідне середовище.

Для виділення ізольованих колоній за **методом Цейсслера** матеріал із середовища Кітта-Тароцці або молока наносять петлею або 1-2 краплі пастерівською піпеткою на чашку Петрі з цукрово-кров'яним агаром і роблять посів шпателем за методом Дригальського. Не стерилізуючи шпатель, засівають другу чашку, а потім і третю. Чашки перевертають догори дном, підписують, ставлять в анаеростат, в якому створюють анаеробні умови, а потім – у термостат при температурі 37 °С на 2-3 доби. На останній чашці виростають ізольовані колонії.

Третій етап дослідження починається з вивчення морфологічних особливостей колоній, які виростили в чашках Петрі або трубках Віньяль-Вейона. Досліджуються їх форма, величина, колір, характер країв, рельєф колонії, консистенція тощо. З колоній готують мазки, фарбують їх за методом Грама. Після цього колонії відсівають у середовище Кітта-Тароцці для одержання чистої культури. Посіви інкубують певний час при оптимальній температурі.

На **четвертому етапі** звертають увагу на особливості росту чистої культури збудників на відповідних середовищах, перевіряють її на чистоту і проводять ідентифікацію. Ідентифікують виділені чисті культури анаеробних мікроорганізмів подібно до аеробних за морфологічними, культуральними, біохімічними та біологічними ознаками. Обов'язково використовують визначення токсигенних властивостей збудників у біологічній пробі та реакції нейтралізації на лаборатор-

них тваринах. У деяких випадках визначають антигенні властивості мікроорганізмів.

Таким чином, на підставі вивчення різноманітних властивостей мікроорганізмів робиться висновок про належність їх до того чи іншого виду.

Середовища для культивування анаеробних мікроорганізмів

Середовище Кітта-Тароцці готують на основі бульйону Хоттінгера, до якого додають шматочки бичачої печінки або мяса. Стерилізують його при 1 атмосфері протягом 30 хв. Активна реакція середовища – 7,4-7,6. Після посіву матеріалу середовище заливають зверху шаром вазелінової олії товщиною до 1 см.

Анаеробний кров'яний агар готують на основі еритрит-агару. До його складу входять також спеціальні добавки: середовище 199 (10 %), гемін (10 мкг/мл), твін-80 (0,1 %), метадіон (10 мкг/мл), цитратна кров (до 5 %) тощо. Після стерилізації його розливають у чашки Петрі. Використовують не пізніше, як через 2 год після виготовлення.

Жовтковий агар. У розтоплене і охолоджене до 56-60 °С середовище на основі еритрит-агару додають суспензію курячого жовтка (20 %), глюкозу (0,2 %), гемін (10 мкг/мл) і розливають у чашки Петрі. Середовище використовують для визначення лецитиназної активності збудників, зокрема *C. perfringens*. При наявності лецитинази навколо колоній утворюються зони помутніння.

Комерційне середовище для контролю стерильності. Його можна використовувати як транспортне. Для поліпшення росту анаеробних бактерій до його складу можна вводити спеціальні добавки, такі як середовище 199, гемін, твін-80, метадіон, цитратна кров тощо.

Середовище Вільсон-Блера. Його готують на основі розтопленого й охолодженого до 60 °С 1 % цукрового (глюкоза) МПА рН 7,4 з додаванням на 100 мл 10 мл стерильного 20 % розчину сульфату натрію і 1 мл 8 % розчину хлориду заліза. Готове середовище не стерилізують.

Його використовують для прискореної діагностики газової анаеробної інфекції, викликаной *Clostridium perfringens*. Вже через 1-2 год спостерігають зміну середовища: воно чорніє внаслідок відновлення сульфату натрію в сульфат, який взаємодіє з хлоридом заліза, утворюючи сульфід заліза. З'являються також розриви агару внаслідок інтенсивного газоутворення.

Лакмусове молоко. Готують середовище із свіжого молока. Попередньо його кип'ятять і залишають у прохолодному місці на одну добу. Знімають верхній шар жиру і процедуру повторюють. Молоко фільтрують, і 10 % розчином бікарбонату натрію доводять рН до 7,2. Перед стерилізацією до молока додають 5-10 % лакмусової настойки та ідентичну кількість 10 % розчину бікарбонату натрію, щоб піна молока набула синьо-фіолетового відтінку. При підлужуванні молока воно стає синьо-фіолетовим, при підкислюванні – рожевим аж до червоного.

Ідентифікація мікроорганізмів за допомогою бактеріофагів

Бактеріофаги мають виражену літичну дію на мікроорганізми. Цю особливість використовують для визначення їх виду. З цією метою у дві пробірки з м'ясо-

пептонним бульйоном засівають досліджувану культуру бактерій. Потім в одну з них додають декілька крапель індикаторного фага. Пробірки інкубують при оптимальній температурі протягом 18-24 год. Порівнюють мутність бульйону в контрольній та дослідній пробірці і роблять висновок про чутливість мікроорганізмів до літичної дії бактеріофагів.

Можна з цією метою використати щільне живильне середовище, на яке газом засівають досліджувану культуру бактерій. Після підсушування чашок на них бактеріологічною петлею або пастерівською піпеткою наносять краплю відповідного розведення бактеріофагу, яке вказане на ампулі. Посіви інкубують в термостаті при 37 °С протягом 18-24 год і фіксують наявність прозорих круглих плям, які свідчать про літичну дію бактеріофагу. Позитивний результат свідчить про належність бактерій до певного виду.

Фаготипування мікроорганізмів проводять з метою аналізу епідеміологічної ситуації для визначення джерела інфекції. Найчастіше його виконують при діагностиці стафілококових, кишкових та інших інфекцій.

В основі тесту лежить визначення фаговаріантів (фаговарів) збудників. Для цього дно чашки з м'ясо-пептонним агаром за числом бактеріофагів поділяють на квадрати. Вирощують чотиригодинну бульйонну культуру досліджуваного штаму і 1 мл її засівають на поверхню середовища. Розподіляють рівномірно культуру по поверхні середовища і надлишок її зливають. Чашку підсушують у термостаті при 37 °С протягом 30-40 хв і на поверхню агару в кожний квадрат капають піпеткою бактеріофаги відповідних розведень. Посіви ставлять у термостат або залишають при кімнатній температурі протягом 18-20 год, після чого оцінюють результати. Облік результатів проводять на темному фоні за допомогою лупи. Залежно від ступеня чутливості культури до бактеріофагів виділяють різні ступені лізису бактерій, який оцінюється за чотириплюсовою системою: від лізису, який зливається до його відсутності.

Враховуючи, що чутливість бактерій до фагу є достатньо постійною ознакою, порівнюють фаготипи досліджуваних культур з фаготипом мікробів, який було виділено від вірогідного джерела інфекції. При їх збігу роблять висновок про виявлене джерело інфекції.

Визначення бактеріоциногенності мікроорганізмів

Бактеріоцини є речовинами антибіотичної природи, які продукуються різними бактеріями. Вони мають досить вузький спектр протимікробної дії, спрямований проти філогенетично близьких збудників. Цей тест використовують з епідеміологічною метою для виявлення джерела інфекції, а також для ідентифікації певних груп бактерій.

Для визначення бактеріоциноварів на поверхню агару в чашці Петрі у вигляді смужки по діаметру засівають бактеріологічною петлею культуру збудника. Чашку інкубують у термостаті при оптимальній температурі протягом 24-48 год, потім мікроорганізми вбивають за допомогою УФВ або парів хлороформу. Культуру обережно знімають з поверхні агару за допомогою шліфувального скла, і до

неї перпендикулярно штрихами бактеріологічною петлею підсівають 4-годинні бульйонні культури індикаторних штамів. Після 18-24-годинної інкубації при оптимальній температурі оцінюють чутливість індикаторних штамів до бактеріоцинів за величиною зон затримки росту. Такий підхід дозволяє визначити бактеріоцинотип досліджуваних мікроорганізмів.

Для визначення чутливості досліджуваного штаму до певних бактеріоцинів у щільне живильне середовище уколom засівають індикаторні бактерії, які продукують певні типи бактеріоцинів. Після інкубування в термостаті мікроби, які виростили, інактивують за допомогою парів хлороформу або ультрафіолетового опромінення. Потім на поверхню чашки заливають розтоплений і охолоджений до 45°C МПА, змішаний з 0,2 мл 4-годинної бульйонної культури досліджуваного штаму. Після того, як агар застигне, чашку знову поміщають у термостат і інкубують при оптимальній температурі протягом доби. За діаметрами зон затримки росту культури оцінюють чутливість її до бактеріоцинів.

Молекулярно-генетичні методи

Для виявлення та ідентифікації бактерій, вірусів, грибів і найпростіших останнім часом почали широко використовувати молекулярно-генетичні методи.

Реакція гібридизації ДНК і РНК (реакція генних зондів). Послідовність нуклеотидів ДНК і РНК є унікальною для геномів всіх мікроорганізмів. Будь-яку ділянку нуклеїнової кислоти можна визначити за допомогою комплементарної копії ДНК чи РНК, міченої ферментом або радіоактивною міткою (ДНК- і РНК-зонди). Такі зонди отримані для більшості патогенних бактерій і вірусів. За їх допомогою проводять ідентифікацію ДНК або РНК збудників бактеріальних і вірусних інфекцій у клінічному матеріалі. Реакція молекулярної гібридизації є дуже чутливою і високоспецифічною. Вона дає змогу виявляти ДНК або РНК в дуже малих кількостях (1-10 пг).

Методика реакції генних зондів зводиться до того, що виділені з патологічного матеріалу ДНК або РНК збудників денатурують і наносять на спеціальні мембрани з нітроцелюлози. Після чого вносять ДНК- або РНК-зонди, витримують певний час, роблять багаторазову промивку, щоб видалити реагенти, що не прореагували. Якщо використовували зонди з радіоактивною міткою, результат визначають за допомогою γ -лічильника. У випадку, коли зонд мічений ферментом (наприклад, пероксидазою), то до такого зонда додають субстрат (наприклад, ортофенілдіамін). Ферментація субстрату призводить до зміни кольору, який можна спостерігати неозброєним оком.

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) – один із найновіших методів виявлення та ідентифікації бактерій і вірусів у досліджуваних матеріалах. Принцип реакції базується на багаточисленному копіюванні (селективній ампліфікації) досліджуваної ДНК ферментом ДНК-полімеразою. Утворені копії ДНК ідентифікують за допомогою методу електрофорезу.

Реакцію проводять в три етапи. На першому етапі при температурі 95°C проходить денатурація двониткової молекули ДНК, її розплетення і розходження ниток.

На другому етапі (ренатурація) відбувається гібридизація праймерів, тобто утворення дволанцюгових комплексів праймер-матриці, які необхідні для ініціювання синтезу ДНК. Температура суміші при цьому знижується до 55 °С.

На етапі синтезу (75 °С) проходить подовження комплементарних ниток ДНК за допомогою ферменту ДНК-полімерази. Проводять 15-35 циклів синтезу.

Багаторазове повторення приводить до збагачення ДНК у досліджуваному матеріалі.

Метод ПЛР дуже чутливий. Його використовують для виявлення будь-якого інфекційного агента, якщо відома нуклеотидна послідовність гена (або його фрагмента), специфічного виключно до даного збудника. Доцільно використовувати ПЛР у тих випадках, коли бактерії чи віруси мають високу мінливість і знаходяться у досліджуваному матеріалі в малій кількості (навіть одна молекула геномної ДНК).

Зараз ПЛР належить до високоефективного молекулярно-генетичного методу, який доступний багатьом лабораторіям. Тривалість дослідження становить 2-3 години. Особливо доцільно використовувати його при визначенні та ідентифікації збудників туберкульозу, сифілісу, гонореї, мікоплази, вірусів СНІДу, герпесів, гепатитів, рота- та ентеровірусів.

Розділ 5

ЕКОЛОГІЯ МІКРООРГАНІЗМІВ

Живий мікросвіт людини і нашого довкілля зазнав великих змін. Продовжується інтенсивна мікробна корозія землі, колонізація різних об'єктів зовнішнього середовища й харчових продуктів зміненими бактеріями, грибами, вірусами. З року в рік зростають носійство патогенних бактерій серед медичного персоналу та різноманітні дисбактеріози відносно здорових і хворих людей. Все частіше виникають шпитальні інфекції, спричинені патогенними й умовно-патогенними мікроорганізмами. Все це вимагає розробки нових і вдосконалення існуючих методів лабораторного дослідження мікрофлори води, повітря, ґрунту, інших об'єктів оточуючого середовища, харчових продуктів. Важливого значення набуває визначення дисбактеріозів людини, носійства золотистих стафілококів, менінгококів, збудників дифтерії, холери, черевного тифу, дизентерії. Лікар будь-якого профілю повинен знати, як правильно взяти досліджуваний матеріал, доставити його до профільної лабораторії, провести мікробіологічне дослідження, правильно оцінювати його результати.

Мікробіологічне дослідження води

Мета проведення санітарно-мікробіологічного дослідження води може бути різною:

1. Вибір джерела водопостачання.

2. Контроль знезараження питної води центрального водопостачання.
3. Визначення придатності для вживання криничної й джерельної води.
4. Перевірка якості і ступеня очищення стічних вод.
5. Розслідування водних спалахів інфекційних хвороб.
6. Контроль знезараження води плавальних басейнів.
7. Спостереження за санітарно-епідеміологічним станом відкритих водоймищ.

Санітарно-мікробіологічне дослідження води, перш за все, повинно вирішувати питання про наявність або відсутність у ній патогенних бактерій, вірусів і грибів. Але їх безпосереднє виявлення має ряд методичних труднощів. У зв'язку з цим широкого розповсюдження набули методи непрямой оцінки її епідеміологічного благополуччя шляхом виявлення так званих санітарно-показових мікроорганізмів і визначення загального мікробного числа (ЗМЧ).

Основним джерелом збудників заразних хвороб є люди й теплокровні тварини, які виділяють їх в оточуюче середовище фекальним або повітряно-краплинним шляхом разом з численними представниками нормальної мікрофлори кишечника й верхніх дихальних шляхів. Тому санітарно-показові мікроорганізми для різних об'єктів докільля відібрані саме з представників нормальної мікрофлори. Для води такими санітарно-показовими мікроорганізмами в усіх лабораторіях світу прийняті бактерії групи кишкової палички (БГКП).

До категорії БГКП належать бактерії родини *Enterobacteriaceae*, що об'єднує роди *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*. Це грамнегативні, безспоріві, оксидазо-негативні палички, які ферментують глюкозу і лактозу до кислоти й газу при 37 °С. Вони виділяються в зовнішнє середовище з випорожненнями людей і теплокровних тварин і є кількісним показником ступеня фекального забруднення води. Тому чим більше її фекальне забруднення, тим вища ймовірність контамінації води відповідними патогенними мікроорганізмами.

Серед БГКП окремо виділяють групу коліформних бактерій, а в ній – фекальні кишкові палички (ФКП), які розкладають лактозу при 44,5 °С. До *E. coli* відносять бактерії, що не ростуть на цитратному агарі. Саме вони є показником свіжого фекального забруднення. Для його визначення можна використати *S. faecalis*, який порівняно швидко гине в оточуючому середовищі.

При повноцінному санітарно-мікробіологічному дослідженні води визначають ЗМЧ, БГКП, *E. coli*, ентерококи, стафілококи, патогенні мікроорганізми (холерні вібріони, сальмонели, шигели, лептоспіри, ентеровіруси та ін.).

Взяття проб води. Для проведення мікробіологічного аналізу відбирають 500 см³ води у стерильні флакони, закриті ватно-марлевою пробкою, покритою зверху паперовим ковпачком. Взяття проб з водопровідних кранів проводять після обпалювання їх спиртовим факелом і наступного випускання води протягом 10 хв. Проби хлорованої води беруть у флакони з дехлоратором (на 500 см³ води 2 см³ 1,5 % розчину гіпосульфату натрію, простерилізованого в автоклаві).

Якщо дослідження проводять на виявлення не лише індикаторних, а й патогенних мікроорганізмів, потрібно брати пробу об'ємом 2500 см³ води. Коли визначають ще й індекс коліфагів об'єм проби збільшують до 3500 см³.

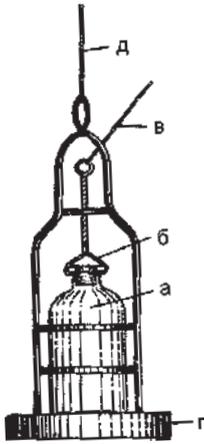


Рис. 24. Батометр:
а – стерильний флакон;
б – пробка;
в – шнур для відкриття флакона;
г – грузило;
д – шнур для опускання приладу.

У відкритих водоймах проби беруть за допомогою батометра. Цей прилад має металевий каркас із масивним дном-грузилом, всередині якого вміщують стерильний флакон, закритий гумовим або скляним притертим корком (рис. 24).

На потрібній глибині корок відкривають, потягнувши за шнур. Після заповнення флакона його відпускають, завдяки чому ємність автоматично закривається. Після виймання флакона з батометра притертий корок замінюють ватно-марлевою пробкою. Як правило, пробу води беруть на глибині 15 см, але не ближче як за 10-15 см від дна водойми.

На флакон із відібраною водою наклеюють етикетку, на якій вказують місце взяття проби, її номер, дату і час, температуру води й повітря, прізвище санітарного лікаря чи його помічника, мету дослідження й адресу лабораторії, яка буде проводити аналіз.

Мікробіологічне дослідження води необхідно провести не пізніше 2 год після її відбору. Якщо це неможливо, вказаний строк може бути продовжений до 6 год, але при умові транспортування проби при температурі 1-5 °С, що досягають за допомогою пакетів з теплою водою взимку і льоду – влітку. Після доставки проб до лабораторії негайно проводять дослідження, яке включає визначення загального мікробного числа в 1 см³ води, числа бактерій групи кишкових паличок у 1 дм³ (індекс БГКП), число термостабільних кишкових паличок (фекальних коліформ – індекс ФК) у 100 см³, число патогенних мікроорганізмів у 1 дм³, число коліфагів у 1 дм³ води, що досліджується.

Визначення загального мікробного числа води. Цей показник визначає кількість мезофільних, мезотрофних аеробів і факультативних анаеробів, які виростають на МПА при 37 °С протягом 24 год. Залежно від ступеня ймовірного бактерійного забруднення воду сіють із таким розрахунком, щоб на агарі в чашках виростало від 30 до 300 колоній. Звичайну водопровідну або артезіанську воду сіють у нерозведеному стані в об'ємі 1 см³. Проби з відкритих водойм, криниць, джерел і т.п. сіють після попереднього їх розведення від 10⁻¹ до 10⁻³ і більше (особливо стічних вод). Для цього в ряд пробірок наливають по 9 мл стерильної води, в першу з них вносять 1 см³ досліджуваної води, ретельно перемішують, із цієї пробірки переносять 1 см³ у другу, потім у третю і всі наступні по 1 см³ попереднього розведення. Для виготовлення кожного розведення необхідно брати нову стерильну піпетку.

Нерозведену або розведену воду в об'ємі 1 см³ вносять, рівномірно розкапуючи, на дно стерильної чашки Петрі, потім заливають її 10-12 см³ розтопленого й охолодженого до 45 °С м'ясо-пептонного агару. Обережними круговими рухами змішують воду з агаром. Як правило, сіють не менше двох розведень і для кожного з них використовують дві чашки. Після застигання середовища посіви вирощують у термостаті при 37 °С протягом 24 год. Через добу підраховують число коло-

ній у двох чашках і знаходять середнє арифметичне. При значній кількості колоній підрахунки проводять за допомогою спеціального приладу АПК (апарат для підрахунку колоній). Методика користування ним регламентована спеціальною інструкцією.

Відповідно до існуючих вимог звичайна водопровідна вода може містити не більше 100 мікробів. ЗМЧ відкритих водойм і криничної води не повинно перевищувати 1000.

Визначення кількості бактерій групи кишкових паличок. Цей показник (індекс БГКП) визначають за допомогою методу мембранних фільтрів і бродильних проб. Мікробіологічні лабораторії частіше використовують метод мембранних фільтрів. Він значно простіший і дає стабільні результати.

Метод мембранних фільтрів. Суть методу полягає в концентруванні бактерій з певного об'єму досліджуваної води на мембранний фільтр, вирощуванні на середовищі Ендо при 37 °С і підрахунку індексу БГКП в 1 дм³ води.

При аналізі водопровідної води необхідно фільтрувати не менш як 333 см³. При дослідженні води невідомої якості слід фільтрувати менші об'єми: наприклад, 3, 30, 100, 200 см³.

Промисловість випускає нітроцелюлозні мембранні фільтри під 6 номерами: чим менший номер, тим дрібніший діаметр пор. Для дослідження води використовують фільтри № 2 і № 3. Їх вміщують у підігріту до 80°С дистильовану воду і ставлять на слабкий вогонь до закипання. Кип'ятять тричі по 15 хв, кожного разу замінюючи воду. Після останнього кип'ятіння воду не зливають, фільтри залишають в ній до вживання.

Для фільтрування води використовують апарат Зейтца або прилад Рубльовської водопровідної станції (рис. 25).

Прилади обтирають ватним тампоном, змоченим у спирті, і фламбірують. Після охолодження їх монтують на колбі Бунзена. На нижню частину апарата (столік) кладуть стерильним пінцетом підготовлений мембранний фільтр, притискають його верхньою частиною приладу (стакан, воронка) і закріплюють пристроєм, передбаченим конструкцією. У воронку (стакан), дотримуючись правил асептики, наливають досліджуваний об'єм води й за допомогою масляного насоса створюють вакуум у колбі Бунзена. Після закінчення фільтрування знімають воронку (стакан), мембранний фільтр беруть обпаленим на вогні пінцетом і вміщують на середовище Ендо так, щоб між агаром і фільтром не було бульбашок повітря. В одній чашці Петрі можна розмістити 3-4 фільтри. Чашки з фільтрами на середовищі Ендо поміщають у термостат догори дном, інкубують при 37 °С протягом 18-24 год.

Облік результатів проводять через добу. При відсутності будь-яких колоній або при рості лише плівчастих,

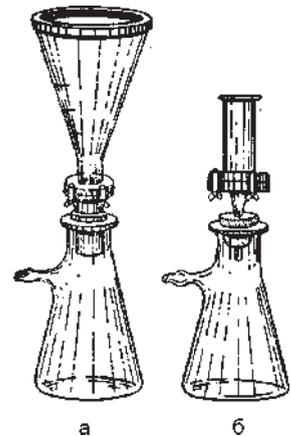


Рис. 25. Прилади для фільтрування води:
а – Рубльовської водопровідної станції;
б – апарат Зейтца.

зубчастих та інших колоній, не властивих для ешерихій, видають негативний результат. Якщо виростають типові для коліформних бактерій колонії, з них виготовляють мазки. У випадках виявлення грамнегативних паличок залишок колонії пересівають у глюкозо-пептонне середовище й при позитивній бродильній пробі присутність БГКП вважають доказаною. Дослідження закінчують постановкою проби на оксидазу. Для цього знімають фільтр і кладуть його колоніями на фільтрувальний папір, змочений реактивом на виявлення оксидазної активності. При наявності оксидази колонії забарвлюються у синій колір. Коліформні бактерії не утворюють оксидази.

Результат дослідження виражають у вигляді індексу БГКП, тобто кількості бактерій групи кишкових паличок у 1 дм³ води. Його вираховують так: кількість колоній БГКП, що вирости після посіву певної кількості води, множать на 1000 і ділять на даний об'єм води. Наприклад: при посіві 333 см³ води не виростало жодної колонії – $(1 \times 1000) : 333 = 3$, індекс БГКП менше 3; при посіві трьох об'ємів води по 100 см³ на одному фільтрі виростало три колонії коліформних бактерій, індекс БГКП = $(3 \times 1000) : 300 = 10$.

Питна вода відповідає вимогам стандарту, якщо індекс БГКП не перевищує 3.

Бродильний метод. Суть методу полягає в посіві певних об'ємів води й підросуванні при 37 °С у середовищі нагромадження з наступним висівом на агар Ендо, диференційованні бактерій, що вирости, та визначенні індексу БГКП за таблицями.

При дослідженні водопровідної води сіють три об'єми по 100 см³, три об'єми по 10 см³ і три об'єми по 1 см³. При аналізі на етапах очищення і знезараження засівають 100, 10, 1,0 і 0,1 см³ води. Вказані об'єми вносять у флакони й пробірки з глюкозо-пептонним або лактозо-пептонним середовищем із поплавками. Посіви 100 і 10 см³ води проводять у флакони й пробірки відповідно з 10 і 1,0 см³ концентрованого середовища (на 1000 см³ дистильованої води 100 г пептону, 50 г глюкози, 50 г хлориду натрію, 100 см³ індикатора Андреде). Проби по 1,0 і 0,1 см³ води сіють у пробірки, що містять 10 см³ середовища нормальної концентрації (на 1000 см³ дистильованої води 10 г пептону, 5 г глюкози, 5 г хлориду натрію, 10 см³ індикатора Андреде). Посіви інкубують 24 год при 37 °С.

Із кожного флакона чи пробірки, де відмічено помутніння, кислоту й газ, або помутніння й кислоту, роблять висів на середовище Ендо. При відсутності росту або при наявності плівчастих, губчастих пліснявих та інших колоній, не характерних для колоній *E. coli*, видають негативний результат. Якщо ж на середовищі Ендо виростають темно-червоні колонії з металевим блиском або без нього, їх належність до БГКП підтверджують за допомогою мікроскопії, посіву на середовище Олькеницького та проби на оксидазу. Наявність грамнегативних паличок у мазках і негативний оксидазний тест дають право негайно видати відповідь про наявність бактерій групи кишкових паличок.

Результат аналізу оцінюють у вигляді індексу БГКП і колі-титру за таблицями 5 і 6.

При виявленні мікробного забруднення вищедопустимих норм потрібно проводити повторний відбір проб і досліджувати їх на наявність термостабільних

Таблиця 5

Визначення індексу БГКП при посіві 333 см³ води

Кількість позитивних результатів аналізу води з:			Індекс БГКП (колі-індекс)	Колі-титр
трьох флаконів по 100 см ³	трьох пробірок по 10 см ³	трьох пробірок по 1 см ³		
0	0	0	< 3	> 333
0	0	1	3	333
0	1	0	3	333
1	0	0	4	250
1	0	1	7	143
1	1	0	7	143
1	1	1	11	91
1	2	0	11	91
2	0	0	9	111
2	0	1	14	72
2	1	0	15	67
2	1	1	20	50
2	2	0	21	48
2	2	1	28	36
3	0	0	23	43
3	0	1	39	26
3	0	2	64	16
3	1	0	43	23
3	1	1	75	13
3	1	2	120	8
3	2	0	93	11
3	2	1	150	7
3	2	2	210	5
3	3	0	240	4
3	3	1	460	2
3	3	2	1100	0,9
3	3	3	> 1100	> 0,9

Таблиця 6

Визначення індексу БГКП на етапах очищення

Об'єм досліджуваної води, см ³				Індекс БГКП (колі-індекс)	Колі-титр
100	10	1,0	0,1		
-	-	-	-	< 9	> 111
-	-	+	-	9	111
-	+	-	-	10	105
+	-	-	-	23	43
+	-	+	-	94	10
+	+	-	-	230	4
+	+	-	+	960	1
+	+	+	-	2380	0,4
+	+	+	+	> 2380	< 0,4

кишкових паличок (фекальних коліформ – ФК). Індекс ФК визначають у 100 см³ води як методом мембранних фільтрів, так і бродильними пробами.

Для цього через мембранний фільтр пропускають 100 см³ води й після інкубації при 37 °С типові темно-червоні колонії пересівають у лактозо-пептонне середовище з борною кислотою (3,2 г на 1 дм³). Засіяні пробірки інкубують 24 год при 43 °С. Наявність помутніння і газу вказує на присутність у воді бактерій – показників свіжого фекального забруднення. Ознаки росту (помутніння) без утворення газу до уваги не беруть.

Таким же способом визначають свіже фекальне забруднення й бродильним методом, пересіваючи темно-червоні колонії з агару Ендо в лактозо-пептонне середовище з інгібітором росту сторонньої мікрофлори.

При значному погіршенні санітарно-бактеріологічних показників води, а також при загрозовій епідеміологічній ситуації проводять дослідження води на виявлення патогенних мікроорганізмів. Методи таких аналізів викладені у відповідних розділах спеціальної мікробіології.

Дослідження на виявлення фагів кишкових паличок проводять у випадках, якщо індекси БГКП і ФК перевищують допустимі нормативи або підозрюють забруднення води патогенними ентеровірусами. Коліфаги відповідають вимогам, що пред'являються до санітарно-показових мікроорганізмів: їх розміри, будова, властивості, джерело надходження, терміни виживання такі ж як і у патогенних ентеровірусів. Окрім того, вони не шкідливі для людини.

При дослідженні на коліфаги найчастіше використовують метод агарових шарів. Напередодні аналізу в стерильні чашки Петрі розливають по 25-30 см³ 1,5 % МПА, підсушують під листками стерильного паперу протягом 60 хв, потім закривають кришками й залишають на ніч при кімнатній температурі в перевернутому вигляді.

До проб води об'ємом 10 см³ для звільнення від бактеріальної мікрофлори додають 1-2 см³ хлороформу, струшують і залишають на 15 хв. Для дослідження беруть воду над хлороформом. Оброблену воду наносять по 1 см³ на поверхню агару в трьох чашках Петрі.

Заздалегідь розлитий у пробірки 0,8 % МПА в кількості 3 см³ розплавляють, охолоджують до 46-48°C, додають 0,1-0,2 см³ суспензії 18 год культури *E. coli* (полілізабельний штам), ретельно перемішують і виливають на агар із пробіркою води. Суміш залишають на 30 хв для застигання. Потім чашки в перевернутому вигляді інкубують 18-24 год при 37 °С.

Облік результатів проводять, підраховуючи число бляшкоутворюючих одиниць (БУО), і перераховують на 1 дм³ досліджуваної води. Для слабозабруднених вод використовують метод збагачення або осадження сіллю магнію. Індекс коліфагів також вираховують за спеціальною таблицею.

У 1996 р. МОЗ України видало наказ №383 про затвердження державних санітарних правил і норм "Гігієнічні вимоги до якості води централізованого господарсько-питного водопостачання". У ньому визначені основні мікробіологічні нормативи (табл. 7).

Таблиця 7

Мікробіологічні показники безпеки питної води

№	Найменування показників	Одиниці виміру	Нормативи
1	Число бактерій в 1 см ³ води (ЗМЧ)	КУО / см ³	не більше 100
2	Число бактерій групи кишкових паличок в 1 дм ³ води (індекс БГКП)	КУО / дм ³	не більше 3
3	Число термостабільних кишкових паличок в 100 см ³ води (індекс ФК)	КУО / 100 см ³	відсутність
4	Число патогенних мікроорганізмів у 1 дм ³ води	КУО / дм ³	відсутність
5	Число коліфагів у 1 дм ³ води	БУО / дм ³	відсутність

Примітки: КУО – колонієутворюючі одиниці (мікроорганізми);
 БУО – бляшкоутворюючі одиниці (віруси).

Дослідження мікрофлори повітря

В атмосферному повітрі можуть знаходитись десятки й сотні видів сапрофітних мікроорганізмів. Серед них регулярно виявляють стафілококи, мікрококи, сарцини, спорозносні палички, актиноміцети, віруси. Вони потрапляють у повітря з ґрунту, води, рослин, тварин, харчових продуктів і відходів деяких виробництв. Мікрофлору атмосферного повітря досліджують рідко, в основному, за несприятливих епідеміологічних ситуацій. У повітрі закритих приміщень, особливо лікарняних, поряд із нешкідливими сапрофітами можуть виявляти й патогенні мікроорганізми: збудники дифтерії, скарлатини, менінгіту, коклюшу, туберкульозу, віруси грипу, парагрипу, кору та ін. Санітарно-показовими бактеріями для повітря закритих приміщень є золотисті стафілококи, альфа- і бета-гемолітичні стрептококи.

Для повсякденної санітарно-гігієнічної оцінки повітря лікарняних приміщень визначають такі показники:

1. Загальна кількість мікробів у 1 м³ повітря.
2. Кількість у 1 м³ санітарно-показових бактерій.

За цими показниками визначають ступінь бактерійного забруднення повітряного середовища. Виявлення золотистих стафілококів і гемолітичних стрептококів вище допустимих нормативів свідчить про епідеміологічне неблагополуччя досліджуваного об'єкта.

Бактеріологічні лабораторії санітарно-епідеміологічних станцій у плановому порядку проводять мікробіологічні дослідження таких приміщень як операційні, реанімаційні й перев'язувальні відділення хірургічних і дитячих стаціонарів, пологових будинків, станцій переливання крові, аптек, дитячих садків, ясел, шкіл, кінотеатрів тощо.

При проведенні мікробіологічних досліджень повітря використовують седиментаційний, аспіраційний і фільтраційний методи.

Седиментаційний метод Коха. Цей метод оснований на принципі осадження мікробів. Дві чашки Петрі з МПА або спеціальним агаром для гемолітичних стреп-

тококів (середовище Гарро) чи жовтково-сольовим агаром (ЖСА) для золотистих стафілококів відкривають і встановлюють на горизонтальній поверхні в місці взяття проби. Залежно від мікробного забруднення повітря експозиція чашок продовжується від 5-10 хв, при великій кількості бактерій, до 20-40 хв – при малій. Чашки закривають, інкубують 24 год при 37 °С і ще добу при кімнатній температурі.

Для визначення загального мікробного числа повітря в 1 м³ підраховують кількість всіх колоній на МПА в обох чашках і знаходять середнє арифметичне. За даними Омелянського на поверхню в 100 см² за 5 хв осідає стільки бактерій, скільки їх міститься в 10 дм³ повітря. Наприклад, на чашці з агаром після 5 хв експозиції виросло 33 колонії. Площа стандартної чашки Петрі складає біля 66 см². На 100 см² агару виросло б $33 \times 100 : 66 = 50$ колоній, тобто та кількість мікробів, що міститься в 10 дм³ повітря. Отже, в 1 м³ їх буде $50 \times 1000 : 10 = 5000$.

Ретельна перевірка багатьох показників, вирахованих за формулою Омелянського, виявила, що вони втричі менші від чисел, отриманих більш точними методами дослідження мікрофлори повітря за допомогою спеціальних апаратів. У зв'язку з цим метод Коха використовують для орієнтовного визначення мікробного забруднення, але він дає хороші результати при порівняльному дослідженні мікрофлори різних лікарняних приміщень.

При перегляді чашок Петрі з елективними середовищами звертають увагу на колонії, характерні для бактерій, що ростуть саме на даному живильному середовищі. Наприклад, на агарі Гарро підраховують колонії альфа- і бета-гемолітичних стрептококів, на ЖСА – колонії золотистих стафілококів. Типові колонії мікроскопують, виділяють чисті культури, ідентифікують їх до виду і лише після цього вираховують кількість тих чи інших видів бактерій. Це роблять тоді, коли визначають седиментаційним методом кількість санітарно-показових мікроорганізмів у 1 м³ повітря.

Аспіраційний метод Кротова. Він ґрунтується на ударній дії повітряного струменя об поверхню живильного середовища й прилипанні до нього бактерій. Дослідження проводять за допомогою апарата Кротова (рис. 26), який може вловлювати високодисперсні фази мікробного аерозолі.

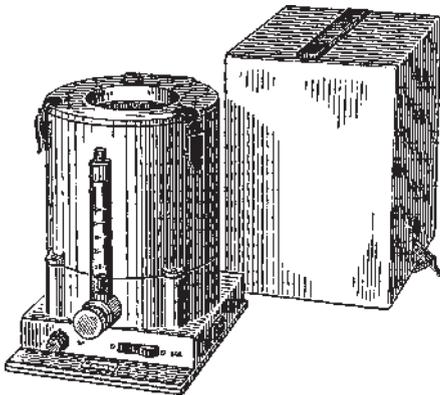


Рис. 26. Апарат Кротова.

Апарат складається з пристрою для відбору проб повітря, ротаметра, який регулює швидкість і кількість всмоктуваного повітря та електродвигуна. Прилад включають у електромережу, знімають кришку, на спеціальний диск закріплюють відкриту чашку Петрі з живильним середовищем. Ручкою надають їй інерційного руху за годинникову стрілкою, закривають кришку апарата і включають двигун. Чашка обертається з постійною швидкістю 60 об/хв. Повітря із заданою швидкістю втягується через кли-

ноподібну щілину плексигласової пластини, що закриває чашку Петрі з агаром. При цьому частинки аерозолі з мікроорганізмами рівномірно прилипають до живильного середовища. При дослідженні загального мікробного числа пропускають, як правило, 100 дм³ повітря зі швидкістю 25 дм³/хв. Якщо визначають кількість індикаторних бактерій (золотисті стафілококи, альфа- і бета-гемолітичні стрептококи) об'єм досліджуваного повітря збільшують до 300-500 дм³. Після взяття проби чашку з посівом повітря знімають, закривають її й інкубують 18-24 год при 37 °С і ще 24 год при кімнатній температурі.

Розрахунок загального мікробного числа проводять за формулою:

$$X = \frac{a \times 1000}{V},$$

де а – кількість колоній, що вирости в чашці Петрі,
V – об'єм пропущеного через прибор повітря в дм³,
1000 – заданий об'єм повітря для визначення ЗМЧ.

Приклад розрахунку: через прилад пропущено 100 дм³ повітря; число колоній, що вирости – 370. Отже, кількість мікроорганізмів у 1 м³ повітря буде дорівнювати:

$$X = \frac{370 \times 1000}{100} = 3700.$$

Фільтраційний метод. Для його використання запропоновані спеціальні прилади: Дяконова, Речменського, Кіктенко, ПАБ-1, ПОВ-1 та ін. Принцип їх дії зводиться до пропускання певного об'єму повітря через рідину в приладі (або фільтр) з наступним висівом мірної кількості її на живильні середовища. При застоуванні фільтрів їх накладають на щільне живильне середовище. Підраховують число колоній, що вирости, та проводять відповідні перерахунки на весь об'єм рідини в приладі й визначають число мікроорганізмів у 1 м³ повітря.

За допомогою цього методу можна провести дослідження повітря на присутність і тих патогенних мікроорганізмів, які не культивуються на живильних середовищах. Рідину, що поглинула бактерійні аерозолі повітря, можна використати для зараження лабораторних тварин або проведення спеціальних бактеріологічних та вірусологічних досліджень.

Безпосереднє виявлення патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів (стафілококи, стрептококи, псевдомонади, інші грамнегативні бактерії), які викликають шпитальні інфекції, проводять при аналізі повітря хірургічних, акушерсько-гінекологічних та інших стаціонарів.

При виникненні внутрішньолікарняних інфекцій, спричинених стафілококами, проводять дослідження на виявлення джерела й шляхів їх розповсюдження. При цьому визначають ідентичність культур, виділених із повітря, інших об'єктів оточуючого середовища, а також від хворих і медичного персоналу за допомогою фаготипування.

Державні стандарти для оцінки санітарно-бактеріологічних показників повітря ще нерозроблені. Запропоновані лише тимчасові положення про допустиме нормування мікробного забруднення окремих лікарняних та інших приміщень.

Так, у повітрі операційних, родильних залів, реанімаційних, перев'язувальних і процедурних загальна кількість бактерій в 1 м³ до роботи не повинна перебільшувати 500, після роботи – 1000; кількість *S.aureus* не більше 4, а гемолітичних стрептококів взагалі не повинно бути. У повітрі лікарняних палат взимку ЗМЧ не повинно перевищувати 3500, *S.aureus* – до 24, а гемолітичних стрептококів не більше 24. Влітку ці показники не повинні перевищувати відповідно 5000, 52 і 36.

Мікробіологічне дослідження ґрунту

Ґрунт є основним вмістилищем мікробного світу й головною ареною його життєдіяльності. Мікробіоценози цього природного середовища включають сотні й тисячі видів бактерій, грибів, найпростіших, мікоплазм і вірусів. Вони відіграють велику роль у процесах формування й самоочищення ґрунтів, а також у кругообізі речовин у природі. Один грам орної землі містить від 1 до 10 млрд бактерій. На площі в 1 га в ґрунті може знаходитись від 1 до 5 т мікробної маси.

Санітарно-показовими мікроорганізмами ґрунту є бактерії групи кишкової палички, ентерококи, *Clostridium perfringens* і термофільні мікроби.

Представники нормальної мікрофлори людей і тварин, а також патогенні мікроорганізми, що потрапили в ґрунт, як правило, довго в ньому не виживають. У той же час, ґрунт відіграє основну роль в епідеміології правця, ботулізму та газової гангрені (особливо під час воєн), оскільки він є основним резервуаром збудників цих захворювань.

При вирішенні питання про роль ґрунту в передачі інфекційних хвороб важливо знати тривалість зберігання й розмноження в ньому окремих патогенів (табл. 8).

Необхідність досліджувати мікрофлору ґрунту виникає при проведенні планування й забудови населених пунктів, санаторіїв, дитячих площадок, таборів відпочинку, пляжів, полів зрошування тощо. Залежно від завдань і мети дослідження проводять короткий або повний санітарно-мікробіологічний аналіз, а також виявлення патогенних бактерій і вірусів. Вибір місця відбору проб ґрунту визначають санітарний лікар і бактеріолог.

При короткому аналізі встановлюють загальну кількість мікробів (ЗМЧ), число бактерій групи кишкових паличок (титр БГКП), титри ентерококів, *C.perfringens* і

Таблиця 8

Патогенні мікроорганізми, що виявляються в ґрунті

Мікроби, для яких ґрунт є природним середовищем	Мікроби, що потрапляють у ґрунт із виділеннями людей і тварин	
	зберігаються довго	зберігаються порівняно недовго
<i>Clostridium botulinum</i> <i>Actinomyces spp</i> <i>Fungi spp</i>	<i>Bacillus anthracis</i> <i>Clostridium tetani</i> <i>Clostridium spp</i>	<i>Salmonella</i> <i>Shigella, Vibrio</i> <i>Brucella, Francisella</i> <i>Mycobacterium</i> <i>Leptospira, Pseudomonas</i> <i>Enterovirus</i>

термофільних мікроорганізмів. При повному аналізі, крім названих показників, визначають ще загальне число і процент спор, кількість актиноміцетів, грибів, аеробних целюльозних і амоніфікуючих бактерій. За певних епідеміологічних ситуацій необхідно виявляти й патогенні мікроорганізми (табл. 8).

Відбір проб ґрунту проводять у 4-5 точках вибраної ділянки на глибині 10-15 см. Лопатою викопують ямки глибиною 20 см. Над однією з бокових стінок ямки за допомогою пропаленого на вогні ножа зрізають верхній шар ґрунту. В стерильну банку беруть по 200-300 г із кожної точки, змішують, відбирають наважку в 30 г і вносять у колбу, що містить 300 см³ стерильної води. Суміш ретельно збовтують протягом 10 хв, потім відстоюють 2-3 хв для осідання грубих частинок.

При необхідності брати пробу з глибших шарів ґрунту використовують спеціальний земляний бур Некрасова, який дає змогу відбирати проби на заданій глибині.

Із отриманої суспензії готують серійні десятикратні розведення від 10⁻¹ до 10⁻⁶ і більше. По 1 см³ із останніх двох розведень вносять на дно двох стерильних чашок Петрі й заливають 15 см³ розтопленого й охолодженого до 45 °С МПА. Після застигання середовища чашки інкубують 48 год при 28-30 °С. Із суми колоній, що виростили на двох чашках одного розведення, вираховують середнє арифметичне й визначають ЗМЧ. Наприклад: посіяно 1 см³ суспензії ґрунту з розведення 10⁴; на чашці з агаром виростило в середньому 70 колоній; отже, ЗМЧ = 70×10⁴ = 7×10⁵ бактерій.

При визначенні титру БГКП по 1 см³ різних розведень ґрунту засівають у 9 см³ глюкозо-пептонного або лактозо-пептонного середовища. У разі розкладу вказаних цукрів до кислоти й газу висів роблять на середовище Ендо, темно-червоні колонії, що виростили, мікроскопують, ставлять пробу на оксидазу й вираховують титр БГКП так само, як і для води.

Титр ентерококів визначають шляхом посіву відповідних розведень на середовище Каліни або ДІФ-3; перфрінгенс-титр вираховують посівом розведень суспензії на середовище Вільсона-Блера; кількість грибів – на середовище Сабуро, актиноміцетів – на крохмально-аміачний агар. Для визначення титру термофільних бактерій різні розведення суспензії ґрунту вносять у чашки Петрі, заливають розтопленим і охолодженим МПА. Посіви інкубують 24 год при 60 °С, підраховують кількість виростилих колоній і роблять перерахунок на 1 г ґрунту.

Оцінку ступеня забруднення ґрунту проводять шляхом визначення загального мікробного числа й кількісного аналізу основних індикаторних мікроорганізмів (табл. 9).

Таблиця 9

Санітарно-мікробіологічна оцінка ґрунту

Характеристика ґрунту	ЗМЧ	Титр БГКП	Перфрінгенс-титр	Кількість термофільних бактерій в 1 г
Чистий	<5 · 10 ⁵	1,0 і більше	0,01 і більше	10 ² -10 ³
Помірно забруднений	5 · 10 ⁶	0,9-0,01	0,009-0,0001	10 ³ -10 ⁵
Сильно забруднений	>5 · 10 ⁶	0,009 і менше	0,00009 і менше	10 ⁵ -10 ⁷

Мікробіологічні дослідження змивів із рук та предметів

У розповсюдженні бактеріальних і вірусних інфекцій певне значення мають предмети побутової й виробничої обстановки, а також руки обслуговуючого персоналу. Різноманітні види бактерій та вірусів можуть порівняно довго зберігатись на поверхні шкіри рук і багатьох предметів (від 1 до 80 днів).

Визначення мікробного обсіменіння вказаних об'єктів проводять для оцінки санітарно-гігієнічного стану лікувальних, профілактичних, дитячих і торгових закладів, ресторанів, кафе, їдалень, буфетів тощо, а також встановлення шляхів розповсюдження інфекційних захворювань.

Дослідження змивів із рук та предметів (столи, іграшки, м'який інвентар, предмети кухонного вжитку та ін.) роблять за певними епідеміологічними показаннями. У повсякденній роботі рідко проводять аналізи на безпосереднє виявлення патогенних мікроорганізмів, оскільки вони мають ряд труднощів. Значно частіше виявляють санітарно-показові бактерії: БГКП, стафілококи, ентерококи.

Змив проводять стерильним тампоном, вміщеним у пробірку з МПБ або глюкозо-пептонним середовищем. Сухий тампон проштовхують до повного змочування у бульйоні, виймають і роблять змив. Спочатку протирають шкіру лівої, потім правої руки в такій послідовності: тил кисті, долоня, міжпальцеві проміжки, нігтьові ложа. Після закінчення змиву тампон знову занурюють у середовище. Пробка при цьому стає на своє місце й закриває пробірку (рис. 27).

При проведенні змивів із предметів, що мають велику поверхню (столи, стіни, дошки для обробки м'яса та інших продуктів), досліджувану ділянку обмежують спеціальною рамкою-трафаретом, що має площу 25, 50 або 100 см² (рис. 28). Цей шаблон виготовляють із дроту, перед вживанням і після змиву його обпалюють на вогні.

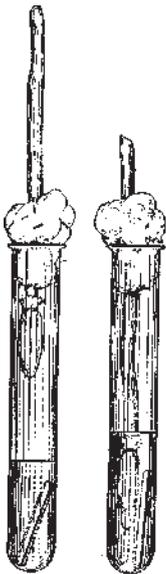


Рис. 27. Тампони для змивів.

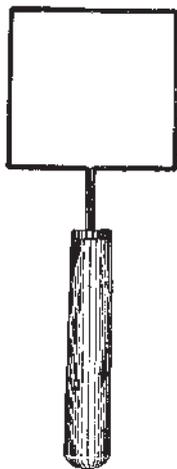


Рис. 28. Шаблон для змивів.

Для визначення загального мікробного обсіменіння із пробірки після ретельного віджимання тампону й перемішування 1 см³ рідини вносять у стерильну чашку Петрі, заливають 15 мл розтопленого й охолодженого агару. Посіви інкубують 24 год при 37°C, підраховують число колоній, визначають ЗМЧ. Для порівняльної оцінки отриманих результатів бажано вести розрахунки на 1 см² поверхні.

Визначення БГКП, стафілококів та ентерококів (індикаторні мікроорганізми) проводять шляхом посіву на елективні середовища. Колонії підраховують та ідентифікують так само, як і при аналізі води.

Мікробіологічні дослідження харчових продуктів

Харчові продукти – сприятливе середовище не тільки для збереження, але й для розмноження сапрофітних, патогенних і умовно-патогенних бактерій. Серед багатьох продуктів є такі, що містять так звану *специфічну мікрофлору* (молочнокислі бактерії, молочнокислі стрептококи, болгарська паличка, біфідобактерії, дріжджі, кефірний грибок та ін.). Вона знаходиться в молочнокислих продуктах, різних напоях і надає їм приємних смакових якостей (простокваша, кефір, кумис, йогурт, пиво, квас, безалкогольні напої). У процесі бактеріологічного аналізу ця мікрофлора не досліджується.

Окрім того, в багатьох продуктах можуть міститись аеробні й анаеробні мікроорганізми, або їх спори, що потрапили з навколишнього середовища. Вони складають *неспецифічну мікрофлору*, яка псує продукти, робить їх непридатними для вживання, а часом спричиняє тяжкі захворювання, харчові токсикоінфекції й токсикози. Саме ці мікроорганізми та їх токсини виявляють при проведенні бактеріологічного контролю м'яса й м'ясних продуктів, риби й рибних продуктів, молока й молочних продуктів, різноманітних консервів, напоїв тощо.

Санітарно-бактеріологічні дослідження харчових продуктів проводять з метою визначення ступеня мікробного обсіменіння (ЗМЧ), виявлення бактерій групи кишкових паличок (індекс і титр БГКП), ентерококів, стафілококів, деяких клостридій та протею. За епідемічними показаннями досліджують і наявність патогенних мікроорганізмів (сальмонел черевного тифу, паратифів, гострого гастроентериту, шигел, холерних вібріонів, мікобактерій, збудників бруцельозу, ботулізму, ентеровірусів та ін.).

Молоко й молочні продукти. Санітарно-бактеріологічний стан молока оцінюють за мікробним числом, індексом БГКП, наявністю стафілококів та ентерококів. Для визначення ЗМЧ пастеризованого молока його розводять від 10^{-1} до 10^{-3} і по 1 см^3 кожного розведення вносять у стерильні чашки Петрі й заливають розплавленим і охолодженим до 45°C агаром. Посіви інкубують при 37°C протягом доби, підраховують кількість колоній, роблять поправку на розведення й визначають ЗМЧ. Воно не повинно перевищувати $7,5 \times 10^3$.

Для визначення титру БГКП нерозведене пастеризоване молоко засівають у 6 пробірок із середовищем Кесслера або глюкозо-пептонним середовищем за схемою: в три пробірки вносять по 1 см^3 молока, в інші три – по $0,1 \text{ см}^3$ (1 см^3 молока, розведеного в 10 разів стерильною водою). Посіви інкубують протягом 24 год при 43°C , після чого з проб, що забродили, роблять висів на агар Ендо. З колоній темно-червоного кольору виготовляють мазки, ставлять пробу на оксидазу, пересівають у глюкозо-пептонне середовище й інкубують при 43°C протягом доби.

При оцінці результатів враховують наявність у мазках грамнегативних паличок, що не продукують оксидази, викликають бродіння глюкози до кислоти й газу. Титр БГКП не повинен перевищувати 3. Аналогічним способом досліджують вершки, молочнокислі продукти, морозиво, креми, дитячі молочні суміші тощо.

Виявлення стафілококів і ентерококів проводять так само, як і в воді. Патогенні бактерії виділяють шляхом посіву молока на відповідні елективні та диференціально-діагностичні середовища з наступним виділенням чистих культур та їх ідентифікації.

М'ясо й м'ясні продукти. Перш за все мікроскопічно визначають інтенсивність поверхневого обсіменіння м'яса в мазках-відбитках. Препарати готують із шматочків м'яса розміром 2×2,5 см, забарвлюють за Грамом і мікроскопують. М'ясо вважають свіжим, якщо в мазках немає, або в полі зору виявляють не більше 10 паличкоподібних бактерій. При сумнівній свіжості знаходять десятки коків і до 30 паличок. Якщо в полі зору велика кількість бактерій і переважають паличкоподібні форми – м'ясо оцінюють як несвіже.

При дослідженні ковбас, м'ясного фаршу, кулінарних виробів (котлети, битки та ін.) визначають загальне мікробне число, присутність БГКП, сальмонел, протеїв, анаеробних клостридій.

Зрізану поверхню ковбаси припікають розжареним на вогні скальпелем, плівку протирають спиртом, обпалюють і знімають. Стерильним скальпелем вирізають дві наважки по 1-2 г із поверхні та глибини батона. Кожну наважку окремо вміщують у стерильну фарфорову ступку й емульгують із стерильним піском, додаючи стерильний ізотонічний розчин хлориду натрію з таким розрахунком, щоб отримати 10 % суспензію.

Для визначення ЗМЧ на дно стерильних чашок Петрі вносять по 0,1 см³ суспензії, заливають розплавленим і охолодженим до 45 °С МПА, інкубують протягом 48 год при 37 °С. Підрахунок колоній і визначення кількості бактерій в 1 г продукту проводять загальноприйнятим методом. За існуючими нормативами ЗМЧ не повинно перевищувати 10³.

При дослідженні на виявлення БГКП 0,1 см³ суспензії сіють на середовище Ендо, ретельно розтираючи матеріал шпателем по всій поверхні агару, і вирощують 18-20 год при 37 °С. Підрахунок колоній, ідентифікацію бактерій та визначення індексу БГКП проводять так само, як вище описано. При відсутності росту колоній на середовищі Ендо відмічають, що при прямому посіві 0,01 г продукту коліформні бактерії не виявлені.

Бактерії роду *Proteus* виділяють за методом Шукевича. Для виявлення сальмонел, анаеробних клостридій та інших патогенних мікроорганізмів суспензію сіють на відповідні елективні середовища, виділяють чисті культури та ідентифікують їх за допомогою методик, що застосовуються для вивчення цих мікроорганізмів.

Риба і рибні продукти. М'ясо риб і рибні продукти контамінуються багатьма видами мікробів, що потрапляють із води, луски, кишок, різних предметів, палуб та устаткування риболовецьких кораблів, а також із рук персоналу, який обробляє та готує рибну продукцію. З епідеміологічної точки зору найнебезпечнішими бактеріями є палички ботулізму, які зустрічаються в кишечнику риб, особливо осетрових, а також холерні й параземолітичні вібріони та віруси гепатиту А.

Санітарно-бактеріологічні дослідження рибопродуктів проводять, як правило, при виникненні харчових токсикоінфекцій. Вони спрямовані на виявлення патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів або їх токсинів.

Методики забору проб, проведення аналізу, виділення чистих культур аеробних і анаеробних бактерій та їх ідентифікація подібні до тих, які застосовуються при дослідженні м'яса й м'ясних продуктів.

Консервовані продукти. Мікробіологічному контролю підлягають м'ясні, рибні, овочеві та фруктові консерви. Їх досліджують на наявність БГКП, сальмонел, стафілококів, аеробних і анаеробних спороносних мікробів. Найбільш небезпечними є консерви домашнього виробництва, особливо виготовлені з грибів, які часто є причиною виникнення ботулізму.

Безпосередньо перед проведенням аналізу для перевірки герметичності банки занурюють на 3-5 хв у нагріту воду (85 °С). Повітря всередині банок нагрівається, розширюється і в разі негерметичності виходить назовні у вигляді бульбашок. При порушенні герметичності консерви мікробіологічному дослідженню не підлягають.

Досліджувану банку миють гарячою водою з милом, витирають насухо, обтирають спиртом і верхню кришку обпалюють. Спеціальним пробійником пробивають кришку й скляною трубкою набирають матеріал для посіву. Для виділення аеробних бактерій беруть не менше 1 г вмісту, а для анаеробних – 3-5 г.

Аеробні мікроорганізми виявляють шляхом посіву у 2 пробірки з 1 % цукровим бульйоном, інкубують при 37 °С протягом 5-6 діб. При появі ознак росту виготовляють мазки, пересівають на МПА, середовище Ендо та скошений агар (за Шукевичем). Ідентифікацію чистих культур БГКП, сальмонел, протею проводять так само, як і при дослідженні м'яса та м'ясних продуктів.

Для виявлення анаеробних бактерій досліджуваний матеріал сіють у дві пробірки з середовищем Кітта-Тароцці, одну з яких прогрівають 20 хв при 80 °С. Після інкубації в термостаті культури мікроскопують і при виявленні в мазках грампозитивних паличок зі спорами виділяють чисті культури за методом Вейнберга або Цейслера. При відсутності росту посіви витримують у термостаті протягом 10 діб.

При дослідженні на наявність ботулінічного токсину проби консервів фільтрують і з фільтратом ставлять реакцію нейтралізації токсину типовими антиботуліновими сироватками А, В, С, D, Е, F, G в біологічній пробі на білих мишах.

Ботулотоксин можна виявити й за допомогою фагоцитарного показника. У пробірку вносять 1 об'єм 3 % розчину лимоннокислого натрію, 2 об'єми крові кролика, 1 об'єм досліджуваного матеріалу, 1 об'єм добової культури стафілокока 209 Р, що містить 2 млрд мікробних тіл в 1 см³ за оптичним стандартом. Інкубують 20 хв при 37 °С, після чого готують мазки, фіксують їх метиловим спиртом і забарвлюють азур-еозином. У мазку підраховують 50 лейкоцитів і число фагоцитованих ними стафілококів, ділять кількість поглинених коків на 50 і вираховують фагоцитарний показник. При наявності ботулінічного токсину фагоцитарний показник зменшується в порівнянні з контролем, а антиботулінова сироватка певного

типу нейтралізує пригнічення фагоцитарного індексу. За типом протиботулінової сироватки визначають тип токсину.

Дослідження мікрофлори людини

Організм людини населяють понад 500 видів бактерій, біля 50 видів вірусів і понад 20 видів найпростіших. Загальна кількість мікроорганізмів досягає 10^{14} , що в 10 разів більше, ніж всіх клітин макроорганізму.

Нормальна мікрофлора людського тіла поділяється на дві групи:

- 1) постійна (резидентна), специфічна для даного біотопу (автохтонна);
- 2) тимчасова, занесена з інших біотопів хазяїна (алохтонна), або з оточуючого середовища (заносна).

В різних ділянках тіла вона неоднакова, оскільки кожний біотоп характеризується своєрідними умовами для існування мікроорганізмів. Найбільше епідеміологічне значення мають представники мікробних угруповань шкіри, верхніх дихальних шляхів, шлунково-кишкового тракту, сечо-статевих органів. Методи дослідження мікрофлори різних біотопів значною мірою відрізняються між собою. Дослідження мікрофлори людини проводять при діагностиці ендогенних інфекцій, дисбактеріозів, бактеріоносійства, у космонавтів, членів екіпажів підводних човнів та полярних експедицій для уникнення бактерійної несумісності.

Мікрофлора шкіри. Найбільш характерними мікробами шкіри є коринебактерії (*Corynebacterium bovis*, *C. lipophylicum*, *C. minutissimum*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. xerosis*); пропіонібактерії (*Propionibacterium acnes*, *P. avidum*, *P. freudenreichii*, *P. granulosum*); стафілококи (*Staphylococcus epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. capitis*, *S. cohnii*); мікрококи (*Micrococcus kristinae*, *M. luteus*, *M. varians*); сарцини (*Sarcina maxima*, *S. ventriculi*); актиноміцети (*Actinomyces bolis*, *A. israelii*); гриби (*Pityrosporum ovale*, *P. orbiculare*). У окремих осіб зустрічаються дріжджоподібні гриби *Candida*, *Staphylococcus aureus*, різні види стрептококів, анаеробні клостридії. З епідеміологічної точки зору важливими біотопами є шкіра обличчя, пахвинних ямок, промежини, молочних залоз породіль, місця операційних розрізів.

Матеріал для дослідження із здорової чи патологічно зміненої шкіри найчастіше беруть стерильним ватним тампоном (див. змиви з рук). Він дає змогу провести лише якісний аналіз мікрофлори, що вегетує на поверхні шкіри.

Для більш точного дослідження мікрофлори шкіри використовують метод змивів-зскрібок Вільямсона і Клігмана в модифікації С.І. Ситника. За допомогою цього методу можна визначити абсолютне число мікроорганізмів на досліджуваній ділянці шкіри. Для цього на поверхню шкіри прикладають і щільно притискають стандартний стерильний скляний циліндр із шліфованими краями, площа перерізу якого становить точно 1 см^2 , а висота 5 см. У нього вносять $1 \text{ см}^3 0,1 \%$ розчину тритону X-100 в $0,075 \text{ M}$ фосфатному буфері рН 7,9. Потім в циліндр опускають стерильний стальний робочий елемент масою 18 г, який має на торці дрібні насічки, які роблять зскрібок епітелію і мікрофлори. Робочий елемент обертають руками без натиску протягом 1 хв. Змивну рідину відсмоктують стериль-

ною пастерівською піпеткою в пробірку. В циліндр, ще притиснутий до шкіри, повторно вносять 1 см³ розчину тритону і процедуру змиву повторюють. Обидві змивні рідини змішують і з суміші готують десятикратні розведення (10⁻⁰, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³) в 0,05 % розчині тритону для попередження реак агрегації бактерій. По 0,1 см³ нерозведеної, а також розведених проб засівають на селективні живильні середовища (кров'яний агар; ЖСА, фуразолідоно-твіновий агар, середовища Гарро, Ендо, Сабуро, кров'яний агар BVL для анаеробів (до стандартного середовища BVL додають 5 % дефібринованої крові барана). Посіви інкубують при 37 °С протягом 48-96 год. Підраховують кількість колоній, що виросли, користуючись лупою або приладом ПСБ. Результати виражають число КУО на 1 см² шкіри за формулою:

$$\text{число КУО} = 20 \times m \times n,$$

де 20 – постійний коефіцієнт при посіві 0,1 см³ проби,

m – число колоній, що виросли,

n – розведення (в 10, 100, 1000 разів).

У відповіді для лікаря вказують загальне мікробне обсіменіння досліджуваної ділянки: високе – понад 10⁶, середнє – 10³-10⁵, низьке – менше 10³ КУО/см²; види виділених мікроорганізмів; стан мікробіоценозу (еубіоз, дисбактеріоз).

Мікрофлора дихальних шляхів. Серед резидентної мікрофлори дихальних шляхів найчастіше знаходять зеленячі, гемолітичні й негемолітичні стрептококи, коринебактерії, нейсерії, стафілококи, мікрококи, пептострептококи, бактероїди. Значно рідше виявляють актиноміцети, мікоплазми, трепонеми, ентеробактерії й гриби роду *Candida*. Основна маса мікрофлори припадає на долю *Streptococcus viridans* (понад 90 % всіх мікроорганізмів). Біля 10 % людей є носіями *Staphylococcus aureus*, а серед медпрацівників хірургічних і акушерсько-гінекологічних стаціонарів цей вид виділяють у 40-90 % обстежених осіб. Слизова оболонка трахеї, бронхів, бронхіол і альвеол здорової людини, як правило, не містить мікроорганізмів.

Матеріал для дослідження повинен брати спеціаліст, оскільки правильний забір має вирішальне значення для виявлення епідеміологічно значущих мікроорганізмів.

Слиз (секрет) із носа беруть натще або через 2 год після вживання їжі й до початку лікування стерильними ватними тампонами, виготовленими краще з негігроскопічної вати. Для кожного носового ходу використовують окремий тампон. Матеріал із носоглотки беруть спеціальним задньоглотковим тампоном, який вводять через зів або носовий отвір у носоглотку. Матеріал із ротоглотки забирають одним тампоном. Спочатку обтирають ним правий мигдалик, потім дужку піднебіння, язичок, ліву дужку й лівий мигдалик. Важливо слідкувати, щоб тампон не торкався слизової щік і язика. В разі виявлення чітко локалізованого патологічного осередку матеріал із нього необхідно взяти окремим тампоном. Зеленячі стрептококи частіше виявляють у слині, яку беруть з-під язикової ямки.

При ураженні нижніх дихальних шляхів і легень досліджують харкотиння. Останнім часом широко використовують більш точні аспіраційні методи при бронхоскопії та пункції трахеї. При бронхоскопії вводять у бронхи 5 см³ 0,85 % розчину

хлориду натрію, який потім відсмоктують в кількості 2-3 см³. При використанні вказаних методів проводять як якісне, так і кількісне визначення мікрофлори.

Взятий матеріал сіють на кров'яний, сироватковий, жовтково-сольовий та шоколадний агар, середовища Ендо й Сабуро.

Виявлення мікроорганізмів, які не є представниками нормальної мікрофлори, або збільшення кількості будь-якого виду автофлори на фоні хвороби, свідчить про їх етіологічну роль при даному захворюванні.

Мікрофлора порожнини рота. Мікрофлора ротової порожнини – дуже складний мікробіоценоз, в якому тісно співіснують аероби й анаероби, грампозитивні й грамнегативні бактерії, гриби, віруси та найпростіші. Найбільш характерними представниками є ротові стрептококи (*Streptococcus salivarius*, *S.mitis*, *S.mutans*, *S.sanguis*, *S.viridans*); анаеробні пептострептококи (*Peptostreptococcus anaerobius*, *P.productus*, *P.parvulus*, *P.lanceolatus*, *P.micrus*); стафілококи (*Staphylococcus epidermidis*, *S.saprophyticus*, *S.hominis*, *S.hyicus*); мікрококи (*Micrococcus luteus*, *M.varians*); бактероїди (*Bacteroides fragilis*, *B.melaninogenicus*, *B.gingivalis*); спірохети (*Treponema denticola*, *T.macrodentium*, *T.orale*, *T.vincentii*, *Borrelia*); нейсерії (*Neisseria flava*, *N.sicca*); лептотрихії (*Leptotrichia buccalis*); вейлонели (*Veilonella parvula*); лактобацили (*Lactobacillus casei*, *L.acidophilus*); фузобактерії (*Fusobacterium nucleatum*, *F.periodicum*, *F.plauti*); превотели (*Prevotella disiens*); кампілобактерії (*Campylobacter sputorum*); гриби родів *Actinomyces*, *Candida*; мікоплазми (*Mycoplasma orale*, *M.salivarium*).

До випадкових, але досить небезпечних представників ротової мікрофлори слід віднести *Streptococcus pyogenes*, *S.viridans*, *S.pneumoniae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Staphylococcus aureus*, віруси герпесу, епідемічного паротиту, ВІЛ-інфекції та ін.

Бактеріологічні дослідження вмісту ротової порожнини проводять з метою вивчення етіології патологічних процесів слизової, ясен, зубів, діагностики ряду специфічних захворювань (сифіліс, туберкульоз, ангіна Симановського-Плаута-Венсана, ВІЛ-інфекція), при виготовленні нових матеріалів для протезів та пломбування зубів. Його треба проводити до початку лікування хіміопрепаратами, до вживання їжі й не раніше, ніж через 4-5 год після місцевого лікування.

Матеріалом для дослідження є полоскальний змив, зубний наліт, біоптати слизової щік і язика, вміст каріозних зубів і гангренозних пульп. Найчастіше його беруть ватним тампоном, яким обтирають слизову щік, ясен, язика, мигдалики. У разі виявлення ясенних карманів чи виразок мазок треба брати ще одним тампоном або платиновою петлею, а при ушкодженні зубних каналів – стоматологічним зондом, обгорнутим стерильною ватою або окремими ватними чи паперовими гнотиками. Слину забирають з-під язика. У зв'язку із зростаючим поширенням СНІДу взяття матеріалів для бактеріологічного чи вірусологічного дослідження треба проводити з максимальною обережністю, щоб виключити зараження інших пацієнтів.

При бактеріоскопії мазки забарвлюють за методом Грама або Романовсько-Гімзи. Спірохети виявляють у нативних препаратах за допомогою темного поля, фазово-контрастного чи аноптрального мікроскопів.

Бактеріологічне дослідження проводять шляхом посіву матеріалу на елективні та диференціальні середовища для аеробних і анаеробних мікроорганізмів із врахуванням біологічних особливостей вище вказаних родів і видів бактерій, грибів і найпростіших. Виділені культури ідентифікують за їх морфологічними, культуральними, ферментативними та антигенними властивостями.

Висновок про роль того чи іншого збудника у виникненні карієсу, гінгівіту, пульпіту, парадонтозу та інших патологічних процесів роблять не лише на основі визначення виду, а й щільності його популяції. Частіше всього вказані захворювання викликає не один вид, а різноманітні асоціації мікроорганізмів.

Мікрофлора шлунково-кишкового тракту. Стравохід у здорових людей не містить мікроорганізмів, або їх дуже мало (*Candida albicans*, *Actinomyces israelii*). У шлунку прижились дріжджі (*C.albicans*, *C.tropicalis*); сарцини (*S.ventriculi*); кампілобактерії (*Campylobacter fetus*, *C.pylori*); рідко виявляють лактобацили, стафіло- і стрептококи. У тонкому кишечнику знаходять ентерококи (*Enterococcus faecalis*, *E.faecium*, *E.durans*); біфідобактерії (*Bifidobacterium bifidum*, *B.infantis*, *B.longum*); лактобацили; *E.coli*.

Найбільш численна й різноманітна мікрофлора товстого кишечника. Основну її масу складають анаеробні мікроорганізми: *Bifidobacterium spp.*, *Bacteroides spp.* На долю цих двох родів припадає 96-99 % всіх мікробів, що населяють товсті кишки. Тут вегетує значна кількість *Escherichia spp.*, *Enterococcus spp.*, *Lactobacillus spp.* Залишкову мікрофлору товстого кишечника складають численні види родів *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Proteus*, *Candida*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Veillonella*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Actinomyces* та ін. Всього описано понад 260 видів бактерій. У окремих людей у кишечнику знаходять ентеровіруси, які при порушенні опірності організму можуть викликати різноманітні захворювання. В ряді випадків у випороженнях можна виявити різні види найпростіших.

Стійкі порушення нормальних мікробіоценозів називають дисбактеріозами. При цьому відбуваються зміни самого складу автофлори та кількісного співвідношення окремих її представників: значне зменшення видів нормальної мікрофлори аж до повного їх зникнення, або появи у великій кількості тих, які в нормі рідко зустрічаються. Це, в основному, стафілококи, грамнегативні палички, дріжджоподібні гриби *Candida* та клостридії.

Необхідність досліджувати дисбактеріоз кишечника виникає при довготривалих проносах, при яких не виділяють патогенних ентеробактерій, після перенесення кишечних інфекцій із довгим періодом реконвалесценції, тривалої антибіотикотерапії, злоякісних пухлинах, перед операціями на органах черевної порожнини, у недоношених новонароджених та при захворюваннях, що важко піддаються лікуванню (ентероколіти, виразкові коліти, холецистити тощо).

Матеріал із шлунка й тонкої кишки беруть за допомогою спеціальних зондів або капсул, які відкриваються у певному відділі кишкового тракту й закриваються після взяття проби. Останнім часом для цієї мети широко використовують гастрофіброскопи та гастродуоденоскопи, які дозволяють брати на аналіз не лише вміст шлунка чи кишечника, а й біоптати їх слизової оболонки для дослідження

мукозних бактерій. Матеріал із сигмоподібної та прямої кишок беруть тампоном, трубкою Цімана, колонофіброскопом чи ректороманоскопом.

При діагностиці дисбактеріозу кишечника досліджують кал. Його вносять у заздалегідь зважені флакончики в кількості 0,5-1,0 г без консерванта й доставляють до лабораторії не пізніше 2 год після забору. Визначену наважку випорожнень розводять спеціальним буферним розчином від 10^{-1} до 10^{-12} .

Із розведень 10^{-3} - 10^{-6} по 0,1 см³ сіють на середовища ЖСА (для виявлення стафілококів), кров'яний агар (для ентерококів і виявлення гемолітичних форм), Сабуро (для грибів), Вільсона-Блера (для клостридій).

Із розведень 10^{-5} - 10^{-8} по 0,1 см³ сіють на середовище Ендо (для ентеробактерій), МРС-2 і МРС-4 (для лактобактерій), а з розведень 10^{-7} - 10^{-10} по 1,0 см³ засівають на середовище Блаурока, яке розливають високим стовпчиком (для біфідобактерій), та спеціальні середовища для бактероїдів.

Для виявлення патогенних ентеробактерій нативний рідкий кал, або з розведень 10^{-1} , бактеріологічною петлею сіють на середовища Ендо, Плоскирева та вісмут-сульфіт агар. По 1-2 см³ із розведення 10^{-1} сіють на середовища збагачення (Мюллера, селенітовий чи магнієвий бульйон). Склад і методика виготовлення всіх живильних середовищ приводиться в інструкції для діагностики дисбактеріозів.

Посіви для вирощування факультативно-анаеробних бактерій інкубують при 37 °С протягом 24-48 год, біфідобактерій – 48 год, анаеробів – 4-5 діб в анаероста-тах, грибів – 96 год при 28-30 °С.

Після ідентифікації виділених культур проводять розрахунки кількості мікроорганізмів тієї чи іншої групи на 1 г випорожнень. Діагностику дисбактеріозу проводять за відхиленням показників кількісного вмісту бактерій різних таксономічних груп від нормальних величин, які представлені в таблиці 10.

Мікрофлора сечостатевих органів. Паренхіма нирок, ниркові мисочки, сечоводи, сечовий міхур, сеча, порожнина матки й маткові труби у здорових людей вільні від мікробів. У зовнішній частині уретри і статевих органів чоловіків і жінок зустрічаються *Mycobacterium smegmatis*, у невеликій кількості стафілококи, стрептококи, пептококи, пептострептококи, коринебактерії, бактероїди, фузобактерії, гриби родів *Candida*, *Torulopsis*, *Geotrichum*.

У піхві здорових жінок переважають молочнокислі бактерії (палички Додерлайна), дифтероїди та грамнегативні *Comma variabile*. Значно рідше виявляють стрепто-, стафіло-, пептококи та клостридії. У 15-20 % вагітних жінок зустрічається *Streptococcus agalactiae*, дуже небезпечний для новонароджених. Присутність грамнегативних бактерій є наслідком фекальної контамінації.

Порцію першої ранкової сечі (3-5 см³) беруть у стерильний посуд, починаючи з середини сечовипускання, і не пізніше як через 1 год проводять посів для кількісного визначення мікрофлори або каліброваною платиновою петлею (діаметр 2 мм) на агар в чашці Петрі, або в склянку ємністю 30 см³, на стінках якої є живильне середовище площею 12,5 см². Середовище обливають мірною кількістю сечі, потім її виливають (метод Нейчева). Після інкубації посівів підраховують

Таблиця 10

Показники нормоценозу товстого кишечника людини

Мікроорганізми	Кількість бактерій в 1 г випорожнень	
	дорослих	дітей
<i>Bifidobacterium spp.</i>	$10^8 - 10^9$	$10^9 - 10^{10}$
<i>Bacteroides spp.</i>	$10^9 - 10^{10}$	10^{8**}
<i>Lactobacillus spp.</i>	$10^6 - 10^7$	$10^6 - 10^8$
<i>Streptococcus lactis</i>	$10^6 - 10^8$	$10^7 - 10^8$
<i>Clostridium spp.</i>	10^5	–
<i>Escherichia:</i>		
ті, що ферментують лактозу	$10^7 - 10^8$	$10^7 - 10^8$
лактозодефектні	$10^5 - 10^{7*}$	$10^6 - 10^7$
ті, що не ферментують лактозу	$10^5 - 10^7$	$10^6 - 10^7$
гемолітичні	10^6	10^6
<i>Proteus spp.</i>	10^4	10^{3**}
<i>Klebsiella spp.</i>	10^5	10^4
Інші умовно-патогенні ентеробактерії	10^{5*}	10^4
Другі грамнегативні бактерії	10^3	10^3
<i>Staphylococcus aureus</i>	10^3	10^3
Інші стафілококи:		
(<i>S.epidermidis</i> , <i>S.saprophyticus</i> та ін.)	10^4	$10^4 - 10^6$
<i>Enterococcus spp.</i>	$10^5 - 10^6$	$10^5 - 10^6$
<i>Candida spp.</i>	10^4	10^4
Плісняві гриби	10^4	10^4
Патогенні ентеробактерії	0	0

Примітка. * – зустрічаються у окремих здорових осіб;

** – зустрічаються рідко у дітей після 3 місяців.

число колоній і визначають кількість бактерій в 1 см³ сечі. Критичний (небезпечний) рівень бактеріурії – 10^5 і більше.

Матеріал для дослідження мікрофлори піхви і визначення ступеня чистоти вагінального вмісту беруть ложечкою Фолькмана, шпателем, або жолобоподібним зондом із заднього склепіння піхви й наносять тонким шаром на предметне скло. Мазок фіксують 10 хв у суміші Никифорова, забарвлюють за методом Грама й досліджують під імерсійною системою.

У вагітних жінок визначають чотири ступені чистоти вагінального секрету:

перший – поодинокі клітини злушеного епітелію, багато паличок Додерлайна, немає лейкоцитів;

другий – клітини епітелію, палички Додерлайна і *Comma variabile*, поодинокі лейкоцити;

третій – дуже рідко палички Додерлайна або *Comma variabile*, багато лейкоцитів, наявна кокова флора;

четвертий – відсутні палички Додерлайна і *Comma variabile*, дуже багато лейкоцитів, наявна гноєрідна мікрофлора (рис. 29).

Перший і другий ступінь чистоти зустрічається у здорових жінок і вважається нормою; третій і четвертий – характеризує патологічний стан статевих органів і потребує санації перед пологами.

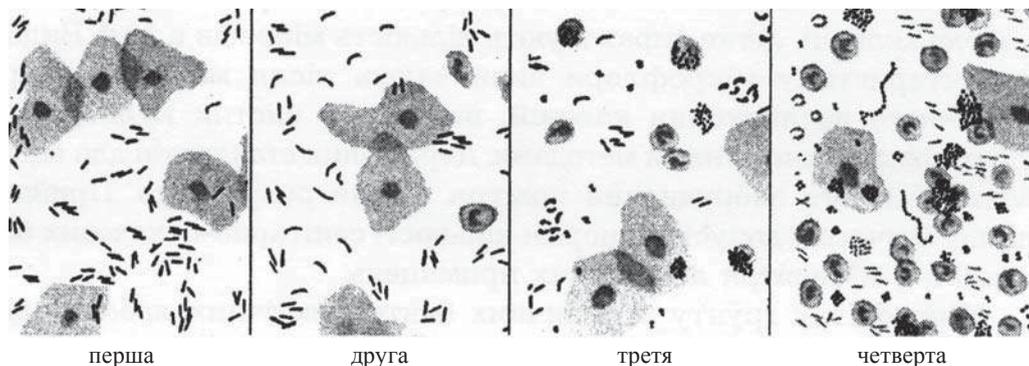


Рис. 29. Чотири ступені чистоти вагінального секрету.

Мікрофлора очей і вух. У 47 % здорових людей слизова оболонка очей не містить мікроорганізмів. У решти на кон'юнктиві знаходять *Staphylococcus epidermidis*, *S.aureus* (5%), *Corynebacterium xerosis*, *C.hoffmani*, нейсерії, стрептококи, гемофільні бактерії, мікоплазми, деякі види вірусів. У окремих випадках автофлора очей (як і проникнення бактерій ззовні) може викликати кон'юнктивіти, блефарити тощо.

Шкіра зовнішнього слухового проходу заселена стафілококами (*S.epidermidis*, *S.auricularis*) та дифтероїдами (*C.xerosis*). Рідше тут зустрічаються псевдомонади й ентеробактерії. Середнє і внутрішнє вухо стерильні. Періодично до них можуть проникати мікроорганізми з носоглотки, але вони швидко гинуть. За певних умов при масивному проникненні бактерій в середнє вухо виникає отит.

Матеріал для мікробіологічного дослідження беруть із кон'юнктиви або вушного проходу стерильним тампоном чи маленьким ватним (марлевым) гнотиком; із слізного мішка – піпеткою, а з середнього вуха – пункцією. Виготовляють мазки й роблять посіви на оптимальні живильні середовища. Виділення чистих культур та їх ідентифікацію проводять загальноприйнятими методами.

Розділ 6

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ІНФЕКЦІЯ. ВИКОРИСТАННЯ ТВАРИН В ЛАБОРАТОРНИХ ДОСЛІДЖЕННЯХ

Досить часто в мікробіологічних, вірусологічних та імунологічних лабораторіях використовують біологічний метод дослідження на різноманітних видах тварин. Його застосовують для експериментального відтворення інфекційних захворювань, окремих його симптомів або для вирішення спеціальних задач:

1. Встановлення етіологічного діагнозу інфекційної хвороби, особливо в тих випадках, коли збудник не можна або важко виявити іншим способом (пневмококи, туляремійні бактерії, віруси сказу, енцефалітів тощо).

2. Виділення та ідентифікації чистої культури, визначення її токсигенності чи токсичності.

3. Визначення вірулентності мікроорганізмів, встановлення мінімальних смертельних доз мікробів, екзотоксинів та ендотоксинів.

4. При наукових дослідженнях з проблем механізму розвитку інфекційних хвороб, формування імунітету, специфічного лікування і профілактики.

5. При контролі імуногенності, токсичності, стерильності, нешкідливості, пірогенності біологічних медичних препаратів (вакцин, анатоксинів, ліків тощо).

6. Для отримання діагностичних імунних сироваток.

Дуже важливим етапом є вибір відповідних тварин для експериментального зараження. Найчастіше в лабораторній практиці використовують білих мишей, гвінейських свинок, білих щурів і кроликів. Деякі спеціальні лабораторні дослідження проводять на мавпах, собаках, котах, хом'яках, ховрах, тхорах, бавовняних щурах, мишах-полівках, а також на птахах (голуби, кури, папуги та ін.). Вибір виду тварин оснований на знанні чутливості їх до тих чи інших мікроорганізмів.

Білі миші високочутливі до пневмококів, клебсієл, деяких видів сальмонел, збудників сибірки, чуми, туляремії, лістеріозу, меліоїдозу, правця, ботулізму, газової анаеробної інфекції, коклюшу, орнітозу, висипного тифу, сказу, лейшманіозу, токсоплазмозу. Новонароджені миші чутливі до арбовірусів, поліовірусів, коксакі-вірусів. На білих мишах визначають силу екзо- і ендотоксинів.

Гвінейські свинки чутливі до збудників туберкульозу (*M. hominis*), псевдотуберкульозу, дифтерії, чуми, туляремії, бруцельозу, сапу, холери, сибірки, лептоспірозу, меліоїдозу, лістеріозу, орнітозу, ботулізму, правця, газової гангрени, кашлюка, висипного тифу, ящуру.

Білих щурів використовують для експериментального відтворення сказу, содоку, амебіазу, меліоїдозу, токсоплазмозу, туберкульозу (*M. bovis*).

Кролики чутливі до стафілококів, стрептококів, деяких видів сальмонел, збудників туберкульозу, сибірки, пастерельозу, лістеріозу, ботулізму, правця, сифілісу, амебіазу, токсоплазмозу, вірусів сказу й простого герпесу.

Мавпи зрідка використовують як експериментальну модель при сифілісі, туберкульозі, дизентерії, лістеріозі, меліоїдозі, цереброспінальному менінгіті, черевному тифі, кашлюку, поліомієліті та ін.

Коти чутливі до збудників амєбної дизентерії, сапу, кашлюку, стафілококових інфекцій, дії ентеротоксинів (кошенята-сисуні).

Сірійських хом'яків використовують для відтворення бруцельозу, сапу, лейшманіозу, токсоплазмозу, амебіазу, лептоспірозу, рикетсіозів, сказу, геморагічних гарячок.

Птахи (голуби, кури, папуги) чутливі до збудників туберкульозу (*M. avium*), анаеробної газової інфекції, риносклероми (курчата), ботулінового екзотоксину.

Для отримання високостандартних і легковідтворюючих стабільних результатів, а також в наукових дослідженнях, особливо вірусологічних, у лабораторній практиці використовують генетично стандартизованих *лінійних (гомозиготних)* тварин. Їх отримують у спеціальних віваріях шляхом багаторазового близькоспорід-

неного схрещування (інбридінга). Уже виведено біля 700 ліній білих мишей, 170 ліній щурів, 16 ліній гвінейських свинок, біля 70 ліній хом'яків, 7 ліній курчат та ін. Такі тварини і птахи мають чітко запрограмовані біологічні властивості, такі як висока чутливість до певних збудників, здатність до імунологічної відповіді тощо.

У лабораторних тварин можуть виникати спонтанні захворювання бактеріальної чи вірусної природи, латентні інфекції. Вони також мають свою нормальну мікрофлору. Все це ускладнює виділення чистих культур від заражених тварин і визначення їх етіологічної ролі. Цього недоліку позбавлені безмікробні лабораторні тварини – *гнотобіоти*, а також тварини, вільні від спеціальних патогенних збудників (СПЗ-тварини). Їх використовують для проведення важливих експериментів з проблем вивчення ролі нормальної мікрофлори в інфекції, імунитеті, утворення вітамінів, ферментів та інших біологічно активних речовин.

Способи зараження експериментальних тварин

Для постановки біологічної проби або відтворення інфекційного захворювання у лабораторних тварин використовують різні методи введення мікроорганізмів, їх токсинів або іншого досліджуваного матеріалу: нашкірний, внутрішньошкірний, підшкірний, внутрішньом'язовий, внутрішньовенний, внутрішньоочеревинний. Матеріал можна ввести в носові ходи, рот, шлунок, пряму кишку, серце, мозок, піхву, яечко, кон'юнктиву, порожнину суглобів. Спосіб зараження залежить від типу матеріалу, ймовірних збудників чи їх токсинів і виду тварин.

Нашкірний спосіб – втирання матеріалу в депільовану (позбавлену шерсті) або скарифіковану ділянку шкіри. Втирання проводять тупим кінцем скальпеля обережно (краще під прикриттям скляної лійки). Тварину фіксують до повного висихання матеріалу. Цей спосіб використовують рідко, здебільшого для виявлення збудників, що проникають через неушкоджену шкіру (палички чуми, туляремії, лептоспіри).

Внутрішньошкірний спосіб часто використовують при введенні екзотоксинів (стафілококовий, дифтерійний) для виявлення їх дермонекротичної дії, або при постановці алергічних проб. Матеріал вводять в об'ємі 0,1-0,2 мл тонкою голкою, користуючись туберкуліновим шприцом. Шкіру, позбавлену шерсті, протирають спиртом, розтягують великим і вказівним пальцями, голку вводять під гострим кутом зрізом доверху, матеріал треба вводити повільно. В місці ін'єкції утворюється характерний пухирець, що нагадує лимонну кірку, але він досить швидко розсмоктується (рис. 30).

Підшкірний спосіб використовується найчастіше. У місці введення після депіляції шкіру обробляють спиртом, захоплюють і підіймають двома пальцями лівої руки і в основу утвореної складки правою рукою вколюють голку шприца. Пройшовши голкою кілька міліметрів, її відхиляють в один чи другий бік, проходять глибше і повільно вводять матеріал, що міститься в шприці (рис. 31). Це робиться для того, щоб введений матеріал не витікав через прокол шкіри назовні. Складку опускають, на голку кладуть вату, змочену спиртом або розчином йоду і

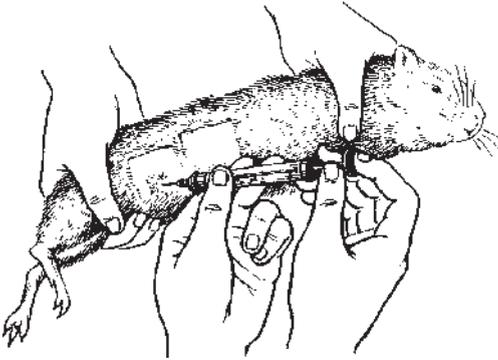


Рис. 30. Внутрішньошкірне зараження гвінейської свинки.

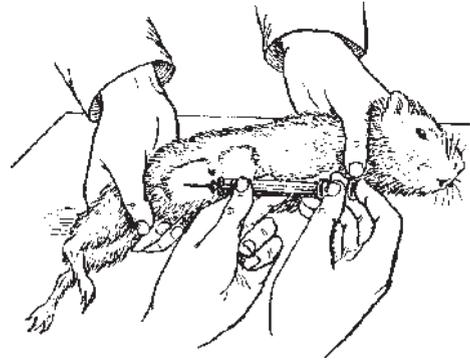


Рис. 31. Підшкірне зараження гвінейської свинки.

швидко виймають голку. Найбільш зручне місце для підшкірного введення матеріалу в мишей і щурів – на спині біля кореня хвоста, а в гвінейських свинок та кроликів – у ділянці спини чи живота. Мишам вводять 0,5-1,0 мл матеріалу, щурам і свинкам – 1,0-1,5 мл, кроликам – не більше 3,0 мл.

Внутрішньом'язове зараження проводять у ділянку тіла з найбільш розвиненим м'язовим шаром. У кроликів, гвінейських свинок, щурів і мишей – це м'язи верхньої третини задньої лапи, у курей і голубів – грудний м'яз. Ділянку шкіри в місці ін'єкції обробляють так само, як і при підшкірному введенні. Потім великим і вказівним пальцями лівої руки захоплюють товсту м'язову складку і вводять голку майже під прямим кутом в глибину м'язів (рис. 32).

Часто цим методом користуються для експериментального відтворення анаеробних клостридіальних інфекцій.

Внутрішньоочеревинне зараження. Спочатку вистригають шерсть на животі в нижній його третині, протирають спиртом або розчином йоду. Для попередження ушкоджень кишечника тварину тримають вниз головою. З цією ж метою використовують короткі голки з притупленим кінцем. У кроликів і гвінейських свинок роблять маленький надріз шкіри (2-3 мм) у нижній третині живота збоку від середньої лінії. Під гострим кутом вводять голку між шкірою і м'язами, потім переводять її в перпендикулярне положення до очеревини, буравлячим рухом проколюють її, відчуваючи ніби "провал" у черевну порожнину, і вводять досліджуваний матеріал. На місце розрізу накладають шов або хірургічну скрепку. При зараженні мишей і щурів шерсть не голять і надріз не роблять (рис. 33).

Максимальні дози досліджуваного матеріалу для введення білим мишам – 1 мл,



Рис. 32. Внутрішньом'язове зараження.

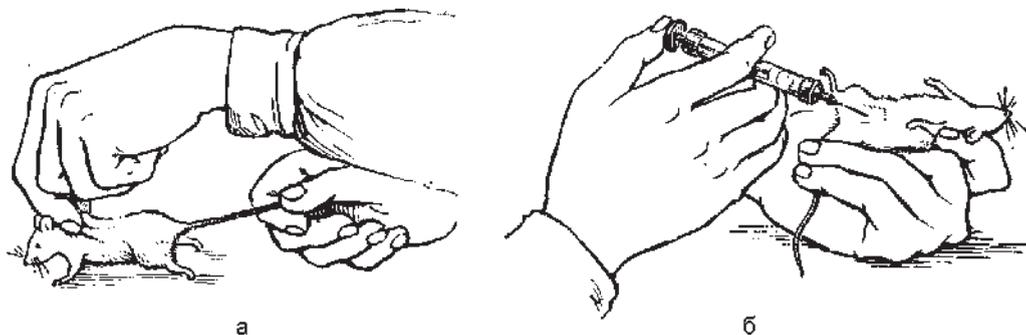


Рис. 33. Зараження миші в черевну порожнину: а – фіксація; б – введення.

щурам – 3 мл, гвінейським свинкам – 5 мл і кроликам – 10 мл. Цей метод застосовують для швидкого відтворення інфекційного процесу. Його не слід використовувати, якщо досліджуваний матеріал містить багато сторонніх мікробів (грунт, вміст кишечника тощо), щоб не викликати смертельний перитоніт.

Внутрішньовенний спосіб введення. У різних видів тварин при цьому користуються різними венами: кроликів заражають у крайову вену вуха, мишей і щурів – у вену хвоста, гвінейських свинок – у вену стегна, попередньо надрізавши шкіру та відсепарувавши її. Для внутрішньовенних ін'єкцій використовують голки з довгим косим зрізом. Найлегше цей спосіб здійснюється на кроликах завдяки поверхневому розташуванню вушних вен. Перед введенням матеріалу тварину фіксують у спеціальному боксі (рис. 34) або обгортають рушником. Впродовж зовнішнього краю вуха вищипують шерсть, злегка вдаряють кінчиками пальців, або змазують ксилолом, щоб вени краще набрякли, протирають 70° спиртом. Помічник великим пальцем лівої руки натискає на вену біля основи вуха, щоб викликати ще більший застій крові. Голку вколюють у вену в напрямку від периферії до центру, тримаючи її майже паралельно до поверхні вуха (рис. 35).

Спочатку вводять невелику кількість матеріалу, щоб перевірити чи правильно вставлена голка. Якщо вона дійсно знаходиться у вені, рідина вводиться легко. Якщо ж при введенні невеликої кількості матеріалу виникає здуття навколо вени – голка в неї не потрапила. Тоді її виймають і знову вводять у вену ближче до основи вуха. Після ін'єкції рідини вену нижче проколу злегка притискають, на місце

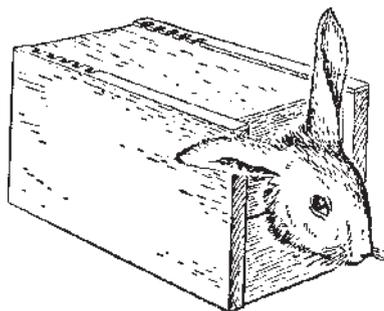


Рис. 34. Бокс для фіксації кроля.

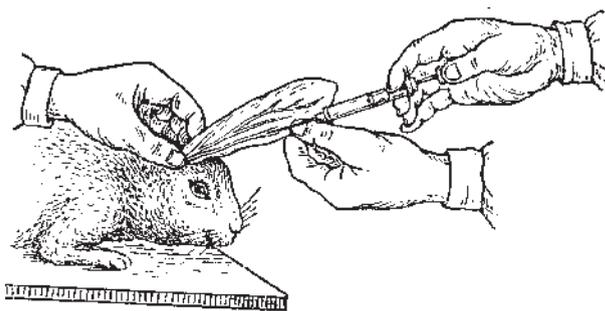


Рис. 35. Внутрішньовенне введення.

уколу прикладають вату, змочену спиртом, голку виймають. Кровотеча припиняється досить швидко.

При внутрішньовенному зараженні щурів і мишей користуються тонкими короткими (туберкуліновими) голками з косим зрізом. Перед введенням матеріалу хвіст тварини занурюють у теплу воду (50°C), щоб викликати гіперемію. Корінь хвоста затискають пальцями, голку вколюють в одну з бокових вен у нижній її третині, тримаючи шприц майже паралельно осі хвоста. Голку повертають зрізом наверх. Коли вона введена у вену, перестають натискати на корінь хвоста і вводять матеріал. Цей спосіб дуже часто використовують при визначенні сили токсинів (рис. 36).

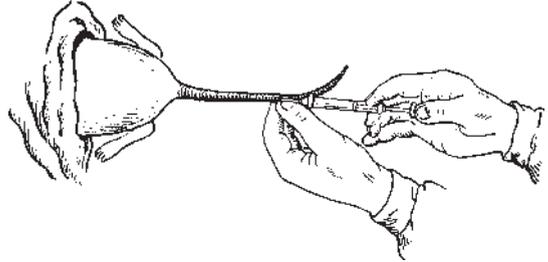


Рис. 36. Введення токсину миші.

У курей і голубів зручно використовувати вени, які розташовані на внутрішній поверхні крил. Після вищипування пір'я вони стають чітко видимі.

Ентеральне зараження. Найпростіше провести зараження через рот природним шляхом, добавляючи інфекційний матеріал до корму тварин. Але при цьому досить важко точно визначити інфікуючу дозу. У зв'язку з цим частіше зараження проводять примусово. Мишу чи щура тримають вертикально (рис. 37). Культуру бактерій або інший заразний матеріал вводять за допомогою шприца, голка якого має незначну кривизну й напаяну на кінці оливу. Рот відкривають пінцетом. Кількість матеріалу, що вводять у шлунок мишей, становить 0,5-0,7 мл, для щурів – 2-3 мл.

Кроликам і гвінейським свинкам заразний матеріал вводять через рот спеціальним катетером або гумовою трубкою довжиною 7-8 см і шириною 0,3-0,5 см. Перед введенням трубки в рот вставляють дерев'яну планку з отвором посередині. Через цей отвір обережно вводять у стравохід катетер, змазаний вазеліном. Щоб полегшити його проходження по стравоходу в рот тварини піпеткою вливають декілька крапель фізіологічного розчину хлориду натрію. Це викликає ковтальні

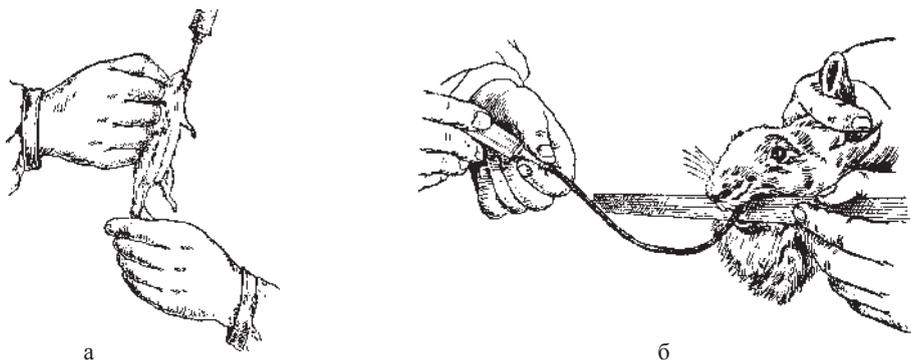


Рис. 37. Ентеральне зараження миші (а) і кролика (б).

рухи, під час яких трубка легко рухається по стравоходу й потрапляє до шлунка. Зовнішній кінець катетера приєднують до шприца, наповненого певною дозою заразного матеріалу. Його повільно вводять безпосередньо у шлунок в об'ємі 2,5-3,5 мл гвінейським свинкам і 3,5-5,0 мл кроликам.

Інтраназальне зараження. Існує декілька способів зараження тварин через дихальні шляхи, при яких матеріал вводять або за допомогою інгаляції, або спеціальними зондами безпосередньо в трахею чи бронхи. Однак їх використовують рідко. Найпростішим способом, який можна відтворити в будь-якій баклабораторії, є закапування заразного матеріалу або культури бактерій в носові ходи тварин під легким ефірним наркозом. За допомогою шприца матеріал вводять краплями в носові ходи мишей на глибину 1,0-1,5 мм, білих щурів – 2-3 мм, кроликів і гвінейських свинок – 3,5-4,0 мм. Щоб не пошкодити слизову оболонку, використовують абсолютно тупі голки. За допомогою цього методу можна заражати мишей збудником кашлюку, міксовірусами, гвінейських свинок – рикетсіями та ін. Максимальний об'єм матеріалу, що вводиться, становить для мишей 0,03-0,05 мл, для щурів – 0,05-0,1 мл, для кроликів і гвінейських свинок – до 2 мл.

Інтрацеребральне зараження. Кроликам і гвінейським свинкам роблять трепанацію черепа й заразний матеріал вводять через трепанаційний отвір безпосередньо в мозок або під тверду мозкову оболонку (субдурально). Шкіру в місці трепанації вистригають від шерсті, протирають спиртовим розчином йоду. Потім її зміщують вбік і роблять розріз довжиною 1-3 см, паралельно осі черепа трохи вище задньої орбітальної лінії. Спеціальним інструментом – трепаном – роблять у кістці круглий отвір, через який вставляють голку і легким повільним натиском на поршень шприца вводять 2-3 краплі матеріалу. Отвір у кістці закривають, змістивши на місце шкіру, на яку накладають шви.

Зараження щурів і мишей проводять без трепанації за допомогою туберкулінового шприца з тонкою, тупо обрізаною голкою. На останню надівають металеву муфточку, яка обмежує проникнення голки в мозок лише на глибину 1,5-2 мм. Мишу тримають лівою рукою так, щоб великий і вказівний пальці відтягували шкіру голови в напрямку до шиї, а між мізинцем і безім'яним пальцями утримувався хвіст. У місці проколу шкіру обробляють спиртовим розчином йоду, потім повільно вводять матеріал щоб не викликати раптово підвищення внутрішньочерепного тиску. Цей спосіб на мишах-сисунках використовують для діагностики вірусних енцефалітів, геморагічних гарячок, коксакі-інфекції та ін.

При визначенні результатів дослідів тварин, які загинули протягом першої доби, не враховують, оскільки їх загибель виникла від травматичних ушкоджень.

Зараження в передню камеру ока. При цьому способі матеріал вводять на кон'юнктиву або в передню камеру ока. Найкраще цю операцію виконати на кроликах. Попередньо в кон'юнктивний мішок закапувають 2 % розчин новокаїну. Тварину фіксують спиною доверху. Через 1-2 хв тонким очним пінцетом захоплюють складку кон'юнктиви зовні від поверхневого краю рогівки. Потім вводять тонку голку в рогівку біля її краю (лімба) і просувають у центральному напрямку до тих пір, поки в просвіті голки не появиться рідина з передньої камери ока. Після вито-

ку 2-3 крапель рідини на голку насаджують шприц і вводять інфікуючий матеріал в об'ємі не більше 0,05 мл. Голку швидко виймають, маленька ранка сама закривається. Око промивають стерильною водою або 3 % розчином борної кислоти.

З діагностичною метою часто ставлять так звану кератокон'юнктивну пробу на гвінейських свинках. З цією метою у кон'юнктивний мішок вводять петлю агарової культури (або краплю бульйонної), не травмуючи рогівку. Одні бактерії (шигели) викликають кератит, інші (сальмонели) – кон'юнктивіт. Поява виразки на рогівці або її помутніння виникають на 2-5 добу. Пробу використовують для визначення належності культури до роду шигел. Такий спосіб на кролях використовують для відтворення герпетичної інфекції.

Утримання заражених тварин. Після зараження лабораторні тварини називаються “піддослідними”. Їх утримують в ізольованому приміщенні (віварії), окремо від розплідника, де розміщені здорові тварини. Приміщення для піддослідних тварин повинно бути теплим (10-15 °С) і сухим. Слід пам'ятати, що кролики чутливі до вогкості, білі миші – до холоду, а гвінейські свинки і до вогкості, і до холоду. Дрібних тварин після зараження вміщують у високі скляні банки, які закривають металевими сітками, а кроликів і свинок – у клітках. Банки і клітки повинні мати етикетки з позначенням дати зараження або номер експерименту, під яким він записаний в лабораторному журналі. Тварини повинні регулярно отримувати корм із достатнім вмістом вітамінів, воду або молоко. При спостереженні за ними відмічають в'ялість, відсутність апетиту, понос, які є ранніми симптомами захворювання. При огляді тварин змушують рухатись, щоб не пропустити паралічі. Щоденне спостереження дає змогу своєчасно відібрати захворілих тварин для розтину і подальших досліджень.

Мікробіологічне дослідження трупа

Розтин і мікробіологічне дослідження загиблих тварин має велике, часом вирішальне діагностичне значення. Воно проводиться з метою виявлення і визначення локалізації збудника інфекційного захворювання. Трупний матеріал досліджують за допомогою бактеріоскопічних (вірусоскопічних) і бактеріологічних методів. Досліджуваний матеріал беруть під час розтину трупа, яке проводять, дотримуючись встановлених правил.

Розтин трупа та його мікробіологічне дослідження потрібно робити якомога скоріше після смерті. До цього його необхідно зберігати на холоді, оскільки мікрофлора кишечника при низькій температурі повільніше проникає в кров, тканини й паренхіматозні органи. Розтин трупа та забір матеріалу необхідно проводити в умовах, які виключають його забруднення сторонніми мікроорганізмами. Взятий матеріал до посіву не повинен контактувати з дезінфікуючими речовинами, а після посіву – незаражуватись. Результати досліджень обов'язково протоколюються. Під час розтину трупа та дослідження його матеріалів необхідно абсолютно попередити всіляку можливість інфікування як самих працюючих, так і інших осіб, а також контамінації оточуючого середовища.

Тварин, що загинули від експериментальної інфекції, також досліджують з дотриманням правил асептики. При цьому використовують лише стерильні інструменти. Їх переносять із стерилізатора в склянку зі спиртом і ватою на дні, перед кожним використанням обпалюють на вогні.

Загиблу тварину захоплюють пінцетом, кладуть спиною донизу на дерев'яну дощечку, вміщену в металеву клівету з дезрозчином. До дощечки її прикріплюють булавками або гострими гвіздочками за чотири лапки, широко розтягуючи її. Шкіру в місці розтину змочують дезінфікуючим розчином, щоб не розліталась шерсть, яка містить автохтонну мікрофлору. Групи тварин, які загинули від чуми та інших особливо небезпечних інфекцій, перед розтином занурюють у керосин для інактивації комах – переносиків хвороби. Перед першим розрізом шкіру ретельно протирають дезрозчином, спиртом або обпалюють полум'ям газового пальника.

Розтин і дослідження трупа тварини проводять у певній послідовності: спочатку розрізають і досліджують зовнішні покриви, потім грудну й черевну порожнини.

Розтин зовнішніх покривів починають з розрізу шкіри від нижньої щелепи до лобка, потім роблять бокові надрізи в напрямку до лапок. Шкіру відсепаровують і відкидають в обидва боки, відкриваючи всю передню поверхню тіла (рис. 38). В підшкірній клітковині відмічають такі зміни як гіперемію судин, крововиливи, набряки, стан лімфатичних вузлів. При їх збільшенні або нагноєнні роблять посіви на живильні середовища та мазки-відбитки, притискаючи поверхню розрізу вузла до предметного скла.

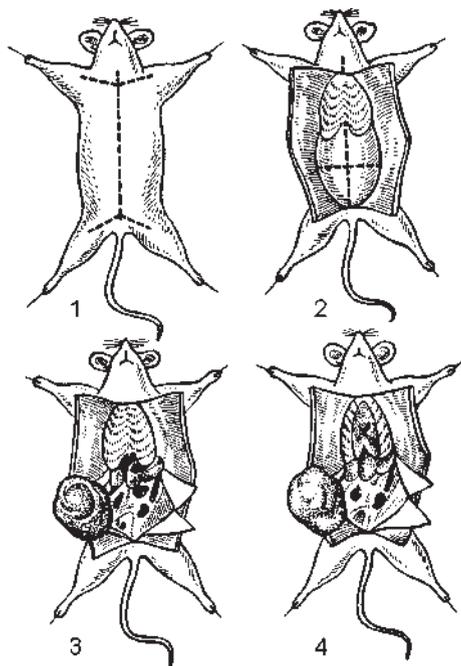


Рис. 38. Послідовні етапи розтину білої миші.

Перед розтином грудної порожнини її відкриту від шкіри поверхню змочують спиртом і запалюють. Пінцетом захоплюють мечоподібний відросток, роблять поперечний надріз під ним, вставляють ножиці і проводять два бокові розрізи в місцях сполучення ребер із грудною кісткою. Утворений лоскут відкривають доверху й оглядають легені та серце, відмічають наявність ексудату. Обов'язково роблять посів крові з серця. Для цього розжареним скальпелем припікають стінку шлуночка або передсердь і в даній ділянці роблять прокол пастерівською піпеткою з тонко відтягнутим у полум'ї пальника кінцем. Кров, що потрапила в капіляр, сіють в цукровий бульйон і на агар, а із залишку роблять мазки. При потребі проводять також посіви та роблять мазки-відбитки з легень, плеври та ексудату.

Розтин і дослідження черевної порожнини проводять дуже обережно, щоб не пошкодити кишечник. Черевну стінку захоп-

люють і трохи підіймають вверху, ножицями розрізають її від діафрагми до лобка і по два бокових надрізи в напрямку до лапок. Утворені лоскути відвертають в обидва боки. Оглядають внутрішні органи, відмічаючи в протоколі величину, колір і консистенцію печінки, селезінки, нирок, надниркових залоз, лімфатичних вузлів брижі та наявність ексудату.

В разі потреби роблять посіви тканин вказаних органів та ексудату. Для цього припікають поверхню органа розжареним скальпелем і в цій ділянці проводять розріз. Бактеріологічною петлею з поверхні розрізу роблять зскрібок паренхіми і сіють на живильні середовища. Для виготовлення мазків-відбитків вирізають шматочок органа й поверхню розрізу притискають до предметного скла, або розмазують по ньому тонким шаром.

Трупи тварин і залишки органів після бактеріологічного дослідження спалюють або стерилізують. Якщо тварини загинули від особливо небезпечних інфекцій, їх розтини й посіви проводять у спеціальних режимних лабораторіях із дотриманням особливо пильних заходів безпеки.

Вирощування посівів, виділення чистих культур та визначення видів збудників проводять за загально прийнятими методами.

Визначення вірулентності мікроорганізмів, смертельної дії екзотоксинів та ендотоксинів

Майже в усіх бактеріологічних лабораторіях в дослідках на тваринах часто визначають патогенні й вірулентні властивості збудників інфекційних захворювань. Патогенність – це потенційна здатність певного виду мікроорганізмів викликати інфекційний процес. Вона не є абсолютною і стабільною. Ступінь або міру патогенності визначають вірулентністю. Для її кількісного визначення запропоновані три умовні одиниці вірулентності.

1. *Dosis letalis minima* (DLM) – мінімальна смертельна доза, тобто найменша кількість живих мікроорганізмів або найменша доза токсину, яка здатна викликати загибель 95 % тварин стандартної маси і віку через певний проміжок часу. Ця величина відносна й залежить від виду тварин. DLM для мишей, щурів, гвінейських свинок і кроликів буде різною.

2. *Dosis certa letalis* (DCL) – безумовно смертельна доза, яка викликає загибель 100 % взятих у дослід тварин; вона також є відносною.

3. *Dosis letalis*₅₀ (DL₅₀) – кількість мікроорганізмів (або токсину), яка викликає загибель 50 % взятих у дослід тварин. Остання величина є статистично найбільш достовірною летальною дозою. Вона визначається на основі обробки конкретних результатів загибелі тварин за методом Ріда і Менча, у якому реалізуються кумулятивні принципи обліку результатів.

Інколи визначають і мінімальну інфікуючу дозу (ID₅₀), тобто найменшу кількість мікробів, яка викликає захворювання у 50 % заражених тварин.

Титування мінімальних смертельних доз, як правило, проводять на білих мишах як найбільш доступних і дешевих тваринах (рідко на гвінейських свинках

і кроликах). Мікроби (токсини) вводять внутрішньоочеревинно або внутрішньовенно. Щоб отримати стабільні результати використовують тварин стандартної маси і віку. Мишей відбирають масою 16-18 г, гвінейських свинків – 200-250 г, кроликів – 1500 г.

Завись бактерій для зараження готують із молодих агарових культур після 18-20 год їх вирощування в термостаті. Для цього в пробірку з культурою на скошеному агарі вносять 5 мл ізотонічного розчину хлориду натрію й ретельно струшують. Частина густого змиву переносять в іншу пробірку такого ж діаметру як і пробірка зі стандартом мутності. Завись розводять 0,85 % розчином хлориду натрію до мутності, яка відповідає вибраному стандарту.

Централізованим шляхом готують такі еталонні стандарти мутності: № 5 – на п'ять одиниць мутності, що відповідає 500 млн мікробів у 1 мл; № 9 – 900 млн мікробів у 1 мл; № 10 – 1 млрд мікробів у 1 мл; № 11 – 1,1 млрд мікробів у 1 мл. Виготовляють також стандарти мутності для коклюшних бактерій на 9, 10 і 11 млрд мікробів у 1 мл.

При визначенні вірулентності мікроорганізмів, як правило, виготовляють вихідну завись, в якій знаходиться 1 млрд бактерій в 1 мл. Тоді для введення миші 100 млн мікробів беруть 0,1 мл зависі, для введення 200 млн – 0,2 мл і т.д. Стандартизовані зависі готують так, щоб бажані дози бактерій містились в однакових об'ємах, а загальної кількості їх повинно вистачити на всю групу тварин (наприклад, по 0,2 мл на 4-6 тварин).

Через 24-48 год після зараження відмічають кількість тварин, що загинули в кожній групі і вираховують DL_{50} за методом Ріда і Менча.

Наприклад, із наведених в таблиці даних видно, що DL_{50} знаходиться між розведеннями зависі мікробів 10^{-5} і 10^{-6} . Для точного підрахунку DL_{50} визначають величину x , яку додають до логарифму того розведення, яке менше 50 % дози (у наведеному прикладі 5) за формулою:

$$X = \frac{A - 50}{A - B},$$

де A – % тварин, які загинули від розведення менше 50 % (у даному випадку 66,7 %); B – % тварин, що загинули від розведення більше 50 % дози (за даними таблиці – 33,3 %). Підставивши у формулу отримані числові значення, одержимо

$$X = \frac{66,7 - 50}{66,7 - 33,3} = 0,5.$$

Таблиця 11

Обчислення DL_{50} за методом Ріда і Менча

Розведення зависі мікробів	Кількість заражених тварин	З них		% тварин, що загинули
		загибло	вижило	
10^{-4}	6	6	0	100
10^{-5}	6	4	2	66,7
10^{-6}	6	2	4	33,3
10^{-7}	6	0	6	0

Отже, DL_{50} відповідатиме розведенню за висі $10^{-5,5}$. Враховуючи, що при серійних розведеннях послідовно з пробірки в пробірку переноситься 0,1 мл матеріалу (тобто, додається до 0,9 мл ізотонічного розчину), в 1 мл вихідної за висі бактерій міститься $10^{6,5} DL_{50}$.

Розділ 7

ГЕНЕТИКА БАКТЕРІЙ

Генетика бактерій та вірусів – наука, що вивчає механізми успадковування генетичних ознак та їх фенотипові прояви. Генетичний апарат прокариотів побудований із двоспіральної суперспіралізованої ДНК. Сукупність генів нуклеоїду і позахромосомних факторів зумовлює генотип бактерій, а фенотип – це індивідуальний вияв генотипу в конкретних умовах існування.

Розрізняють два види мінливості мікроорганізмів: неспадкову, або модифікаційну та спадкову, або генотипову. Неспадкова мінливість виникає під впливом факторів зовнішнього середовища (зміна морфології клітини, поява L-форм тощо). Модифікаційні зміни нетривалі, після припинення дії агента вони зникають. При генотиповій мінливості різноманітні ознаки бактерій успадковуються. Ця мінливість виникає внаслідок мутацій, трансформацій, коньюгацій і трансдукцій.

Вивчення модифікаційної мінливості бактерій. Готують 2 чашки Петрі, одна з яких містить м'ясо-пептонний агар з 0,1 % фенолу, інша – звичайний МПА. На поверхню чашок засівають культуру *Proteus vulgaris*. Посіви інкубують у термостаті при температурі 37 °С протягом доби. Потім вивчають особливості росту мікробів на поверхні агару, роблять мазки, забарвлюють їх за Грамом і розглядають під імерсійним об'єктивом. На контрольному середовищі (МПА) вульгарний протей представлено невеликими грамнегативними паличками, які мають тенденцію до повзучого росту по поверхні середовища. На агарі з фенолом спостерігається тенденція до утворення ізольованих колоній, в мазках видно ниткоподібні форми бактерій, часом із колбоподібними потовщеннями на кінцях.

Фенол як фактор модифікаційної мінливості може викликати втрату рухливості протеїв. Для її перевірки добову культуру *P. vulgaris* засівають у дві пробірки: одна з них містить звичайний МПБ (контроль), інша – 0,1 % феноловий МПБ. Через добу культивування при температурі 37 °С у висячій краплі перевіряють рухливість збудників.

У контрольній пробірці вони зберігають рухливість, у дослідній – мікроби нерухомі. Для доведення природи модифікаційної мінливості мікроби засівають на звичайний м'ясо-пептонний агар і після 18-24-годинного культивування перевіряють біологічні ознаки, в яких у цьому випадку спостерігається реверсія.

Метод реплік для виявлення мутантів. На чашку Петрі із повноцінним м'ясо-пептонним агаром за добу до досліду засівають 0,1 мл добової бульйонної

культури *E. coli*, розведеної до 10^{-3} ступеня із розрахунку, щоб виросло 100 колоній. На наступний день готують мінімальне живильне середовище, яке не містить ростових факторів для бактерій (глюкозо-сольовий агар), і чашку з повноцінним середовищем. Для досліду використовують штамп-реплікатор, який представляє собою дерев'яний або металевий циліндр товщиною до 1 см з діаметром дещо меншим, ніж чашка Петрі (рис. 39). Його робоча поверхня вкрита оксамитом, ворсаником або іншим матеріалом, що має дрібні ворсинки. Відкривають чашку Петрі, на якій виросли колонії мікроорганізмів (матрична чашка), і прикладають до неї штамп-реплікатор. Після цього переносять колонії, які прикріпились до ворсинок, на дослідну і контрольну чашки Петрі (чашки-репліки) із відповідними середовищами. Необхідно звернути увагу на

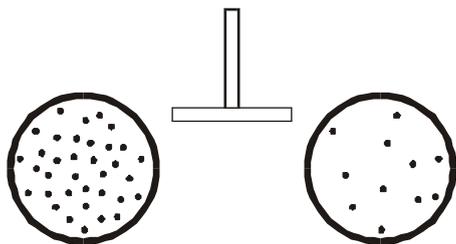


Рис. 39. Метод реплік.

точне фіксування положення штампа-реплікатора на матричній чашці і чашках-репліках. Після добової інкубації при температурі 37°C вивчають колонії, що виросли на чашках і підраховують їх кількість. Відмічають колонії мікроорганізмів, які не виросли на мінімальному живильному середовищі. Вони є ауксотрофними мутантами, тому що нездатні синтезувати відповідні ростові фактори.

Ідентичний експеримент можна поставити для виділення мутантів, які є резистентними до антибіотиків, не потрапляючи попередньо під їх вплив (селекційна дія).

Флуктуаційний тест Лурія і Дельбрюка для виявлення частоти спонтанних мутацій. Для того, щоб виявити частоту спонтанних мутацій, які зумовлюють стійкість до стрептоміцину (Str^r варіанти), відбирають чутливий до цього антибіотика штам *E. coli*. З добової культури бактерій у стерильному ізотонічному розчині хлориду натрію готують суспензію клітин з концентрацією 1000-10000 клітин в 1 мл. Їх засівають у пробірку з 10 мл МПБ і в 10 пробірок з 1 мл аналогічного середовища так, щоб концентрація мікробів коливалась у межах 100-1000 клітин в 1 мл. Після добової інкубації при оптимальній температурі (37°C) з 1-ої пробірки роблять висів по 0,1 мл на 10 чашок Петрі, які містять по 100 ОД стрептоміцину в 1 мл агару. Посів проводять за допомогою шпателя. Вміст інших десяти пробірок також засівають на аналогічні окремі чашки Петрі із стрептоміцином, кожен в об'ємі 0,1 мл, шпателем. Посіви інкубують у термостаті при 37°C протягом 18-20 год.

Якщо стрептоміцинорезистентні кишкові палички утворюються тільки після контакту мікробів із антибіотиком протягом доби, то їх число повинно було б бути приблизно однаковим на всіх 20 чашках Петрі. В іншому випадку, за умови передіснування антибіотикостійких варіантів (мутантних), на чашках виростає неоднорівна кількість колоній мікроорганізмів. Це є прояв коливань (флуктуацій) кількості мутантних клітин залежно від часу формування мутацій.

Висів мікробів із пробірки, де знаходилось 10 мл живильного середовища, не дає таких флуктуацій мутантів, оскільки клітини рівномірно розподіляються в живильному середовищі.

Моделювання трансформації в мікроорганізмів. У досліді використовується стрептоміциночутлива сінна паличка (*Bac. subtilis Str^s*) і донорська ДНК аналогічного мікроба, яка має гени, що кодують стійкість клітини до антибіотиків.

У стерильну пробірку наливають 0,5 мл бульйонної культури штама-реципієнта *Bac. subtilis* і додають 0,5 мл донорської ДНК з концентрацією 1 мкг/мл. Суміш інкубують у термостаті при 37 °С протягом 20-30 хв, потім додають 0,5 мл розчину хлориду магнію для руйнування ДНК, що не встигла проникнути в клітину-реципієнт. Роблять серійні 10-кратні розведення трансформованої культури у стерильному ізотонічному розчині хлориду натрію до 10^{-5} - 10^{-6} і проводять посіви матеріалу в об'ємі 0,1 мл за допомогою шпателя паралельно на чашки без антибіотика і з 100 ОД/мл стрептоміцину.

Після інкубації протягом 18-24 год при температурі 37 °С оцінюють результати досліді, вираховуючи частоту трансформації.

Наприклад, після посіву штама-реципієнта, який було розведено в 10000 (10^{-5}) разів, на поверхні середовища виросло 120 колоній бацил ($1,2 \cdot 10^8$ /мл). Посів 0,1 мл нерозведеного рекомбінантного штаму на середовище із стрептоміцином дав ріст 60 колоній ($6,0 \cdot 10^2$ /мл). Отже, частота трансформації (ЧТ) дорівнюватиме :

$$\text{ЧТ} = \frac{6,0 \cdot 10^2}{1,2 \cdot 10^8} = 5 \cdot 10^{-6}$$

Таким чином, генетичні феномени знаходять широке практичне застосування в різних галузях науки, техніки, медицини, фармацевтичної промисловості, біотехнології, сільського господарства тощо.

Розділ 8

ВИЗНАЧЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ БАКТЕРІЙ ДО АНТИБІОТИКІВ

Антибіотики – це речовини мікробного, рослинного або тваринного походження, їх напівсинтетичні та синтетичні аналоги і похідні, що вибірково пригнічують життєдіяльність мікроорганізмів, вірусів, найпростіших, грибів, а також затримують ріст пухлин.

Антибіотикам притаманна висока біологічна активність. Вони спричиняють біологічний ефект у дуже малих кількостях (наприклад, пеніцилін викликає виражену бактерицидну дію на бактерії у концентрації 0,000001 г/мл). Антибіотики мають високу вибіркочувачу специфічність, оскільки проявляють свою дію тільки

відповідно до певних груп організмів, не завдаючи шкоди іншим. Так, бензилпеніцилін затримує ріст грампозитивних бактерій (стафілококів, стрептококів) і практично не впливає на грамнегативні мікроби, гриби.

Біологічну активність антибіотиків оцінюють в умовних одиницях, які містяться в 1 мл розчину (ОД/мл) або в 1 мг препарату (ОД/мг). У таких антибіотиків, як еритроміцин, новобіоцин, ністатин, трихоцетин та ін. одна одиниця активності еквівалентна 1 мкг препарату. За одиницю антибіотичної активності пеніциліну приймають мінімальну кількість препарату, здатну затримувати ріст штаму *Staphylococcus aureus* 209 у 50 мл поживного бульйону. Активність стрептоміцину вимірюється мінімальною кількістю антибіотика, який інгібує ріст *Escherichia coli* в 1 мл поживного бульйону. Фактично для більшості антибіотиків 1 ОД відповідає 1 мкг хімічно чистого препарату. Однак є антибіотики, для яких існують винятки. Так, наприклад, для пеніциліну 1 ОД відповідає 0,6 мкг, поліміксину В – 0,1 мкг, ністатину – 0,333 мкг хімічно чистих антибіотиків.

Оцінка чутливості мікробів до антибіотиків та вивчення їх фармакокінетики в організмі хворого є основними лабораторними показниками, які при їх співставленні дозволяють прогнозувати ефективність антибактеріальної терапії. Крім того, результати визначення антибіотикочутливості використовують як маркер, що дозволяє виявляти та контролювати зміни антибіотикограми збудників у динаміці, використовувати детермінанти резистентності, які найчастіше зустрічаються, або їх сполучення як додаткові маркери при діагностиці внутрішньолікарняних інфекцій, для виявлення джерел інфікування та шляхів розповсюдження полірезистентних штамів. Такі дані, одержані та узагальнені у різних регіонах країни протягом фіксованих проміжків часу, використовуються при формуванні політики антибактеріальної терапії та визначенні номенклатури антибіотиків, які випускаються в країні.

Найрозповсюдженішими методами визначення антибіотикочутливості збудників інфекцій є диско-дифузійний (метод дисків) та серійних розведень.

Живильні середовища для визначення чутливості бактерій до антибіотиків повинні відповідати таким вимогам:

- бути стандартними та забезпечувати оптимальні умови росту мікроорганізмів;
- не містити інгібіторів бактеріального росту і великої кількості стимуляторів;
- не мати речовин, що пригнічують активність препаратів.

На результати дослідження може суттєво впливати значення рН середовища. Найдоцільніше вибрати нейтральне або дещо лужне середовище (рН 7,0-7,4), оскільки ці значення придатні для більшості антибіотиків. При визначенні чутливості бактерій використовують бульйон і 1,5-2 % агар на переварі Хоттінгера, звичайний м'ясо-пептонний бульйон і 1,5-2 % агар на ньому, середовище АГВ (агар Гівенталя-Ведьміної), агар Mueller-Hinton 2. Вони придатні при визначенні антибіотикочутливості стафілококів, ентеробактерій, псевдомонад. Однак стрептококи та гемофільні бактерії вимагають добавки ростових факторів; дріжджі та анаеробні бактерії – спеціальних середовищ і певних умов культивування. На результати визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків-аміноглікозидів,

поліміксинів, тетрациклінів впливає вміст у живильних середовищах катіонів кальцію, магнію, що особливо важливо при дослідженні *P. aeruginosa*. Оптимальний вміст – 50 мг/л Ca^{2+} і 25 мг/л Mg^{2+} . Більшість середовищ, що випускаються країнами СНД, за цим показником, як правило, не стандартизуються. Це призводить до суттєвих коливань вмісту двовалентних катіонів у різних серіях середовищ, навіть якщо вони випускаються одним підприємством, і спотворює результати.

Диско-дифузійний метод визначення антибіотикочутливості є найпростішим якісним методом і широко використовується для епідеміологічного контролю резистентності. Достовірність результатів забезпечується шляхом стандартизації проведення тесту на всіх етапах дослідження: вибір і виготовлення живильних середовищ із врахуванням всіх властивостей можливих збудників, взяття проб і умови їх доставки, виготовлення і розливання посівного матеріалу на поверхню агару, вибір дисків (використання набору дисків у відповідності до виду виділеного збудника та локалізації інфекції).

Чутливість мікроорганізмів до антибіотиків слід визначати тільки у чистій культурі. Однак у ряді випадків для швидкого одержання орієнтовних даних про антибіотикограму бактерій використовують безпосередньо патологічний матеріал. Щільні субстрати (харкотиння, гній, кал та ін.) розтирають, рідини (сеча, екsudати та ін.) центрифугують, а для посіву використовують осад. Досліджуваний матеріал наносять на поверхню живильного середовища петлею або ватним тампоном. Після одержання чистої культури дослідження повторюють.

Для виготовлення інокулюму 5-10 однорідних колоній суспендують у 2 мл рідкого середовища або фізіологічного розчину. Бактеріальну суспензію (10^3 - 10^5 КУО/мл залежно від виду мікробів) в об'ємі 1 мл рівномірно розподіляють по поверхні середовища при похитуванні чашки, надлишок рідини видаляють піпеткою. Чашки підсушують при кімнатній температурі протягом 20-30 хв, а потім на них на однаковій віддалі кладуть диски з антибіотиками.

Рівномірність газону, яка визначається величиною посівної дози, – найголовніший фактор одержання достовірних результатів і підлягає кількісній оцінці та якісній стандартизації. Ступінь нестандартності результатів дослідження, який пов'язаний із зміною величини дози інокулюму, варіює залежно від виду збудників, властивостей антибіотика та інших факторів. При невеликій дозі інокулюму при визначенні чутливості до бета-лактамних препаратів пеніциліназо-утворюючих бактерій можна одержати великі розміри зон затримки росту, які створюють уявлення про високу чутливість штамів. І, навпаки, розмір зон різко знижується при збільшенні щільності інокулюму. Вирішальне значення має його величина при визначенні чутливості до бета-лактамних антибіотиків метицилінорезистентних варіантів стафілококів внаслідок гетерогенності їх саме за показником чутливості. Для виявлення стійкості до метициліну необхідно дотримуватись певних температурних режимів (30-35 °С). Оскільки ці стафілококи повільніше ростуть при 37 °С, слід їх культивувати на середовищах з додаванням 5 % хлориду натрію. Результати враховують через 24 та 48 год (рис. 40). Для контролю стандартності проведення досліджень у кожному досліді використовують тест-культури з відо-

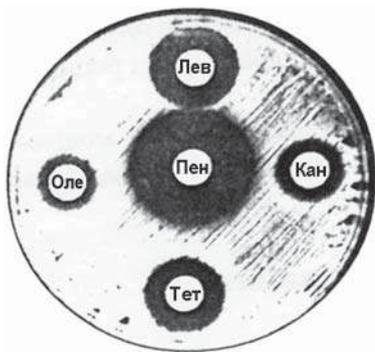


Рис. 40. Визначення антибіотико-чутливості за допомогою методу стандартних дисків.

діаметрах зон затримки росту це може бути джерелом помилок і впливати на кількісну інтерпретацію результатів. Правильний підбір набору дисків є фактором, який визначає коректність досліджень і, без сумніву, інтерпретацію резуль-

мою чутливістю до антибіотиків. ВООЗ рекомендує три штами типових культур: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*. При визначенні антибіотикочутливості виділених штамів слід співставляти отримані дані з розмірами зон пригнічення росту навколо дисків з антибіотиками для контрольних культур (табл. 12). Їх порівнюють з допустимими контрольними значеннями.

Якщо діаметри зон пригнічення росту контрольних штамів знаходяться у певних межах, це свідчить про достатню стандартизацію і точність проведених експериментів. Не слід розміщати на чашці Петрі понад 6 дисків, так як при великих

Таблиця 12

Граничні межі діаметрів зон затримки росту еталонних штамів

Антибіотики	Діаметри зон затримки росту, мм					
	на середовищах № 1 і № 2			на середовищі АГВ		
	S. aureus ATCC 25923	E. coli ATCC 25922	P. aeruginosa ATCC 27853	S. aureus ATCC 25923	E. coli ATCC 25922	P. aeruginosa ATCC 27853
1	2	3	4	5	6	7
Бензилпеніцилін	-	-	-	29-38	-	-
Ампіцилін	24-35	13-20	-	30-36	14-20	-
Карбеніцилін (25 мкг)	-	-	-	32-38	19-25	-
Карбеніцилін (100 мкг)	-	21-26	20-24	35-42	23-29	18-24
Метицилін	-	-	-	22-30	-	-
Оксацилін	27-32	-	-	24-30	-	-
Цефалотин	24-37	15-22	-	30-40	15-20	-
Стрептоміцин	17-25	14-22	-	20-25	14-19	-
Неоміцин	19-27	18-24	-	20-27	13-17	-
Канаміцин	20-27	18-26	-	20-27	15-19	-
Гентаміцин	20-28	20-27	16-24	22-32	21-30	16-26
Тетрациклін	20-29	19-26	-	22-31	17-26	-
Еритроміцин	23-31	-	-	22-31	8-15	-
Олеандоміцин	20-29	-	-	22-29	-	-
Лінкоміцин	24-32	-	-	24-32	-	-
Левоміцетин	21-27	26-28	-	19-25	19-27	-
Рифампіцин	-	-	-	26-34	7-11	-
Поліміксин	-	12-17	-	-	16-20	15-20
Ристоміцин	14-18	-	-	12-16	-	-

татів. Орієнтовні дані щодо вибору наборів дисків із врахуванням виду виділеного збудника і локалізації інфекції наведено у таблиці 13.

Таблиця 13

Основні набори дисків, які рекомендуються для визначення чутливості залежно від виду виділеної культури та патологічного матеріалу

Антибіотики	Попереднє вивчення чутливості мікрофлори			Дослідження чистої культури (штами)			
	харко-тиння	гною	сечі	стафіло-коків	стреп-тококів	ентеро-бактерій	псевдо-монад
Бензилпеніцилін	+	+		+	+		
Метицилін, Оксацилін	+	+		+	+		
Ампіцилін	+		+			+	
Карбеніцилін (25 мг)			+			+	
Карбеніцилін (100 мг)			+				+
Цефалексин	+	+	+	+	+	+	
Цефалотин	+	+		+	+	+	
Еритроміцин	+			+	+		
Олеандоміцин	+			+	+		
Лінкоміцин				+	+		
Ристоміцин				+			
Фузидин				+			
Стрептоміцин						+	
Канаміцин		+		+		+	
Гентаміцин		+		+		+	+
Тетрациклін	+	+		+	+	+	
Левоміцетин	+	+	+			+	
Поліміксин						+	+

Примітка. * – антибіотики, чутливість до яких визначають у першу чергу.

Оцінку результатів проводять за таблицею 14, яка містить граничні значення діаметрів зон затримки росту для резистентних, помірно резистентних та чутливих штамів, а також значення мінімальної пригнічуючої (інгібуючої) концентрації (МПК, МІК) антибіотиків для стійких і чутливих штамів.

Одержані значення діаметрів зон затримки росту порівнюють з контрольними значеннями таблиці 14 і відносять досліджувані штами до однієї з трьох категорій чутливості.

Метод дифузії за допомогою дисків є якісним методом. Він дозволяє встановити лише факт чутливості або резистентності збудників інфекції. Однак встановлений корелятивний зв'язок розмірів зон пригнічення росту досліджуваних штамів і значень МІК (мінімальна концентрація препарату, яка інгібує ріст досліджуваного штаму) антибіотиків дозволяє оцінити ступінь чутливості і кількісно, використовуючи дані, наведені у таблиці 14. За своїм ступенем чутливості до антибіотиків мікроорганізми поділяються на три групи:

Таблиця 14
Граничні значення діаметрів зон затримки росту і значення МПК антибіотиків для інтерпретації результатів

Антибіотики	Вміст антибіотика в диску, мкг	Код диску	Діаметри зон для середовища АГВ, мм			МПК, мкг/мл	
			стійкі	помірно-стійкі	чутливі	стійкі	чутливі
Бензилпеніцилін: при дослідженні стафілококів при дослідженні інших мікробів	6	ПЕН	≤20	21-28	≥29	-	≤0,1
			≤10	11-16	≥17	-	≤1,5
Ампіцилін при дослідженні: стафілококів грамнегативних бактерій та ентерококів	10	АМП	≤20	21-28	≥29	-	≤0,2
			≤9	10-13	≥14	≥32	≤8
Карбенцилін при дослідженні: кишкової палички та протеза синьогнійної палички	25 100	КАР	≤14	15-18	≥19	≥32	≤16
			≤11	12-14	≥15	≥250	≤125
Метицилін	10	МЕТ	≤13	14-18	≥19	-	≤3
Оксацилін	10	ОКС	≤15	16-19	≥20	-	≤3
Цефалексин	30	ЦФЛ	-	-	-	≥32	≤10
Цефалотин	30	ЦФТ	≤14	15-18	≥19	≥32	≤10
Стрептоміцин	30	СТР	≤16	17-19	≥20	≥15	≤6
Неоміцин	30	НЕО	≤12	13-16	≥17	-	≤10
Канаміцин	30	КАН	≤14	15-18	≥19	≥25	≤6
Мономіцин	30	МОН	≤13	14-17	≥18	-	≤10
Гентаміцин	10	ГЕН	≤15	-	≥16	≥6	≤4
Сизоміцин	10	СИЗ	-	-	-	≥6	≤4
Тетрациклін	30	ТЕТ	≤16	17-21	≥22	≥12	≤2
Доксициклін	10	ДОК	-	-	-	≥12	≤2
Еритроміцин	15	ЕРИ	≤17	18-21	≥22	≥8	≤2
Олеандоміцин	15	ОЛЕ	≤16	17-20	≥21	≥8	≤2
Лінкоміцин	15	ЛІН	≤19	20-23	≥24	≥8	≤2
Левоміцетин	30	ЛЕВ	≤15	16-18	≥19	≥16	≤8
Рифампіцин	5	РІФ	≤12	13-15	≥16	≥8	≤2
Фузідин	10	ФУЗ	-	-	-	≥16	≤2
Поліміксин	300 ОД	ПОЛ	≤11	12-14	≥15	≥50 ОД/мл	-
Ристоміцин	30	РІС	≤9	10-11	≥12	-	≤5

1 група – чутливі до антибіотиків (збудники знищуються в організмі при використанні звичайних терапевтичних доз препаратів);

2 група – помірно-резистентні (для них лікувальний ефект може бути досягнутий при використанні максимальних терапевтичних доз препаратів);

3 група – резистентні (бактерицидних концентрацій препаратів в організмі створити неможливо, тому що вони будуть токсичними).

При визначенні стійкості до антибіотиків, близьких за хімічною будовою і спектром антибактеріальної дії, можливе використання клас-диска, просякненого одним з антибіотиків певної групи. Так, за допомогою диска з бензилпеніциліном можна визначати чутливість до біцилінів, феноксиметилпеніциліну; цефалексिनним – до цефазоліну, цефаклору, цефалотину. Однак, не рекомендується використовувати тетрациклінові диски для визначення чутливості до доксицикліну.

Строки та температура зберігання дисків вказані на етикетці упаковок. Диски з малостабільними антибіотиками (бензилпеніциліном, ампіциліном, карбеніциліном, метициліном, оксациліном) слід зберігати при 4 °С або 14 °С. Після того, як флакон із дисками відкрито, його зберігають протягом тижня при 4 °С. Перед застосуванням його протягом 1 год залишають при кімнатній температурі для попередження утворення конденсату на внутрішніх стінках флакона. Диски із простроченим терміном зберігання, де сілікагель має рожевий колір, використовувати не можна.

Метод серійних розведень. Показаннями для визначення антибіотикочутливості за методом серійних розведень є необхідність одержання кількісних даних (переважно при тяжкому перебігу інфекційних процесів) для проведення регульованої антибіотикотерапії.

Встановлення ступеня чутливості мікробів до антибактеріальних препаратів впливає на вибір антибіотика (наприклад, відмова від ліків з високою токсичністю при помірному ступені чутливості збудника до них), його дозування (концентрація антибіотика в крові повинна в 2-3 рази перевищувати його мінімальну пригнічуючу концентрацію по відношенню до збудника) і режим введення. Крім того, її кількісне визначення необхідне також для встановлення бактерицидної дії обраного препарату (як гарантії швидкого терапевтичного ефекту та безрецидивного перебігу) по відношенню до даного збудника.

Існують дві модифікації методу серійних розведень – визначення чутливості на рідкому та густому живильних середовищах. Метод дає можливість визначити МПК препарату для виділеного штаму збудника.

Для визначення антибіотикочутливості за **методом серійних розведень у рідкому живильному середовищі** готують ряд (8-10 і більше) пробірок з двократними послідовними розведеннями препарату (табл. 15).

Середовище попередньо розливають у пробірки по 2 мл. У першу додають 2 мл розчину антибіотика певної концентрації, перемішують і переносять до наступної пробірки, продовжуючи розведення до передостанньої, з якої видаляють 2 мл суміші. Остання пробірка служить контролем росту культури. У тому ж бульйоні, який використовують для розведення антибіотиків, готують суспензію добо-

Таблиця 15

Схема визначення антибіотикочутливості за методом серійних розведень

Компоненти, мл	Пробірки								Контроль бактерій	Контроль антибіотика
	1	2	3	4	5	6	7	8		
МПБ	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Пеніцилін, 100 ОД/мл	2,0	→	→	→	→	→	→	↑	-	2,0
Концентрація антибіотика, ОД/мл	50	25	12,5	6,3	3,2	1,6	0,8	0,4	-	50
Суспензія бактерій, 10^5 /мл	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	-
Інкубація в термостаті при 37 °С 18-24 год										
Результат										

вої агарової або бульйонної культури бактерій з розрахунку 10^5 - 10^6 мікробних тіл в 1 мл залежно від виду збудника. Потім до кожної пробірки з розведеннями, а також до контрольної додають по 0,2 мл виготовленої суспензії. При визначенні чутливості до пеніцилінів пеніциліназоутворюючих стафілококів рекомендують використовувати одночасно велике й мале мікробне навантаження (100, 100000 та вище мікробних тіл в 1 мл). Залежно від величини посівної дози значення МПК препарату може коливатись: при збільшенні дози чутливість знижується за рахунок зростання кількості пеніцилінази, що утворюється в середовищі.

Пробірки інкубують у термостаті при 37 °С протягом 18-24 год. Результати враховують, визначаючи наявність або відсутність росту в середовищі з різними розведеннями препарату. (рис. 41). Остання пробірка, в якій спостерігають затримку росту культури (прозорий бульйон), відповідає МПК (мінімальній пригнічуючій концентрації) або МБсК (мінімальній бактеріостатичній концентрації) препарату відносно даного мікроба і вказує на ступінь його чутливості. Якщо ознаки росту з'являються в усіх пробірках, досліджуваний штам резистентний до максимальної концентрації препарату, яку було взято у дослід. Відсутність росту бактерій в усіх пробірках, крім контрольної, свідчить, що МПК препарату нижча, ніж та, що використовується в досліді.

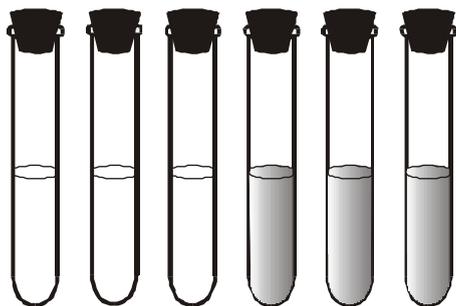


Рис. 41. Визначення антибіотикочутливості методом серійних розведень.

Для визначення бактерицидного ефекту антибіотика з декількох останніх пробірок, в яких немає ознак росту, роблять висів на сектори агару в чашках Петрі. Через 24-48 год інкубації при оптимальній температурі відмічають ту найменшу концентрацію препарату в пробірці, посів з якої не дав росту. Її вважають мінімальною бактерицидною концентрацією (МБцК).

Принцип методу *серійних розведень у густому живильному середовищі* анало-

гічний попередньому. Для цього готують серію розведень антибіотика в агарі, додаючи один об'єм, який містить певну кількість препарату до 9 об'ємів агару. Для цього зручно розлити агар у флакони або широкі пробірки по 13,5 мл. Перед постановкою агар розплавляють на водяній бані і після охолодження до 60-65 °С у кожному пробірці додають 1,5 мл відповідного розведення антибіотика (в бульйоні), ретельно перемішують і виливають у чашку Петрі. У контрольну пробірку з агаром замість розчину антибіотика вносять 1,5 мл дистильованої води. Чашку поділяють на сектори, на кожний з яких засівають досліджуваний штам. Посіви роблять бактеріологічною петлею або пастерівською піпеткою. Для посіву зручно використати спеціальний штамп-реплікатор, який дозволяє нанести одночасно на поверхню агару 25-50 досліджуваних культур. Результати враховують після 18-24 год інкубації в термостаті при оптимальній температурі. За МПК антибіотика для даного штаму приймають ту, при якій відсутні ознаки росту колоній на поверхні агару (або замість пляшки є ріст поодиноких колоній).

З двох способів визначення антибіотикочутливості мікробів до антибіотиків (розведень у густому та рідкому середовищах) більш точним є метод серійних розведень у рідкому середовищі. Результати, які одержують за допомогою розведень в агарі, менш постійні. Метод не слід застосовувати при оцінці чутливості тих мікробів, які дають тонкий, розріджений ріст на поверхні чашки (стрептококи, пневмококи) або, навпаки, мають тенденцію до повзучого росту (протей).

Недоліком методів серійних розведень є їх висока трудоемність, що обмежує використання в звичайних бактеріологічних лабораторіях. З метою спрощення було запропоновано модифікацію методу із заміною ряду з 10 пробірок, що містять різні кількості препарату, трьома концентраціями антибіотика. Перша з них відповідає максимальній, що знаходиться у крові при введенні терапевтичних доз, друга – рівню, що спостерігається через $T_{1/2}$ (час зниження концентрації антибіотика на 50 %). Третя є мінімальною, тобто тою, яка дорівнює МПК для високочутливих штамів. У відповідності до використаних концентрацій антибіотиків досліджувані штами можна віднести за рівнем чутливості до трьох основних груп: резистентні (МПК для яких перевищує значення максимальної концентрації антибіотика у крові), помірно чутливі (значення МПК наближаються до максимальної або середньої концентрації) і високочутливі (чутливість яких до антибіотика знаходиться на рівні мінімальної концентрації, що використовується у досліді). Такими концентраціями при визначенні чутливості до бензилпеніциліну є відповідно 0,05-0,2, 0,5 і 2,0 ОД/мл, до макролідів – 0,1, 0,5-1,0 і 4,0 мкг/мл, до аміноглікозидів – 0,5-1,0, 6,0-8,0 і 15,0-20,0 мкг/мл.

Прискорені методи визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків. Використовуючи звичайні методи, відповідь може бути отримана через 18-20 год від початку дослідження, не враховуючи етапів виділення чистої культури. Це призводить до того, що у більшості випадків особливо при затяжному та тяжкому перебігу хвороби, лікування антибіотиками починають задовго до одержання даних лабораторного обстеження. Залежно від принципів, на яких вони базуються, прискорені методи передбачають:

- визначення змін ферментативної активності мікроорганізмів під впливом антибіотиків;
- визначення кольору редокс-індикаторів при зміні окисно-відновного потенціалу під час росту бактерій у живильному середовищі;
- цитологічну оцінку змін морфології бактеріальних клітин під впливом антибіотиків.

До першої групи належить метод Роджерса, орієнтований на здатність антибіотиків пригнічувати ферментативну активність чутливих мікроорганізмів, що супроводжується зміною кольору відповідного індикатора. Суть його полягає у диференційованій зміні червоного кольору фенолового червоного на жовтий або фіолетовий залежно від чутливості досліджуваного штаму. У випадку чутливості до дії антибіотика не відбувається розкладання глюкози при культивуванні у середовищі, яке містить її та певні концентрації препарату. При цьому середовище забарвлюється у фіолетовий колір внаслідок зсуву рН у лужну сторону. Зміна червоного кольору на жовтий свідчить про розщеплення глюкози з утворенням кислоти внаслідок росту штаму, резистентного до дії антибіотика. Якщо до середовища додати 0,25 % дріжджового екстракту, результати можуть бути врахованими вже через 2-2,5 год від початку дослідження.

Наступна група методів реєструє зміни окисно-відновного потенціалу середовища в процесі росту мікроорганізмів, про що свідчить зміна кольору резазурину, 1,3,5-трифенілтетразолію хлориду, 2,6-дихлорфеноліндофенолу та інших, які додаються до середовища. Цей метод технічно простий, а результати одержують через 2-6 год. Принцип його зводиться до того, що розтоплений та охолоджений до 50 °С агар засівають досліджуваною культурою бактерій із розрахунку 200 млн. мікробних тіл, а на поверхню накладають диски з антибіотиками. Чашки інкубують при оптимальній температурі протягом 3-5 год, потім обробляють індикатором і повторно інкубують при 37 °С протягом 20-30 хв. Результати враховують за зміною кольору навколо дисків з антибіотиками. Якщо використовують 1 % розчин 1,3,5-трифенілтетразолію хлориду, ділянки агару з бактеріальним ростом внаслідок утворення формазану набувають червоного кольору, а зони пригнічення росту навколо дисків залишаються безбарвними.

Судити про ступінь чутливості мікробів до антибіотиків можна з такою ж точністю, як і за допомогою стандартного методу дисків, проте час дослідження зменшується до 3-5 год.

Утворення інволюційних форм бактерій під впливом антибіотиків досліджують під фазово-контрастним чи антоптральним мікроскопом у спеціальних мікрокапсулах. Вони утворюються внаслідок дії бактеріостатичних концентрацій препарату. Під впливом суббактеріостатичних концентрацій, а також при резистентності досліджуваного штаму на поверхні агару виростають нормальні мікроколонії.

Метод може бути застосований для визначення чутливості штамів кишкової палички, стафілококів, холерних вібріонів. Отримані дані у більшості випадків збігаються з тими, які дають класичні методи.

За останні роки розроблено численні модифікації методу серійних розведень у живильних бульйонах. Зокрема, експрес-методи з титруванням антибіотика в об'ємі 0,25 мл.

Випускаються комерційні набори тривалого зберігання, які складаються з планшетів з ліофільно висушеними розведеннями антибіотика, куди вноситься по 0,1 мл суспензії чистої культури мікроорганізмів. Результати визначення антибіотикочутливості можна оцінювати візуально (при наявності у середовищі індикатора) або за допомогою спектрофотометрів, коли реєструється зміна оптичної густини середовища.

Визначати чутливість бактерій до антибіотиків можна й за допомогою автоматизованих мікробіологічних систем (“Autobac MS-2”, “Cobas Micro”, Quantum 2, Sceptor та ін.). При їх використанні результати отримують вже через 3-10 год. Одна з їх переваг полягає в тому, що вони дозволяють отримувати результати одночасно до 18-20 антибіотиків. Ці методи широко використовують у мікробіологічних лабораторіях, вони добре корелюють з іншими методиками і за їх допомогою можна не тільки вибирати раціональну схему антибіотикотерапії, але й проводити епідеміологічний контроль резистентності.

Однак при користуванні такими автоматизованими системами частота виявлення резистентних штамів може бути знижена внаслідок повільного росту стійких варіантів. У більшості подібних систем результати враховують шляхом порівняння росту (або загибелі) бактеріальних клітин у присутності антибіотиків з контролем, де є тільки мікроби. За цих умов досить важко диференціювати клітини, які гинуть, від тих, що повільно розмножуються.

До інших факторів, які впливають на результати, належить дія субінгібіторних концентрацій препаратів на ультраструктуру бактеріальних клітин. Вони призводять до зміни форми, набухання клітин, що може супроводжуватись зміною оптичної густини суспензії та спотворенням результатів. В свою чергу, це дає неправильну інформацію про чутливість збудників.

Таким чином, застосування будь-якого методу дозволяє визначити антибіотикограму збудника – спектр його чутливості та антибіотикостійкості.

Усі методи визначення чутливості бактерій до антибіотиків мають свої переваги і свої недоліки. Тому постійний контроль за об'єктивністю результатів і дотриманням правил проведення досліджень сприяють одержанню достовірних даних.

У більшості випадків результати визначення антибіотикостійкості *in vitro* збігаються з клінічними наслідками антибіотикотерапії. Випадки розбіжності пояснюються рядом причин, серед яких найчастіше зустрічається помилкове трактування одержаних лабораторних даних.

Причиною таких ситуацій може бути використання при посіві не чистої культури бактерій, а патологічного матеріалу. Тому визначається не чутливість інфекційного агента, а мікробної асоціації, в тому числі й сапрофітної флори. Помилки зустрічаються при дослідженні вмісту дванадцятипалої кишки, фекалій, харкотиння, виділень з ран, сечі тощо.

Плазмиди роблять бактерії нечутливими до переважної більшості антибіотиків, які використовуються у клініках, оскільки кодують синтез ферментів, що руйнують препарати. Одним з найдослідженіших ферментів є бета-лактамаза, яка руйнує антибіотики, що належать до групи бета-лактамів. Розроблено декілька методичних прийомів, що дозволяють швидко визначити її активність. Один з них полягає в тому, що на фільтрувальний папір розміром 2×2 см, що знаходиться в чашці Петрі, капають одну краплю 2 % водного розчину крохмалю. Потім на цей папір наносять петлею агарову культуру мікробів і розтирають її, формуючи бляшку діаметром до 5 мм. На її поверхню наносять робочий йодний розчин пеніциліну.

Облік результатів проводять через 10 хв інкубації системи при кімнатній температурі. При наявності бета-лактамази на темно-синьому фоні спостерігається яскраво виражена чітка зона просвітління навколо бляшки, що містить агарову культуру мікробів. При негативному результаті зона просвітління відсутня, а краї бляшки нечіткі.

Визначення концентрації антибіотиків у біологічних рідинах. При тяжких інфекційних процесах, наприклад, сепсисі інколи доводиться визначати концентрацію антибіотиків у біологічних рідинах, зокрема, сироватці крові, сечі. Для цього використовують метод серійних розведень (табл. 16) на рідкому середовищі з глюкозою та індикатором Андреде. У двох паралельних рядах готують серійні розведення сироватки і стандарту антибіотика. Потім до кожної пробірки, включаючи контрольні, додають стандартну суспензію тест-мікробів. Пробірки інкубують у термостаті при температурі 37 °С протягом 18 год. У тих пробірках, де концентрація антибіотика пригнічує мікроби, середовище залишається безбарвним і прозорим. Якщо мікроорганізми проростають, про це свідчить помутніння середовища і поява рожевого забарвлення.

Можна використати також фенол-сироваткове середовище з індикатором феноловим червоним. У цьому випадку при відсутності росту мікроорганізмів середовище залишається червоним, а при наявності ознак росту стає мутним і набуває жовтого кольору.

Виходячи із даних таблиці, розчин стандарту пеніциліну затримує ріст тест-мікробів у концентрації 0,025 ОД/мл, а досліджувана сироватка – в розведенні 1:8. Отже, вміст пеніциліну в сироватці крові буде дорівнювати 0,2 ОД/мл (0,025 ОД/мл×8).

Таблиця 16

Визначення концентрації пеніциліну в сироватці крові

Пробірки	1	2	3	4	5	6
Розведення сироватки	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
Ріст тест-мікробів	-	-	-	+	+	+
Концентрація стандарту пеніциліну в середовищі, ОД/мл	0,2	0,1	0,05	0,025	0,0125	0,0063
Ріст тест-мікробів	-	-	-	-	+	+

Примітка: “+” – ріст тест-мікробів, “-” – відсутність росту

Частина II

ІМУНОЛОГІЯ

Розділ 9

ІМУНОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ ІНФЕКЦІЙНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ

У захисті організму від чужорідних агентів вирішальну роль відіграють імунологічні механізми, які здійснюються антитілами (імуноглобулінами) та імунокомпетентними клітинами (лімфоцитами).

Основою імунологічних механізмів є те, що антитіла і лімфоцити, які утворились при попаданні в організм антигену, реагують тільки з ним, а не з іншими антигенами. Головною функцією антитіл є зв'язування антигену і його подальше видалення з організму.

Проте такі реакції між антигенами і антитілами можуть відбуватись і поза організмом (*in vitro*) у присутності електроліту. Виходячи з їх специфічності, реакції можливі лише тоді, коли антитіло та антиген комплементарні один одному. Маючи специфічні антитіла проти певного антигена, можна розпізнати і визначити його серед інших. І, навпаки, можна виявити в сироватці крові антитіла проти конкретного антигена. На цьому принципі базуються всі імунологічні діагностичні реакції, які назвали серологічними, тому що антитіла знаходяться в сироватці крові людей і тварин (*serum* – сироватка).

Реакція антиген-антитіло *in vitro* супроводжується виникненням декількох феноменів – аглютинації, преципітації, лізису. Зовнішній прояв реакції залежить від фізико-хімічних властивостей антигена, класу антитіл і умов середовища.

Аглютинація і преципітація характеризуються утворенням видимих агрегатів внаслідок об'єднання багатьох комплексів антиген-антитіло. Лізис зумовлений зв'язуванням комплексу комплексом антиген-антитіло з наступним руйнуванням клітини.

Антитіла, що беруть участь у реакції, відповідно до кожного феномена називають аглютинінами, преципітинами, лізинами.

Таким чином, всі серологічні реакції використовуються з двоякою метою: 1) для виявлення антитіл у сироватці хворого з допомогою стандартних антигенів-діагностиків – для серологічної діагностики інфекційної хвороби; 2) для визначення невідомих антигенів (бактерій, грибів, вірусів) за відомими стандартними сироватками-антитілами – для серологічної ідентифікації збудників. При цьому невідомий компонент визначають за відомим. Наприклад, якщо сироватка

хворого реагує з конкретним мікробним антигеном, це означає, що в сироватці є антитіла проти даного мікроорганізму. А вид збудника, виділеного із патологічного матеріалу, визначають за допомогою відомої імунної сироватки (антитіла).

Відповідно до цього, в серологічних реакціях завжди використовують один компонент стандартний, інший, який виявляють, одержують від хворого. Так, для серологічної діагностики беруть стандартні антигени – діагностикуми: суспензії інактивованих, рідше живих, бактерій, вірусів або їх антигенів у ізотонічному розчині. Для серологічної ідентифікації застосовують стандартні імунні сироватки. Їх одержують шляхом гіперімунізації тварин відповідними бактерійними чи вірусними антигенами, в результаті якої в крові проти них з'являється значна кількість антитіл. Одержавши сироватку крові імунізованої тварини і очистивши від баластних речовин, її використовують як імунну сироватку. При одержанні такої сироватки визначають її титр – найбільше розведення, в якому ще проявляється реакція з відповідним антигеном. Набори із різноманітних діагностикумів та імунних діагностичних сироваток є в кожній бактеріологічній лабораторії.

Усі імунологічні методи, що вживаються для діагностики інфекційних захворювань можна поділити на три групи:

1. Тести, в яких відбувається безпосередня взаємодія антигена з антитілом. До цієї групи належать: імуофлуоресценція, радіоімунні та імуоензимні тести.

2. Тести, в яких відбуваються різні фізико-хімічні реакції або беруть участь додаткові елементи (носії, комплемент). До них належать: імуодифузія, імуоелектрофорез, пряма аглютинація (бактерійна), непрямая аглютинація з використанням еритроцитів (пасивна гемаглютинація), латексу (латексна аглютинація) або інших часточок, таких як бентоніт, холестерол, деревне вугілля, коаглютинація (використання білка *A Staphylococcus aureus*) і реакція зв'язування комплекменту.

3. Тести, що базуються на використанні певних біологічних ефектів, наприклад, опсонізація, фагоцитоз, хемотаксис. До них належать: опсонофагоцитарна проба, хемотаксис, імуоадгезія, клітинна дегрануляція.

Реакція аглютинації (РА)

Аглютинація – це серологічна реакція між антитілами (аглютинінами) і антигенами (аглютиногенами), розміщеними на поверхні бактеріальної клітини. Ця реакція призводить до утворення специфічного комплексу антиген – антитіло (аглютинат).

Клітини з приєднаними до них аглютинінами з'єднуються в агрегати, внаслідок чого рівномірна суспензія клітин, спочатку мутна, склеюється в пластівці, які зависають у прозорій рідині або осідають на дно. В аглютинації беруть участь виключно поверхневі антигени, які доступні антитілам. Антигени, розміщені у внутрішніх структурах клітини, не беруть участі в цій реакції. Механізм аглютинації полягає в тому, що під впливом іонів електроліту зменшується негативний поверхневий заряд бактерійних клітин, і вони можуть зблизитись на таку відстань, при якій виникає склеювання бактерій (рис. 42).

Реакцію проводять на склі, пластмасових пластинках, у пробірках, лунках полістиролових планшетів.

Аглотинацію на склі або пластинках найчастіше використовують для ідентифікації бактерій з допомогою відомих сироваток; аглютинація в пробірках і планшетах – з метою виявлення титру аглютининів у сироватці хворого з допомогою відомих діагностикумів.

Найбільше розведення сироватки, при якому ще спостерігається аглютинація бактерій, приймається за її титр, який характеризує рівень специфічних аглютининів.

Макроскопічний і мікроскопічний вигляд аглютинації бактерій залежить від виду поверхневих антигенів, які беруть участь у реакції. Аглютинини, які реагують з О-соматичним антигеном, дають дрібнозернисту аглютинацію. Соматична аглютинація в пробірках завершується через 24 години, при цьому виникають компактні зерна, крупинки, які важко розбити при струшуванні. При мікроскопії видно, що бактерії склеюються полюсами, утворюючи сітку.

В аглютинації з поверхневими Vi-антигенами спостерігається склеювання бактерій між собою всією поверхнею, що дає рівномірний осад. У певній мірі макроскопічно Vi-аглотинація нагадує соматичну.

Сироватки, які містять антитіла проти джгутиків бактерій, аглютинують значно швидше. Вже через 30-40 хв окремі конгломерати бактерій у вигляді пластівців вільно осідають на дно пробірки. Аглютинини анти-Н безпосередньо взаємодіють з джгутиками, знерухомлюючи бактерії. Мікроскопічно можна спостерігати склеювання бактерійних клітин з допомогою джгутиків. Це крупнопластівцева, або Н-аглотинація (рис. 43).

Постановка РА. Існує дві різновидності постановки реакції: орієнтовна аглютинація на склі й розгорнута аглютинація в пробірках.

Реакція аглютинації на склі. На предметне скло наносять роздільно 2 краплі специфічної сироватки і краплю ізотонічного розчину хлориду натрію. В краплю

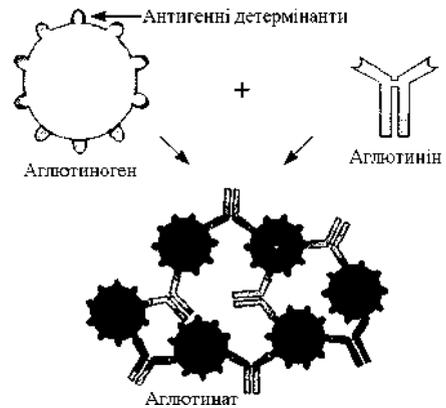


Рис. 42. Реакція аглютинації.

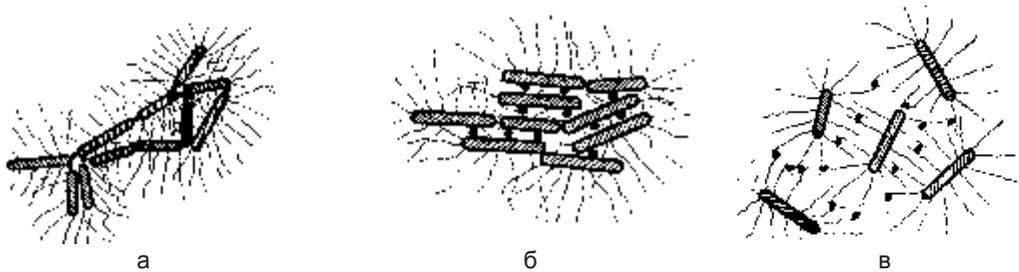


Рис. 43. Аглотинація бактерій: а – О-аглотинація (соматична), дрібнозерниста; б – Vi-аглотинація; в – Н-аглотинація (джгутикова), крупнопластівцева.

ізотонічного розчину й одну з крапель сироватки бактеріологічною петлею вносять досліджувану культуру й ретельно її емульгують. Після внесення культури в одну із крапель необхідно простерилізувати петлю, знову набрати культуру і внести її у другу краплю. Крапля сироватки, куди не вносили культури, є контролем сироватки.

Реакція проходить досить швидко при кімнатній температурі. Якщо контрольна крапля сироватки залишається прозорою, в краплі ізотонічного розчину – рівномірне помутніння, а в краплі, де культура змішана з сироваткою, з'являються зернистість або пластівці, реакція вважається позитивною.

Проте орієнтовна реакція аглютинації дозволяє зробити лише попередній висновок про виділену культуру, тому що багато бактерій мають спільні антигени.

Щоб остаточно підтвердити або відкинути попередній висновок ставлять розгорнуту реакцію аглютинації (табл. 17). Діагностичні аглютинуючі сироватки, які одержані шляхом гіперімунізації тварин, мають високий титр (1:20000-1:40000 і вище).

Таблиця 17

Постановка реакції аглютинації для ідентифікації *E. coli*

Компоненти, мл	Пробірки						Контроль	
	1	2	3	4	5	6	сироватки	антигена
0,85 % розчин хлориду натрію	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	-	1,0
ОК-колі сироватка в розведенні 1:50	1,0 →	1,0 →	1,0 →	1,0 →	1,0 →	1,0 ↓	1,0	-
Розведення сироватки	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:100	-
Суспензія <i>E. coli</i> (краплі)	2	2	2	2	2	2	-	2
Термостат 37 °С – 2 год.								
Результат								

Спочатку готують робоче розведення сироватки (1:50 або 1:100), із якого надалі одержують двократні розведення від 1:100 до титру, вказаного на ампулі з сироваткою. Для цього в ряд пробірок розливають по 1 мл ізотонічного розчину, потім у першу пробірку вносять такий же об'єм сироватки робочого розведення і після перемішування 1 мл переносять у другу, звідти в третю і т.д., а в передостанню пробірку додають 1 мл сироватки робочого розведення. В останню пробірку сироватку не вносять. Потім у всі пробірки додають по дві краплі досліджуваної культури.

Контрольні пробірки – дві останні. Передостання – контроль сироватки, остання – контроль антигену. Після струшування штатив із пробірками поміщають у термостат при 37 °С на дві години і згодом залишають при кімнатній температурі до наступного дня. Після чого проводять облік результатів. Якщо реакція виявилась позитивною до титру або до половини титру, вона вважається достовірною.

Розгорнуту реакцію аглютинації ставлять і при серологічній діагностиці захворювання. Тільки в цьому випадку роблять ряд послідовних розведень сироватки хворого (1:100-1:1600) і до кожного розведення додають по дві – три краплі діагностичуму.

При деяких інфекційних захворюваннях реакції аглютинації, що вживаються з діагностичною метою, мають свої назви: при черевному тифі – реакція Відаля, висипному тифі – реакція Вейгля, при бруцельозі – реакція Райта (табл. 18).

Таблиця 18

Схема постановки реакції аглютинації Райта

Компоненти, мл	Пробірки						Контроль	
	1	2	3	4	5	6	сироватки	антигена
Розчин хлориду натрію	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	-	1,0
Сироватка хворого в розведенні 1:50	1,0 →	1,0 →	1,0 →	1,0 →	1,0 →	1,0 ↓	1,0	-
Розведення сироватки	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:100	-
Бруцельозний діагностичум (краплі)	3	3	3	3	3	3	3	3
Термостат 37 °С 18-20 год								
Результат								

Реакція непрямой аглютинації (РНГА). За своєю чутливістю значно перевищує пряму реакцію аглютинації і дозволяє виявити мінімальну кількість антитіл і антигенів. Така висока чутливість досягається завдяки адсорбції антигенів або антитіл на спеціальних інертних частинках (латекс, бентоніт) або клітинах (еритроцити). Якщо антигени адсорбовані на еритроцитах, така реакція називається реакцією непрямой (пасивної) гемаглютинації (рис. 44).

Навантажені антигеном еритроцити склеюються в присутності специфічних антитіл і випадають у вигляді пухкого осаду з нерівним фестончастим краєм (перевернутої “парасольки”) на дні пробірок або лунок.

Антигени для РНГА називаються еритроцитарними діагностичумами. Це стандартні препарати, які складаються з антигенів різних бактерій і вірусів, адсорбованих на поверхні еритроцитів. За допомогою еритроцитарних діагностичумів можна виявляти в сироватці хворих антитіла до будь-якого збудника.

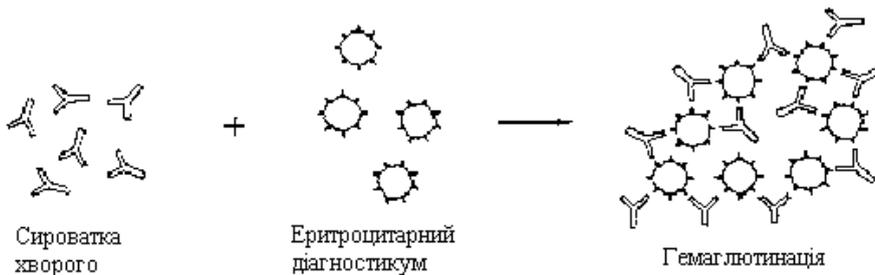


Рис. 44. Схема реакції непрямой гемаглютинації.

РНГА можна використовувати й для серологічної ідентифікації збудника. У цьому випадку як індикатор використовують еритроцити, навантажені відповідними антитілами. При додаванні до них культури збудника виникає феномен гемаглютинації. На відміну від попередньої реакції, її називають реакцією оберненої (зворотної) непрямой гемаглютинації (РОНГА).

Недоліком непрямой (пасивної) гемаглютинації є те, що антитіла, які знаходяться на поверхні еритроцитів, можуть не викликати їх склеювання. Частково це можна пояснити тим, що поверхня еритроцитів має негативний електричний заряд, який заставляє їх триматися на відстані близько 25 нм один від одного. Вони можуть аглютинуватись у присутності специфічного антигену лише тоді, коли негативний заряд зменшиться настільки, щоб еритроцити могли зблизитись. Цього можна досягти, додаючи до середовища альбумін (5-30%), декстран або полівініловий піримідон. Ці сполуки мають позитивний заряд, який нейтралізує негативні заряди еритроцитів. Зняти негативний заряд можна також, діючи на еритроцити такими ферментами як трипсин, папаїн та ін. Завдяки цьому, еритроцити зближуються між собою і можуть утворювати зв'язки між антигенами та антитілами.

Реакція непрямой гемаглютинації широко використовується у діагностиці вірусних, бактеріальних, грибкових і паразитарних інфекцій. Для навантаження еритроцитів найчастіше використовують полісахаридні антигени бактерій або грибів, які легко адсорбуються на поверхні свіжих еритроцитів барана і людини групи O Rh(-). Поверхню еритроцитів можна змодифікувати, використовуючи хімічні сполуки (танін, двоазобензидин) і тоді на них можна адсорбувати і білкові антигени.

РНГА відноситься до найбільш чутливих реакцій у порівнянні з аглютинацією, преципітацією і зв'язуванням комплементу. З допомогою цієї реакції антитіла в сироватці хворого при деяких захворюваннях виявляють вже з третьої доби від моменту зараження.

Методика постановки РНГА. У ряд лунок полістиролової планшети наливають по 0,5 мл ізотонічного розчину хлориду натрію, потім у першу лунку вносять 0,5 мл сироватки хворого (1:50) і одержують розведення сироватки 1:100. З першої лунки переносять 0,5 мл у другу, одержують розведення 1:200, з другої в третю і т.д., крім останньої. З передостанньої лунки 0,5 мл виливають, потім в усі лунки додають по 0,25 мл відповідного еритроцитарного діагностикуму (табл. 19). Планшети поміщають у термостат при 37 °С на 2-3 год.

Результат реакції оцінюють за виглядом осаду еритроцитів, починаючи з контролю, де вони повинні осісти на дно у вигляді круглого компактного осаду з рівними краями. У лунках із сироваткою при позитивній реакції осад буде мати нерівні краї і покриватиме майже всю лунку.

Інтенсивність РНГА оцінюють за чотириплюсовою системою: якщо майже всі еритроцити аглютинувались і утворився осад, який нагадує перевернуту "парасольку", – реакція позитивна (++++, +++); не всі еритроцити аглютинувались, мереживоподібний осад меншого розміру (++); більшість еритроцитів не склеїлись і утворюють у центрі дна лунки компактний диск з нерівними краями – реакція слабкопозитивна (+) (рис. 45).

Таблиця 19

Схема постановки РНГА

Компоненти, мл	Лунки						Контроль	
	1	2	3	4	5	6	сироватки	антигена
Розчин хлориду натрію	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Сироватка хворого в розведенні 1:50	0,5→	0,5→	0,5→	0,5→	0,5→	0,5↓	0,5	-
Розведення сироватки	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:100	-
Еритроцитарний діагностикум	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	-	0,25
Термостат 37 °С – 2-3 год								
Результат								

Реакція аглютинації латекса (РАЛ) за своїм механізмом аналогічна РНГА, в якій беруть участь еритроцити, сенсibilізовані антигенами або антитілами. Для постановки РАЛ використовують сенсibilізовані частинки полістиролового латекса діаметром 0,5-1,2 мкм, які в присутності гомологічного імунологічного реагенту (антигену або антитіла) склеюються. Ця реакція відбувається досить швидко (2-7 хв), що дозволяє застосовувати її як експрес-метод виявлення антигенів і антитіл.

Навантажені антитілами часточки латексу широко використовують для виявлення антигенів вірусів і бактерій. Наприклад, антигени стрептококів у мазках із зіву можна виявити вже через 10-60 хв. Збудників, які викликають запалення мозкових оболонок (*H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, *C. neoformans*), можна безпосередньо виявити протягом 15 хв. Латекс-аглютинація широко вживається для ідентифікації антигенів ротавірусів, герпесвірусів тощо. Чутливість цих тестів сягає понад 90 %, а специфічність – 97-99 %. РАЛ використовують також для ідентифікації деяких бактерій (наприклад групи *Streptococcus* за Ленсфільд, групи *Salmonella* та інші.). Останнім часом у деяких латекс – системах замість поліклональних сироваток використовують частинки латексу, навантажені моноклональними антитілами (наприклад, для виявлення *S. agalactiae*).

Навантажуючи латекс антигенами, можна визначати наявність антитіл у сироватці хворого. Таку модифікацію РАЛ використовують для виявлення протигрипозних, протикраснушних, протикорових антитіл тощо.

Реакцію аглютинації латексу можна проводити на склі або рівній пластмасовій пластинці темного кольору, додаючи до 1-2 крапель кожного розведення сироватки по 1 краплі латексного діагностикуму. Залежно від досліджуваного матеріалу, величини частинок латексу та активності діагностикуму облік результатів можна проводити через 1-10 хв після змішування інгредієнтів.

При позитивній реакції частинки латексу склеюються, утворюючи аглютинат, який добре



Рис. 45. Результат постановки РНГА.

помітний неозброєним оком або при використанні лупи з невеликим збільшенням. У випадку негативної реакції суспензія латексу залишається мутною, без крупинок аглютинату і ділянок просвітління.

Ще простішою є РАЛ при використанні комерційних наборів США “Rubascan”. Одну краплю нерозведеної сироватки наносять на пластинку темного кольору, яка входить в цей набір, розпроділяють її піпеткою або бактеріологічною петлею в межах визначеного на пластинці кільця і вносять 1 краплю латексового антигенного діагностикуму. Пластинку кладуть на столик ротатора у вологій камері і через 8 хв проводять облік результатів.

Для ранньої діагностики вірусних інфекцій використовується модифікацію цієї реакції, яка дозволяє виявити у сироватці хворого специфічні IgM. З цією метою застосовують частинки латексу, сенсibiliзовані вірусним антигеном. Спочатку в лунки полістиролової пластинки вносять антисироватку проти IgM людини, потім досліджувану сироватку хворого з підозрою на вірусну інфекцію. IgM – антитіла сироватки хворого міцно зв’язуються з антитілами проти IgM, які знаходяться в лунці, на них адсорбуються частинки латексу, які попередньо були навантажені відповідним вірусним антигеном. У випадку відсутності специфічних противірусних IgM у сироватці частинки латексу вільно осідають на дні луночки у вигляді компактного осаду (гудзика) – реакція негативна. Така реакція характеризується високою специфічністю і дає такі ж результати, як і значно складніші за постановкою імуноферментні методи.

Реакція коагутинації (КОА). Для постановки КОА використовують золотисті стафілококи (штам *Cowan 1*). У клітинній стінці цих мікроорганізмів міститься білок А, який має значну спорідненість до Fc-фрагмента IgG людини і кролика. Тому молекули IgG після адсорбції на стафілококах, що мають білок А, орієнтовані в оточуюче середовище своїми вільними Fab-фрагментами, в яких знаходиться активний центр антитіла (рис. 46).

Цим стафілококові діагностикуми відрізняються від інших антитільних препаратів, в яких носії (еритроцити, бентоніт, латекс) не мають специфічних рецепторів для Fc-фрагмента IgG. На таких інертних частинках молекули імуноглобулінів адсорбуються будь-якою ділянкою, без суворої просторової конфігурації.

Для одержання антитільного стафілококового діагностикуму культуру стафілокока, яка виросла на рідкому живильному середовищі, центрифугують при 2500-3000 об/хв протягом 15 хв. Центрифугат двічі промивають ізотонічним розчином хлориду натрію, готують 10 % суспензію бактерій і фіксують їх 0,5-3,0 % форма-

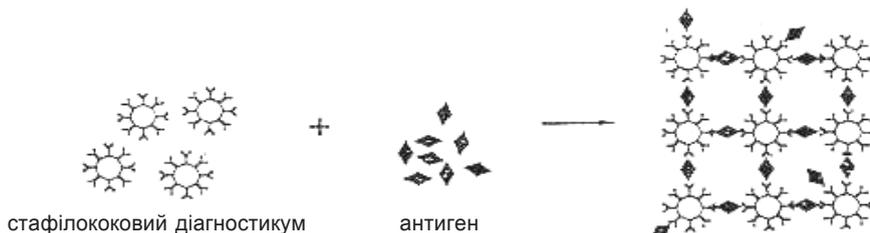


Рис. 46. Схема реакції коагутинації.

ліном протягом 20-120 хв. Після фіксації стафілококи промивають 4 рази ізотонічним розчином хлориду натрію і знову готують 10 % суспензію, яку прогривають протягом 1 години при температурі 80 °С. Перед зберіганням до суспензії стафілококів додають мертиолят до кінцевої концентрації 1: 10000.

Для сенсibiliзації в 10 % суспензію фіксованих стафілококів вносять рівний об'єм імунної сироватки кролика або її гамаглобулінової фракції у відповідному розведенні від 1:10 до 1:20. Стафілококи сенсibiliзують імуноглобулінами впродовж 15-30 хв при температурі 20-30 °С, після чого промивають ізотонічним розчином. Готують 0,5-5,0 % суспензію, яку консервують азидом натрію і зберігають у холодильнику при температурі 4 °С.

Зазвичай, реакцію коагутинації ставлять на скляних пластинках, змішуючи рівні об'єми (1-2 краплі) досліджуваного матеріалу (кров, сеча, слина, фільтрати фекалій та ін.) і стафілококового діагностикуму. Суміш ретельно перемішують і через 2-5 хв на темному фоні враховують результати. Використання темного фону – необхідна умова чіткої реєстрації реакції КОА, тому що при спостереженні за її результатами при звичайному освітленні лише на темному фоні чітко буде проглядатись дрібнозерниста аглютинація стафілококів.

Кожен дослід повинен супроводжуватись декількома негативними контролями:

1) стафілококи, сенсibiliзовані нормальною сироваткою + досліджуваний матеріал; 2) стафілококовий коаглютинуючий діагностикум + матеріал, який не містить збудника; 3) стафілококовий коаглютинуючий діагностикум + фосфатно-буферний розчин; 4) дослідований матеріал + фосфатно-буферний розчин.

Реакція КОА широко використовується для виявлення антигенів різних стрептококів, *N. meningitidis* і *N. gonorrhoeae*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, шигел, сальмонел тощо.

На відміну від бактерій, які часто досліджують у чистій культурі, віруси завжди виявляють в якомусь біологічному матеріалі. Тому, щоб попередити неспецифічні реакції, необхідна адсорбція суспензією стафілокока матеріалу, в якому можуть міститись IgG (кров, фекалії). Для цього змішують рівні об'єми 10 % за висі стафілококового реагенту і досліджуваного вірусного матеріалу. Суміш інкубують протягом 30 хв при 37 °С, центрифугують і надосадову рідину використовують для подальшої роботи для виявлення в ній збудників хвороби.

Метод з успіхом використовується для ідентифікації вірусів грипу, параміксовірусів, ротавірусів, вірусів гепатиту В тощо.

Реакція гальмування гемаглютинації (РГГА) набула широкого розповсюдження для діагностики вірусних інфекцій. Її можна застосовувати як для серологічної ідентифікації вірусів, так і для серологічної діагностики. Гемаглютинація – це феномен склеювання еритроцитів під впливом вірусів. Деякі віруси мають на своїй оболонці рецептори, комплементарні рецепторам поверхні еритроцитів певних тварин, і при додаванні до суспензії вірусів еритроцитів, останні склеюються. Наприклад, вірус грипу аглютинуює еритроцити курей, вірус кліщового енцефаліту – еритроцити гусей. Таким чином, у випадку гемаглютинації можна зробити висновок про наявність вірусу в досліджуваному матеріалі. Проте ця

реакція не імунологічна, тому що в ній не бере участі основна система – антиген і антитіло.

У той же час реакція гальмування гемаглютинації належить до серологічних реакцій імунітету. У РГГА специфічні противірусні антитіла, взаємодіючи з вірусом і блокуючи поверхневі рецептори, позбавляють його здатності склеювати еритроцити (рис. 47).

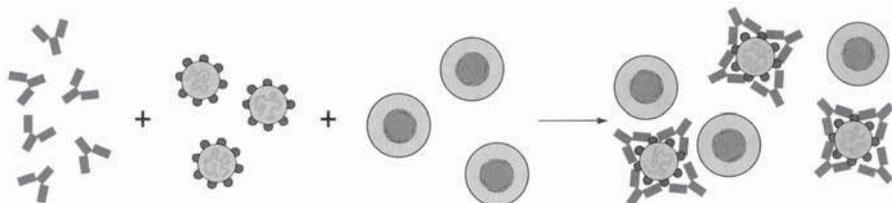


Рис. 47. Схема реакції гальмування гемаглютинації.

Для постановки РГГА в лунках полістиролових планшет готують послідовні розведення сироватки в об'ємі 0,25 мл і змішують їх з аналогічною кількістю вірусомісного матеріалу. Суміш ставлять у термостат при 37 °С на 30 хв, після чого в кожну лунку додають по 0,5 мл 1-2 % зависі еритроцитів (табл. 20).

Таблиця 20

Постановка РГГА для серологічної діагностики вірусних інфекцій

Компоненти, мл	Лунки						Контроль	
	1	2	3	4	5	6	сироватки	антигена
Розчин хлориду натрію	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Сироватка хворого в розведенні 1:50	0,25→	0,25→	0,25→	0,25→	0,25→	0,25↓	0,25	-
Розведення сироватки	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:100	-
Вірусний діагностикум	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	-	0,25
Термостат 37 °С – 30 хв								
2 % суспензія курячих еритроцитів	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Результат								

Обов'язкові два контролю: контроль сироватки і контроль вірусу. Облік проводять після повторного 30-хвилинного перебування реагентів у термостаті. Якщо досліджувана сироватка містить антитіла до даного вірусу, вона його нейтралізує, і феномен гемаглютинації еритроцитів не настає (позитивна РГГА).

Реакцію нейтралізації (РН) в лабораторній практиці використовують досить часто. Вона має декілька варіантів. З одного боку її все ширше ставлять для нейтралізації вірусів, з другого – для нейтралізації бактерійних екзотоксинів.

Реакція нейтралізації вірусів. В основі цієї реакції лежить здатність специфічних антитіл міцно зв'язуватись з вірусами. В результаті віруси не можуть адсорбуватись на чутливих клітинах і розмножуватись в них.

Для постановки реакції необхідна наявність вірусу, сироватки, яка містить антитіла, і біологічного об'єкта, який виступає індикатором нейтралізації. Залежно від виду вірусу такими об'єктами можуть бути лабораторні тварини, курячі ембріони, тканинні культури.

У реакції в якості антигена використовують культуральні рідини, алантоїсну і амніотичну рідини курячих ембріонів, суспензії органів лабораторних тварин, в яких репродукувались віруси. Залежно від мети дослідження в якості антитіла застосовують або сироватки хворого – для встановлення концентрації протівірусних антитіл, або стандартні протівірусні сироватки – для ідентифікації збудника. У першому випадку використовують сироватки, які були взяті у хворого на початку хвороби і в період реконвалесценції (метод парних сироваток).

Перед постановкою РН вірус попередньо титрують, визначаючи ту найменшу концентрацію, яка викликає цитопатичну дію або зараження експериментальних тварин чи курячих ембріонів. За титр вірусу приймають 50 % дозу (ЦПД₅₀ – 50 % цитопатична доза).

Для розведення вірусної суспензії при проведенні РН на лабораторних тваринах або курячих ембріонах використовують фосфатно-буферний розчин (рН 7,0-7,2). При постановці реакції на культурі клітин вживають те середовище, в якому звичайно перебувають дані клітини (розчин Ігла, середовище 199, гемогідролізат тощо).

Реакцію нейтралізації ставлять таким чином. До послідовних розведень досліджуваних сироваток вносять по 100 ЦПД₅₀ вірусу і обидва реагенти інкубують при температурі 37 °С протягом 1-2 годин.

Після чого до суміші вірусу і сироватки додають суспензію клітин або суміш вводять в організм лабораторних тварин чи курячі ембріони. Про наявність у сироватці хворого віруснейтралізуючих антитіл свідчить відсутність цитопатичної дії вірусу у культурі клітин або проявів інфікування лабораторних тварин (курячих ембріонів).

Досить часто для діагностики вірусних інфекцій вживається модифікація реакції нейтралізації – кольорова проба. В основі її лежить той факт, що в процесі життєдіяльності культури клітин у поживному середовищі накопичуються кислі продукти метаболізму, які зумовлюють зміну рН середовища і появу жовтого забарвлення.

При інфікуванні культури клітин деякими вірусами (ентеровіруси, реовіруси та ін.) пригнічується клітинний метаболізм і розвивається деструкція клітин – рН середовища не змінюється і колір середовища залишається рожевим. Нижче наводимо орієнтовну схему постановки такої реакції (табл. 21).

Реакція нейтралізації токсину антитоксином. При діагностиці деяких інфекційних захворювань, збудники яких продукують екзотоксини, використовують реакцію нейтралізації токсину антитоксином. Для її проведення досліджуваний матеріал, в якому передбачають наявність токсину, змішують з відповідною антитоксичною сироваткою і після інкубації в термостаті вводять лабораторним тваринам (білі миші, гвінейські свинки). Контрольним тваринам вводять тільки досліджуваний матеріал. Якщо взята для дослідження антитоксична сироватка нейтра-

Таблиця 21

Схема постановки реакції нейтралізації (кольорова проба)

Компоненти, мл	Пробірки						Контроль	
	1	2	3	4	5	6	сироватки	антигена
Фосфатно-буферний розчин	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Сироватка хворого в розведенні 1:50	0,25→	0,25→	0,25→	0,25→	0,25→	0,25↓	0,25	-
Розведення сироватки	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:100	-
Вірусний діагностикум	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	-	0,25
Термостат 37 °С – 30 хв								
Суспензія культури клітин	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Термостат 37 °С – 6-8 д								
Результат								

лізує токсин, тварини залишаються живими. Контрольні тварини, яким сироватку не вводили, гинуть від дії екзотоксину. Реакція нейтралізації вживається для виявлення токсинів збудників ботулізму, правця, газової анаеробної інфекції. При ботулізмі таку реакцію можна проводити в пробірках, використовуючи визначення фагоцитарного показника в присутності токсину і при додаванні до нього антитоксичної сироватки. При наявності у досліджуваному матеріалі токсину фагоцитарний показник різко знижується, при нейтралізації токсину антитоксином фагоцитарний показник буде в межах норми.

Часто для визначення активності імунних антитоксичних сироваток і анатоксинів вживається реакція нейтралізації за механізмом флокуляції (табл. 22).

Таблиця 22

Визначення активності імунної сироватки

Компоненти, мл	Пробірки					
	1	2	3	4	5	6
Протидифтерійна антитоксична сироватка	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0,05
Дифтерійний анатоксин, 60 І.О.	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Водяна баня 45 °С						
Результат						

У 6 пробірок вносять одержану протидифтерійну сироватку, активність якої потрібно визначити, в зменшуючих кількостях від 0,5 до 0,05 мл. До них додають відому кількість дифтерійного анатоксину по 180 І.О. і ставлять на водяну баню при 45 °С. Час від часу виймають пробірки і розглядають їх, відмічаючи ту, в якій наступила ініціальна флокуляція (помутніння чи пластівці). Визначають титр сироватки в антитоксичних одиницях в 1 мл. Приклад: ініціальна флокуляція відмічена в пробірці з 0,1 мл сироватки, тобто в 0,1 мл сироватки міститься 180 АО і вони зв'язали 180 ІО анатоксину. Таким чином, в 1 мл сироватки міститься $180 \times 10 = 1800$ АО.

Реакція преципітації (РП)

За своєю сутністю реакція преципітації аналогічна реакції аглютинації. В основі її механізму лежить утворення і випадання в осад комплексів антиген-антитіло. Проте вона відрізняється за характером антигенів: в реакції аглютинації вони корпускулярні (цілі клітини), а в реакції преципітації – молекулярні, в розчинному стані. Антигенами можуть бути екстракти мікроорганізмів, тканин, органів, хімічні речовини.

Феномен преципітації полягає в тому, що антитіла (преципітини), з'єднуючись із розчинними антигенами (преципітиногенами), зумовлюють утворення осаду (преципітату) або помутніння розчину (рис. 48). За титр реакції приймають найбільше розведення антигена, яке дає позитивний результат.

Реакція преципітації значно більш чутлива від реакції аглютинації й дозволяє виявити антиген у дуже малих кількостях. Її можна проводити в рідкому і щільному середовищах. Обов'язковою умовою постановки реакції в рідкому середовищі є прозорість компонентів.

Реакція відбувається при змішуванні розчинів антигена й антитіла або нашаруванні одного компонента на інший. В останньому випадку на межі двох реагентів утворюється преципітат у вигляді кільця. Тому така реакція одержала назву **реакції кільцепреципітації**.

Методика постановки реакції кільцепреципітації. У вузькі преципітаційні пробірки наливають 0,5 мл преципітуючої сироватки, а потім обережно пастерівською піпеткою нашаровують по стінці пробірки відповідний антиген. У випадку позитивної реакції через 5-30 хв на межі двох рідин з'являється видиме на темному фоні кільце молочно-білого кольору.

Для аналізу складу антигенів широкого поширення набула реакція преципітації в гелі. Розрізняють просту і подвійну дифузію в гелі.

Проста імунодифузія (реакція Удена). Агаровий гель, який містить преципітуючу сироватку, поміщають у вузькі пробірки і зверху нашаровують розчин антигена. Дифундуючи в гель, антиген зв'язується з відповідними антитілами, утворюючи мутні лінії преципітації (рис. 49, а). Розміщення ліній в агарі визначається концентрацією відповідного антигена.

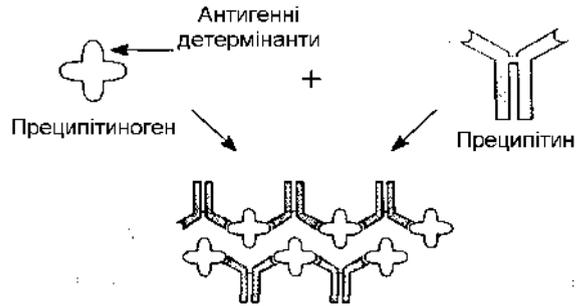


Рис. 48. Схема реакції преципітації.

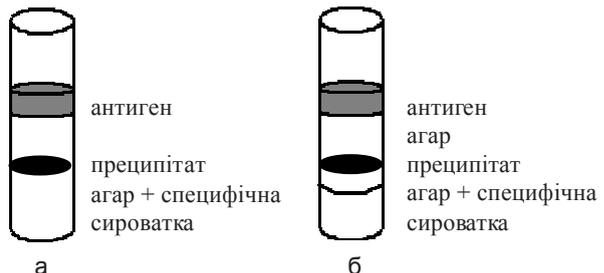


Рис. 49. Реакції імунодифузії.

Подвійна імунодифузія за Оклі і Фулторпом. На відміну від попереднього методу у подвійній імунодифузії реагенти розділені шаром нейтрального гелю, який не містить реагентів. На поверхню гелю, змішаного з специфічною сироваткою, вносять шар нейтрального гелю, після застигання якого нашаровують антиген. Дифундуючи назустріч один одному, антиген і антитіла зустрічаються в шарі нейтрального гелю та утворюють лінії преципітації (рис. 49, б).

Подвійна радіальна імунодифузія за Ухтерлоні. В агарі, який розлитий тонким шаром в чашках Петрі або на предметних скельцях, за допомогою спеціальних штампів роблять круглі лунки на однаковій відстані одна від одної (4-10 мм).



Рис. 50. Реакція подвійної імунодифузії в гелі (Ухтерлоні).

У лунки вносять досліджувану сироватку і розчин антигену в різних розведеннях або різні антигени. Із лунок антигени й антитіла дифундують назустріч один одному, і в точці їх оптимального співвідношення утворюється преципітат у вигляді тоненьких білих ліній. Якщо в сироватці є різні антитіла або антигени декількох видів, з'являються декілька ліній преципітації (рис. 50).

Ухтерлоні розрізняв 4 основні варіанти реакції між антигеном і антитілом (рис. 51):

1) при взаємодії ідентичних антигенів із специфічними антитілами лінії преципітації зливаються, утворюючи дугу;

2) коли обидва антигени неідентичні – лінії преципітації перехрещуються при умові, що сироватка містить антитіла проти двох антигенів;

3) при частковій ідентичності лінії преципітації нагадують дугу із шпорою. Чим більшою є спорідненість антигенів, тим менше виражена шпора і розміщується ближче до дуги;

4) обидві лінії перехрещуються і одночасно зливаються. Це означає, що обидва антигени містять як однакові, так і різні детермінанти, які вступають у реакцію з антитілами поліспецифічної сироватки.

Однією із різновидностей реакції преципітації в гелі є **проста радіальна імунодифузія за Манчіні**. За її допомогою визначають концентрацію імуноглобулінів у сироватці крові.

Методика постановки реакції наступна. Розтоплений агар при температурі 56 °С змішують з відповідною антисироваткою (анти IgG, IgM чи IgA) у співвідно-

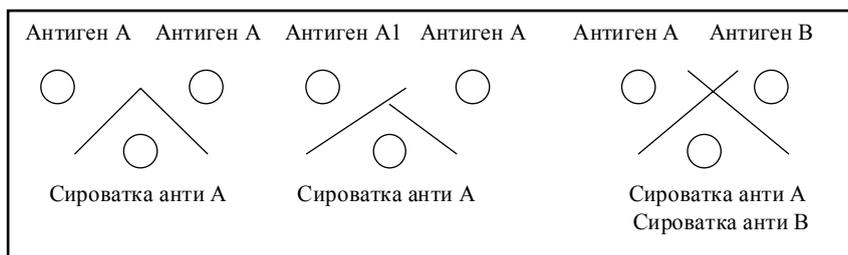


Рис. 51. Варіанти результатів реакції імунодифузії за Ухтерлоні.

шенні 3:1 і швидко виливають у чашку Петрі або на скляні пластинки. Після його застигання з допомогою трафарету роблять лунки. У кожну дослідну лунку вносять по 0,5 мкл досліджуваної сироватки. У чотири контрольні лунки додають у чотирикратних розведеннях стандартну сироватку з відомим вмістом імуноглобулінів. Після чого чашки або пластинки поміщають у вологу камеру (ексикатор) на 24-48 год при 4 °С і оцінюють результати реакції. Вимірюють діаметри кілець преципітації навколо лунок. За величиною цих діаметрів кілець преципітації навколо лунок із стандартною сироваткою будують калібрувальну криву. При цьому враховують, що у певному інтервалі концентрації імуноглобулінів діаметр кільця прямо пропорційний логарифму концентрації імуноглобулінів (рис. 52).



Рис. 52. Реакція радіальної імунодифузії за Манчіні.

Феномен преципітації широко використовується в мікробіологічній практиці. Зокрема, в судово-медичній експертизі його застосовують для визначення видової належності крові. За допомогою специфічних преципітуючих сироваток проти білка людини, різних тварин і птахів можна встановити, якому виду належить виявлена кров. Таким же чином визначають можливу фальсифікацію продуктів (м'ясо, мед). Ця реакція застосовується для діагностики епідемічного цереброспінального менінгіту, чуми, дизентерії тощо. Особливе значення має реакція термопреципітації Асколі, яку використовують для визначення інфікованості збудником сибірки продуктів і матеріалів тваринного походження (шкіра, хутро, щетина). Із досліджуваного матеріалу шляхом кип'ятіння екстрагують сибірковий антиген, який потім використовують для реакції.

Реакція Ухтерлоні за інформативністю переважає всі інші методи, в основі яких лежить феномен преципітації. Її використовують для визначення антигенного складу органів і тканин, як нормальних, так і пухлинних, кількості антигенів у складних системах. Вона має важливе значення в діагностиці дифтерії, віспи та інших захворювань.

Зустрічний імуоелектрофорез. При діагностиці різноманітних бактеріальних і вірусних інфекцій досить часто використовують метод зустрічного електрофорезу, результати якого можна одержати вже через 1-2 години після надходження матеріалу в лабораторію. Будучи порівняно простим у методичному відношенні, він, як і всі імунодифузійні методи, відзначається дуже високою специфічністю.

Імуоелектрофорез є поєднанням двох методів – електрофорезу в гелі і наступної після нього подвійної імунодифузії.

Для проведення реакції імуоелектрофорезу використовують скляні пластинки, предметні скельця, на які наносять тонкий шар агару або агарози. Спочатку антигени розміщують у центрі пластинки і розділяють їх в електричному полі. Потім у канавку, зроблену в агарі паралельно до лінії розділу антигенів, вносять специфічну сироватку. Дифундуючи назустріч один одному, антигени і антитіла у місці контакту утворюють дуги преципітації (рис. 53).

Основні етапи проведення зустрічного електрофорезу:

1. Наносять розтоплений гель тонким шаром 1,2-1,7 мм на поверхню скляної пластинки. Після застигання з допомогою спеціального шаблона вирізають в ньому лунки.

2. У лунки вносять досліджуваний матеріал і стандартні реагенти (антиген-місткий матеріал – ближче до катода, імунну сироватку – ближче до анода).

Якщо процедуру проводять на ацетилцелюлозних мембранах, то наносять по одній краплі реагентів на поверхню попередньо зволоженої мембрани.

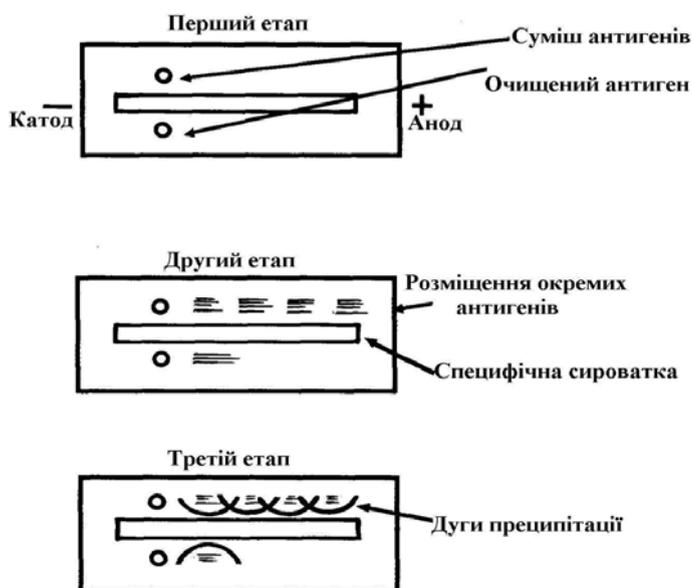


Рис. 53. Схема проведення зустрічного імуоелектрофорезу.

3. Скляні пластинки розміщують в апараті і проводять електрофорез при оптимальній напрузі і визначеній силі струму протягом 30-60 хв.

4. Попередній облік результатів проводять за кількістю ліній преципітації, їх локалізацією, частковою чи повною ідентичністю у порівнянні із стандартними реагентами.

5. Промивають пластинки у відповідному розчині, фарбують, висушують і проводять заключний облік результатів.

Реакція лізису

Для реакції лізису необхідні антиген, антитіло й комплемент. Антигеном можуть бути мікроорганізми, еритроцити або інші клітини. Як антитіло (лізін) використовують специфічну сироватку або сироватку хворого. Залежно від того, проти яких клітин спрямована дія лізінів, вони мають свої назви: проти бактерій – бактеріолізину, спірохет – спірохетолізину, еритроцитів – гемолізину, проти інших клітин – цитолізину. Комплемент при утворенні комплексу клітина (антиген) – антитіло, зв'язується з ним, активується за класичним шляхом і викликає розчи-

нення клітини. Без комплекменту лізис клітини неможливий. Розрізняють декілька реакцій лізису: бактеріолізу, гемолізу, цитолізу. Реакцію бактеріолізу з діагностичною метою практично не використовують. Частіше ставлять реакції гемолізу й цитолізу.

Постановка реакції гемолізу. Компонентами є антиген (еритроцити барана), антитіло (гемолітична сироватка), комплекмент (свіжа сироватка гвінейської свинки або стандартний сухий комплекмент). Для одержання еритроцитів у барана беруть кров із яремної вени у стерильний флакон із скляними кульками й енергійно струшують, щоб нитки фібрину намотались на кульках, і кров не згорнулась. Потім ізотонічним розчином хлориду натрію відмивають еритроцити від плазми. Для цього кров центрифугують 10 хв при 2000 об/хв. Плазму відсмоктують піпеткою, а до осаду еритроцитів знову додають ізотонічний розчин, ретельно перемішують і центрифугують. Таке промивання еритроцитів роблять тричі. Рідину обережно відсмоктують, а з осаду еритроцитів готують 3 % суспензію в ізотонічному розчині.

Гемолітичну сироватку (гемолізін) одержують шляхом імунізації кроликів еритроцитами барана. Після циклу імунізації у них беруть кров, з якої готують сироватку, де містяться антитіла проти еритроцитів. Для інактивації комплекменту, що знаходиться в ній, її прогрівають при 56 °С протягом 30 хв і визначають титр.

Для постановки реакції гемолітичну сироватку беруть у потрібному титрі. Наприклад, якщо титр сироватки 1:1800, то її розводять до 1:600. Комплекмент беруть у розведенні 1:10 (табл. 23).

Таблиця 23

Схема постановки реакції гемолізу

Компоненти, мл	Пробірки		
	1	2	3
Гемолізін у потрібному титрі	0.5	0.5	-
3 % суспензія еритроцитів барана	0.5	0.5	0.5
Комплемент 1:10	0.5	-	0.5
0,85 % розчин хлориду натрію	-	0.5	0.5
Термостат 37 °С – 60 хв			
Результат (гемоліз)	+	-	-

Реакція вважається позитивною, якщо всі еритроцити лізувались. Рідина червоного кольору й абсолютно прозора. Ніякого осаду на дні пробірки немає. Реакція негативна, якщо еритроцити компактно осіли на дно, рідина над ними безбарвна.

Реакція зв'язування комплекменту (РЗК)

Характерною відмінністю РЗК від реакції аглютинації й преципітації є участь в ній, крім антигена й антитіла, інгредієнтів реакції гемолізу, яка виступає у вигляді індикаторної системи. Взаємодія антигена з антитілом не завжди зумовлює візуальні зміни, які дозволяють визначити результат реакції. Проте відомо, що

при утворенні комплексу антиген – антитіло до нього завжди приєднується комплемент. Якщо антиген і антитіло не відповідають один одному, комплемент не зв'язується, залишається вільним у системі. При додаванні комплексу еритроцити барана – гемолізину вільний комплемент, зв'язуючись з ним, викликає гемоліз еритроцитів. Цей принцип і покладено в основу РЗК. При відповідності антигена антитілу з ним зв'язується комплемент. Щоб переконатися в цьому, додають еритроцити барана й гемолітичну сироватку. При відсутності гемолізу роблять висновок, що реакція позитивна, при наявності гемолізу – реакція негативна (рис. 54).

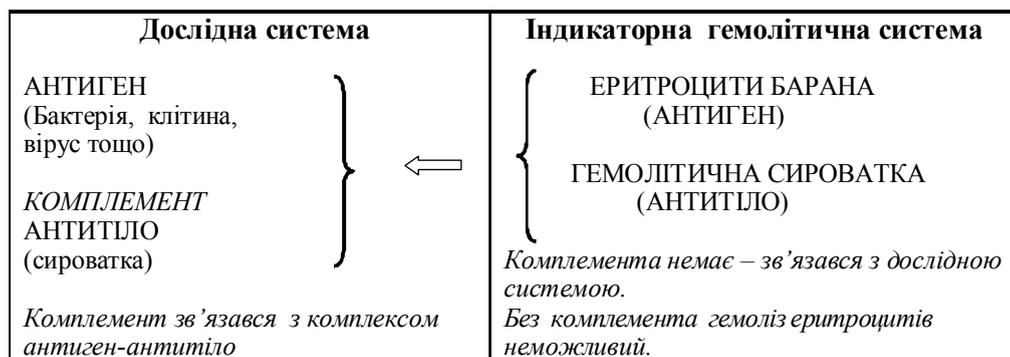


Рис. 54. Схема реакції зв'язування комплементу.

Для сероідентифікації використовують стандартні діагностичні сироватки відомого титру. Для серологічної діагностики досліджувану сироватку прогривають при 56 °С протягом 30 хв, для інактивації власного комплементу, а потім готують ряд послідовних розведень для визначення титру антитіл. Антигенами можуть бути бактеріальні клітини, віруси, білкові або полісахаридні речовини, екстракти органів і тканин.

Комплемент представлено свіжою або ліофілізованою сироваткою гвінейської свинки, яку розводять 1:10. Гемолітичну сироватку використовують у потрібному титрі, а з еритроцитів барана готують 3 % суспензію в ізотонічному розчині хлориду натрію.

Підготовка реагентів. Промисловість випускає стандартні гемолітичні сироватки з відомим титром, який вказаний на етикетці. Але при довготривалому зберіганні з метою перевірки його гемолітичності сироватки перед основним дослідом титрують (табл. 24). У ряді пробірок в об'ємі 0,5 мл готують послідовні розведення гемолізіну до титру. У кожен пробірочку вносять по 0,5 мл 3 % зависі еритроцитів, по 0,5 мл комплементу у розведенні 1:10 і по 0,5 мл фізіологічного розчину. Пробірочки ставлять у термостат при 37 °С на 1 годину. При відсутності гемолізу в контролі оцінюють його ступінь у дослідних пробірках за трьохплюсовою системою: повний гемоліз (+++), частковий гемоліз (++ або +), відсутність гемолізу (–).

За титр гемолітичної сироватки приймають те найбільше її розведення, яке в присутності комплементу викликає повний гемоліз еритроцитів. В РЗК беруть робочу дозу гемолітичної сироватки у потрібному титрі. Якщо титр сироватки складає 1:1800, то робочою дозою буде 1:600.

Таблиця 24

Схема титрування гемолітичної сироватки

Компоненти, мл	Пробірки					Контроль		
	1	2	3	4	5	комплементу	гемолітичної сироватки	еритроцитів
Ізотонічний розчин хлориду натрію	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1,0	1,0	1,5
Гемолітична сироватка в розведенні 1:150	0,5→	0,5→	0,5→	0,5→	0,5↓	-	0,5	-
Розведення сироватки	1:300	1:600	1:1200	1:2400	1:4800	-	1:150	-
3 % суспензія еритроцитів барана	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Комплемент у робочому титрі (1:10)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	-	-
Термостат 37 °С – 60 хв								
Результат								

Титрування комплексу проводять в день постановки РЗК для визначення дози, яку необхідно взяти в реакцію. Вона повинна бути такою, щоб повністю зв'язалась комплексом антиген-антитіло. Якщо якась частина комплексу залишиться незв'язаною, то при додаванні гемолітичної сироватки й еритроцитів, останні будуть лізуватись. А наявність гемолізу, як відомо, свідчить про негативний результат РЗК. Ось чому так важливо визначити титр комплексу.

Перед початком титрування в ампулу з сухим комплексом додають 1 мл ізотонічного розчину. Одержаний розчин додатково розводять 1:10 і використовують як вихідний для визначення титру комплексу.

Для цього в ряд пробірок вносять зростаючі на 0,05 мл дози комплексу, починаючи від 0,05 мл до 0,5 мл, і в кожен пробірник до кінцевого об'єму 1,5 мл додають ізотонічний розчин хлориду натрію.

Попередньо готують гемолітичну систему, яка складається з рівних об'ємів 3 % суспензії еритроцитів барана і гемолітичної сироватки в робочому титрі. Її витримують при температурі 37 °С протягом 30 хв, що необхідно для зв'язування еритроцитів із гемолізином (табл. 25).

Після приготування відповідних розведень комплексу в усі пробірки вносять по 1,0 мл гемолітичної системи і до об'єму 2,0 – 0,5 мл ізотонічного розчину. Суміш змішують і ставлять в термостат при 37 °С на 1 годину.

Результати реакції оцінюють за появою гемолізу. Титром комплексу буде та його найменша кількість, при якій спостерігається повний гемоліз (+++). Робоча доза комплексу завжди буде більшою від титру на 25 %, і практично вона буде міститись у наступній пробірці. Наприклад, якщо в першій пробірці, де є повний гемоліз, знаходилось 0,2 мл комплексу, за робочу дозу приймають 0,25, ту кількість, що знаходиться в наступній пробірці.

Таблиця 25

Схема титрування комплементу

Компоненти, мл	Пробірки										Контроль	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Комплемент у розведенні 1:10	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5	0,5	-
Ізотонічний розчин хлориду натрію	1,45	1,4	1,35	1,3	1,25	1,2	1,15	1,1	1,05	1,0	1,0	1,5
Термостат 37 °С – 30 хв												
Гемолітична система	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Термостат 37 °С – 60 хв												
Результат												

Постановка основного досліді РЗК. Класичну методику постановки РЗК запропонували Ж. Борде і О. Жангу для діагностики хронічної гонореї. Згідно з цією методикою кожен компонент реакції беруть в кількості 0,5 мл, і загальний об'єм її становить 2,5 мл.

При постановці РЗК компоненти вносять у певній послідовності. Спочатку в пробірки, у яких міститься розведена сироватка хворого, додають рівні об'єми антигена і комплементу в робочій дозі. Пробірки ретельно струшують і ставлять у термостат при 37 °С на 1 год. За цей час з'єднується антиген з антитілом, і на цьому комплексі фіксується комплемент. Одночасно в термостаті інкубують гемолітичну систему. Через годину в усі пробірки основного досліді додають по 1 мл гемолітичної системи і знову ставлять у термостат. Через 30-45 хв проводять облік реакції при умові повного гемолізу в контролях сироватки, антигена і комплементу (табл. 26).

Таблиця 26

Схема постановки основного досліді РЗК

Компоненти, мл	Пробірки					Контроль		
	1	2	3	4	5	компле- менту	сиро- ватки	анти- гена
Розчин хлориду натрію	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Сироватка хворого в розведенні 1:50	0,5→	0,5→	0,5→	0,5→	0,5↓	0,5	0,5	-
Розведення сироватки	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:100	1:100	-
Специфічний антиген	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	-	0,5
Комплемент у робочому титрі	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	-	0,5	0,5
Термостат 37 °С – 60 хв								
Гемолітична система	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Термостат 37 °С – 60 хв								
Результат								

РЗК оцінюють за чотириплюсовою системою: різко позитивна реакція (++++, ++++) – повна затримка гемолізу, рідина безколірна або блідо-рожевого кольору, еритроцити осідають на дно; позитивна реакція (++) – часткова затримка гемолізу, рідина рожевого кольору, компактний осад еритроцитів; сумнівна реакція (+) – незначна затримка гемолізу, на дні ледь помітний осад, рідина рожевого кольору; негативна реакція (–) – повний гемоліз, осад відсутній, рідина червона і прозора.

Реакція зв'язування комплементу відзначається більш високою специфічністю ніж реакція аглютинації, проте вона менш чутлива. Антитіла, які зв'язують комплемент, виявляються на 2-4 тижні від моменту захворювання, в той же час аглютиніни можна знайти вже через 1-2 тижні.

РЗК набула широкого розповсюдження для діагностики багатьох інфекційних захворювань, алергічних станів. Вона використовується для серологічної діагностики захворювань бактерійної етіології (сифілісу, лептоспірозу, бруцельозу, туляремії, лістеріозу, озени, орнітозу та ін.), вірусного походження (грипу, паротиту, цитомегалії, поліомієліту, лімфоцитарного менінгіту, енцефаліту тощо), грибкових (кандидозу, асперігельозу), а також токсоплазмозу, пневмоцистозу тощо.

Реакція імунофлуоресценції (РІФ)

Позитивні результати реакцій аглютинації, преципітації, лізису, РЗК й інших спостерігають тільки при оптимальному співвідношенні реагентів. Якщо ця умова не виконується, зафіксувати видимий позитивний результат не завжди вдається.

Чутливість імунологічних реакцій значно зростає завдяки використанню мічених реагентів, наприклад, антитіл, кон'югованих з флуохромом. При зв'язуванні таких імуноглобулінів з антигеном в люмінесцентному мікроскопі спостерігають світіння об'єктів (бактерій, вірусів, клітин), покритих міченими антитілами. Імунофлуоресцентним методом можна також визначати антитіла в сироватці хворого, на поверхні клітин і тканин. У цьому випадку використовують мічені флуоресцеїном сироватки проти глобулінів людини (антиглобулінові), якими обробляють комплекс антиген-антитіло. Внаслідок цього він під дією ультрафіолетових променів починає світитись зеленим світлом.

У першому випадку говорять про прямий, у другому – про непрямий імунофлуоресцентний метод (рис. 55).

Імунофлуоресцентні методи вживаються для виявлення аутоантитіл до тканинних і клітинних антигенів. Використовуючи зрізи тканин, на предметному склі можна виявити антитіла до декількох різних антигенів.

З допомогою імунофлуоресцентних методів можна ідентифікувати окремі клітини в суспензії клітин з допомогою виявлення антигенів на поверхні живих клітин. Для цього суспензію живих клітин, які були попередньо пофарбовані флуоресцентними барвниками, пропускають через спеціальний прилад (цитофлуориметр), який заміряє інтенсивність світіння кожної клітини в різних областях спектра і потім розділяє клітини за параметрами світіння.

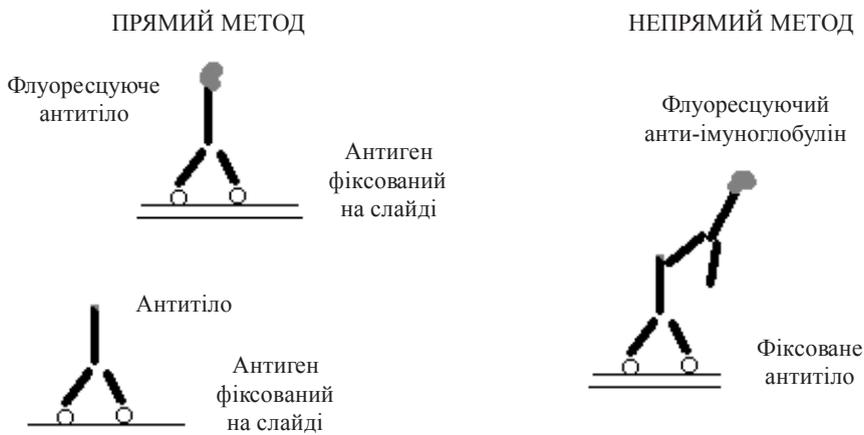


Рис. 55. Реакція імуофлуоресценції (прямий і непрямий методи).

Імуноферментні методи (ІФА)

В імуноферментних методах антиген взаємодіє з антитілом, при цьому один з реагентів зв'язаний з ферментом. Для виявлення цієї ензимної мітки необхідний відповідний субстрат (хромоген), який реагує в місці з'єднання антигена і антитіла з кон'югованим ферментом, змінюючи забарвлення реагуючої суміші.

Для такої мітки широко використовується фермент пероксидаза хрому, яка залежно від субстрату дає різнокольорові продукти реакції. Крім пероксидази хрому може вживатись глюкозна оксидаза (бактерійний ензим, який відсутній в людських тканинах); проте продукт реакції не такий стабільний або нерозчинний, як пероксидаза. Набуває популярності лужна фосфатаза, особливо при використанні технік з подвійною міткою для одночасного виявлення двох антигенів.

Імуноферментні методи широко використовуються у лабораторній практиці; особливо при імуногістологічних дослідженнях, а також для виявлення циркулюючих антигенів, антитіл та імунних комплексів, які мають суттєве значення в діагностиці інфекційних хвороб.

Розрізняють прямі і непрямі імуноферментні методи.

Прямий метод. На першому етапі реакції антиген реагує з антитілом, міченим пероксидазою, потім до утвореного комплексу додають відповідний субстрат (наприклад, H_2O_2 , 5-аміносаліцилову кислоту). Якщо антиген відповідає антитілу, в реагуючій системі виникає певне забарвлення. Методика постановки проста, проте така реакція вживається рідко з приводу меншої чутливості порівняно з іншими методами.

Непрямий метод. Спочатку антиген реагує з неміченими антитілами, утворюючи комплекс антиген – антитіло. Після промивання у систему вносять протиглобулінові антитіла, мічені пероксидазою, які зв'язуються з першим комплексом. Після наступного промивання вносять субстрат, який, розкладаючись адсорбованим ферментом, зумовлює появу відповідного забарвлення (рис. 56).

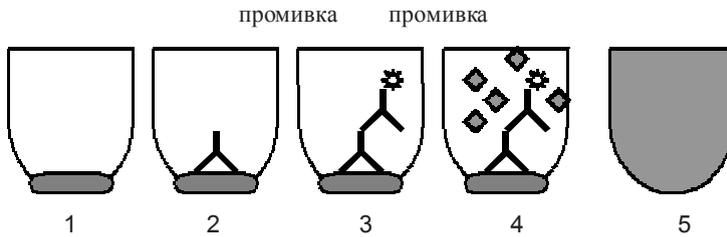


Рис. 56. Схема імуоферментного методу:

- 1 – тверда фаза з фіксованим антигеном; 2 – немічене антитіло, зв'язане з антигеном;
- 3 – антиглобулін, кон'югований з ензимом, зв'язаний з комплексом антиген-антитіло;
- 4 – внесення субстрату; який розкладається ензимом; 5 – зміна забарвлення в лунці свідчить про присутність ензиму, а значить, відповідно антитіла.

Описано різноманітні модифікації техніки непрямого методу. Перші антитіла можуть бути мічені гаптенами, якими є біотин або арсенілова кислота, інші спрямовані проти гаптена, кон'юговані з пероксидазою.

Для маркування реагентів реакції широко використовують можливості системи авідин-біотин. Авідин – глікопротеїн білка курячого яйця, має 4 детермінанти, які зв'язують вітамін біотин. Тому авідин, як і біотин, можна використовувати для мітки антитіл або ензимів (також для інших маркерів, таких як флуоресцеїн або лектин).

Замість авідину, кон'югованого з пероксидазою, в лабораторіях почали застосовувати комплекси авідин-біотин-пероксидаза. Техніка їх використання може бути двоетапною, коли вживаються біотиновані перші антитіла. Біотинована пероксидаза і авідин після змішування утворюють комплекси. Для цього методу вже розроблено комплекси авідину і біотинованої лужної фосфатази.

Техніка подвійної мітки. Останнім часом одержано моноклональні антитіла проти антигенів диференціації (CD), які можуть бути використані для точнішої характеристики різних типів клітин, у тому числі і для диференціації субпопуляцій лімфоцитів. На клітинах одночасно можна виявити два або більше різних антигенів, за якими вони відрізняються між собою.

Для подвійної мітки використовують методуку з'єднання авідин-біотин-пероксидази із моноклональними мишачими антитілами. Одне моноклональне антитіло береться в комплексі авідин-біотин-лужна фосфатаза, при цьому утворюється продукт реакції голубого кольору. У наступному етапі забарвлення з іншим моноклональним антитілом, яке зв'язане з комплексом авідин-біотин-пероксидаза, призводить до виникнення червоного або бронзового продукту реакції. В обох випадках в якості іншого антитіла використовують кінські протимишачі антитіла.

Твердофазні імуоферментні методи. Принцип цих методів полягає в наступному. В якості твердої фази (носія) використовують лунки полістиролових планшет, фільтрувальний папір або нітроцелюлозу, на яких адсорбовано антиген чи антитіло. До антигена, який зафіксований на твердій фазі, додають досліджувану сироватку, а після інкубації і промивання вносять антитіла проти гамаглобулінів людини, мічені ензимом. Після наступної інкубації і промивання додають субстрат

для використаного ензиму, який реагує з ним. Спостерігається кольорова реакція, після затримки якої облік проводять візуально або спектрофотометрично.

Дану методику, твердофазного непрямого імуноферментного методу, найчастіше використовують для виявлення в сироватці антитіл і характеристики специфічних антитіл у різних класах імуноглобулінів. Особливо важливими є модифікації ІФА-IgM з використанням моноклональних антитіл.

Конкурентний твердофазний метод. До антигена, фіксованого на твердо-му носіїві, додають досліджувану сироватку хворого. Специфічні антитіла сироватки зв'язуються з антигенами. Після цього вносять стандартні специфічні антитіла, мічені ферментом. Якщо антитіла сироватки хворого зв'язались з антигеном, мічені антитіла не можуть реагувати з цим антигеном і активність ферменту в луночці буде незначною. При відсутності в сироватці хворого специфічних антитіл, стандартні специфічні антитіла, мічені ензимом, зв'язуються з антигеном, фіксованим на твердій фазі, і при додаванні субстрату для ферменту, спостерігається висока активність ензиму.

Радіоіммунні методи (РІМ)

До радіоіммунних методів відносяться всі імунологічні методи, в яких застосовують мічені радіоактивними ізотопами антигени або антитіла.

Для радіоактивного мічення найчастіше використовують два нукліди: тритій – ^3H і йод – ^{125}J . Радіоактивність заміряють з допомогою лічильників γ -проміння, в яких кількість імпульсів є показником концентрації міченого антигена чи антитіла. Використовують також авторадіографію.

Класична радіоіммунна методика базується на використанні конкурентного зв'язування антитілами досліджуваного антигена і міченого ізотопом антигена, який вносять у конкретну пробу в тій же самій кількості. Чим більша кількість досліджуваного антигена, тим менше міченого антигена зв'язується з антитілами.

Принцип конкурентного РІМ полягає в тому, що спочатку антитіло, розміщене на твердій фазі, інкубують з досліджуваним матеріалом, в якому визначають антиген, потім додають мічений ізотопом стандартний антиген. При наявності в матеріалі специфічного антигена в меншій мірі буде зв'язуватись з антитілом мічений антиген, на що буде вказувати низька радіоактивність у пробі.

Метод “сандвіча” також використовується для дослідження антигенів. У даному випадку антитіло, адсорбоване на твердій фазі, реагує з антигеном. До утвореного комплексу додають специфічне антитіло з радіоактивною міткою, яке зв'язується з антигеном. Кількість міченого антитіла прямо залежить від кількості зв'язаного антигена. Ця модифікація РІМ може застосовуватись для вивчення антигенів, які мають мінімум дві детермінанти, що здатні реагувати з антитілом.

Аналогічна методика може бути використана і для дослідження антитіл. Тоді антиген адсорбують на твердій фазі, вносять досліджувану сироватку і мічений антиген. Кількість зв'язаного міченого антигена є пропорційною кількості досліджуваних антитіл.

Для дослідження алергенів і IgE використовують тести RAST (radioallergo-sorbent test), а також RIST (radioimmunosorbent test) або його модифікацію PRIST (paper-RIST для IgE). З алергенами, які адсорбовані на твердій фазі (фільтрувальний папір Ватман № 50, Сефадекс G-25, Сефароза 4b), реагують досліджувані анти-тіла IgE. На цей комплекс вносять мічені антитіла проти IgE. З допомогою цієї реакції можна виявляти незначні кількості (1-10 пг/мл) IgE. Відповідна модифікація цієї реакції дозволяє виявляти і алергени.

Радіоімунні методи відносяться до найчутливіших імунологічних методів, вони дозволяють виявляти слідові кількості білка (нано-, пікограми). Проте для їх виконання необхідні відповідні специфічні умови, які забезпечують проведення роботи з радіоактивними ізотопами. До недоліків слід віднести і недостатню стійкість радіоізотопних міток у порівнянні з ензимними.

Імуноблотинг

Сучасні методи електрофорезу в гелі дозволяють розділяти біополімери, однак вивчати природу і біологічну активність окремих молекул, які були розділені при електрофорезі досить важко. Це пов'язано з тим, що локалізовані в порах гелю біополімери недоступні для специфічних антитіл, оскільки діаметр пор матриці значно менший за розміри антитіл. У зв'язку з цим було розроблено методику, яка дозволяє вилучати розділені молекули з гелю, переносити і фіксувати їх на поверхні твердого фази у тій послідовності, в якій вони знаходились у гелі. Таким чином, досліджувані антигени, розміщуючись на поверхні нового носія (твердого фази), стають доступними для наступних досліджень.

Процес переносу біополімерів із електрофоретичного гелю та іммобілізація їх на поверхні пористої мембрани називається **блотингом**, а одержаний відбиток – **блотом**.

Для проведення імуноблотингу досліджувані антигени спочатку розділяють з допомогою електрофорезу в гелі. Одержані фракції електрофоретично переносяться на листок нітроцелюлози (блот), який знаходиться в спеціальній камері. Фіксовані блоти обробляють специфічними до антигена антитілами, відмивають і додають радіоактивно мічений кон'югат для виявлення антитіл, які зв'язались з антигеном.

Після повторного промивання листок нітроцелюлози розміщують в касеті з рентгенівською плівкою для радіоавтографії. На проявленій плівці появляться смуги локалізації антигена, який зв'язав мічені антитіла.

Замість радіоактивної мітки можна використати люмінесцентні антитіла або антитіла, кон'юговані з ферментом. В останньому випадку субстрат для ензиму (хромоген) повинен бути попередньо нанесений на нітроцелюлозну мембрану.

Існує багато різноманітних методів, в яких використовується блотинг, наприклад, дот або спот блотинг, Southern блотинг, Northern блотинг, Western блотинг. Всі вказані методи можна віднести до двох груп: тих, в яких використовується гібридизація нуклеїнових кислот і тих, які базуються на феномені реакції антиген-антитіло.

Реакції гібридизації блотинг – високоспецифічні, їх суть полягає у використанні одноланцюгової нуклеїнової кислоти (ДНК або РНК) (генетичний зонд), яка комплементарно зв'язується з досліджуваною ДНК або РНК. Генетичні зонди, що застосовуються в таких реакціях одержують шляхом клонування плазмід, штучного синтезу або з використанням техніки ампліфікації генів. Оскільки ДНК на відміну від РНК складається з двох ланцюгів, то перед дослідженням потрібно розділити дві комплементарні нитки ДНК шляхом нагрівання. Тоді мічена радіоактивним ізотопом або ензимом ДНК може з'єднатись з досліджуваною ДНК. Проте кращою міткою генетичного зонду є біотин. Біотин – розчинний у воді вітамін Н, в структурі якого знаходиться залишок деоксиуридинтрифосфата, який є структурним аналогом трифосфату тимідину. Завдяки цьому біотин вмонтовується у нитку ДНК на місце тимідину, виконуючи роль маркера. Якщо зонд в досліджуваному матеріалі знайде комплементарну йому нитку нуклеїнової кислоти, то його можна виявити, додаючи авідин, зв'язаний з ензимом (пероксидаза хрона). Авідин – білок, який знаходиться в яйці, специфічно здатний зв'язуватись з біотином. Кожна молекула авідину має чотири рецептори, які реагують з біотином. Таким чином, молекули авідину реагують з біотином, який знаходиться в гібридизованому зонді, свідченням чого є зміна забарвлення, зумовлена дією ензиму на специфічний субстрат. Зонди з біотином можна виявити, використовуючи мічені флуорохромом антитіла проти біотину.

Реакції гібридизації блотинг проводяться на мембранах, які містять мікропори і виготовлені з нітроцелюлози або нейлону.

Вестерн імуноблотинг використовується для виявлення антимікробних, антивірусних і протигрибкових антитіл. З цією метою очищені білки (бактерій, вірусів, грибів) розділяють шляхом електрофорезу в поліакриламідному гелі. В останньому білки мігрують і розділяються один від одного, утворюючи невидимі дуги, які складаються з білків різної молекулярної маси. Після розділення дуги електрофоретично переносять на нітроцелюльозну мембрану, що є тою основою, на якій можна буде виявити антитіла проти індивідуальних білків. Мембрану ріжуть на смуги шириною в декілька міліметрів перпендикулярно до дуг і інкубують їх певний час з досліджуваною сироваткою, яка містить антитіла проти білків. Смуги промивають для усунення антитіл, які не зв'язались, і додають мічену антиглобулінову сироватку. Після чого смуги повторно промивають для видалення антиглобулінових мічених антитіл і спостерігають вже видимі дуги в тих місцях, де наступила реакція між антигенами і антитілами. У цьому методі можна використовувати мічені ізотопом антитіла (рис. 57).

Однак, як показали численні спостереження кращим маркером є біотин, застосування якого значно підвищує чутливість реакції і вилючає небезпеку, пов'язану з радіоактивним випромінюванням. Проте застосування біотину вимагає додаткової інкубації і промивання (одне після додавання авідину, який специфічно зв'язується з біотином; друге після внесення субстрату). В результаті хімічної реакції настає зміна кольору і дуги стають видимими.

Вестерн імуноблотинг – різнопланова методика, яка вживається для дослідження різних аспектів імунологічної відповіді в процесі розвитку інфекційного

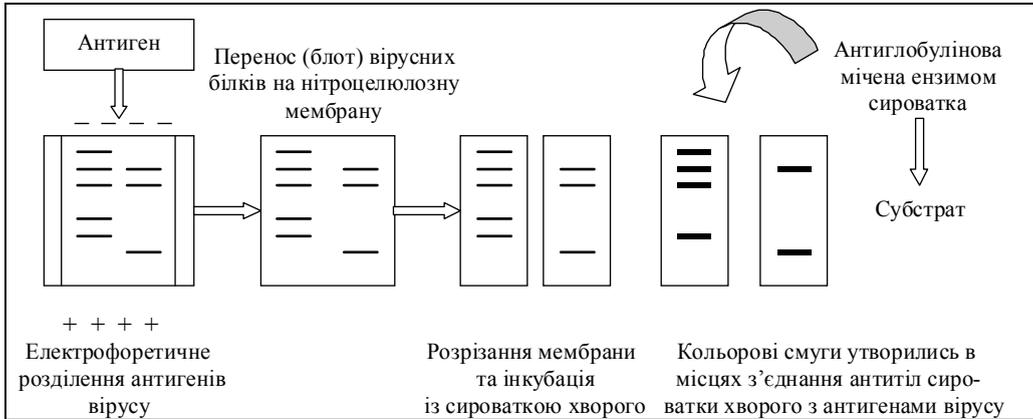


Рис. 57. Схема постановки імуноблотингу.

процесу. З її допомогою можна визначати антитіла не тільки класу IgG, але також анти-IgM, анти-IgA, анти-IgE.

Вестерн блот – методика, яка підтверджує факт зараження ВІЛ на основі виявлення антитіл. Вона використовується для диференціації ВІЛ 1 і ВІЛ 2, а також при змішаній інфекції ВІЛ 1 і ВІЛ 2. Все частіше її застосовують для діагностики захворювань, викликаних іншими вірусами і бактеріями (наприклад, *T. pallidum*, *B. burgdorferi*).

Дослідження імунного статусу організму

Імунологічна система функціонує як багатокомпонентне єдине ціле. Усі її параметри взаємозв'язані і перебувають у постійному коливному ритмі. Постійність імунологічного нагляду організму здійснюється за рахунок балансу між різними рівнями активності структурних компонентів імунної системи. Але при різноманітних патологічних станах показники імунітету можуть відхилятися від нормальних величин, що має як діагностичне, так і велике прогностичне значення і часто вимагає імунокорекції. Тому визначенню стану окремих ланок імунної системи надається велике значення.

Сучасна клінічна імунологія володіє широким арсеналом методів визначення функціональної активності імунної системи, які в комплексі мають високу інформативність, діагностичну і прогностичну цінність.

Згідно з існуючими регламентуючими документами, проводити оцінку імунологічного статусу рекомендується в наступних випадках:

1. При необхідності детального обстеження стану здоров'я людини.
2. При генетичних вадах імунної системи (первинні імунодефіцити).
3. При гострих і хронічних бактеріальних, вірусних і паразитарних інфекціях (вірусні гепатити, сепсис, хронічна пневмонія, лейшманіоз), підозрі на СНІД.
4. При автоімунних і алергічних захворюваннях.
5. При злоякісних новоутвореннях.

6. При деяких хворобах нервової системи (розсіяний склероз).
7. Обстеження в геронтологічних і ендокринологічних клініках.
8. Обстеження реципієнтів до і після трансплантації.
9. Для контролю цитостатичної, імунодепресивної та імуностимулюючої терапії.

У даний час на практиці використовується **двоетапний принцип оцінки імунологічного статусу**.

На першому етапі виявляють загальні характеристики або грубі дефекти у системі клітинного і гуморального імунітету та в системі фагоцитозу з допомогою найбільш простих, орієнтовних тестів. Цим вимогам відповідають наступні **тести першого рівня (орієнтовні)**:

- визначення відносного і абсолютного числа лімфоцитів у периферичній крові;
- визначення кількості Т- і В-лімфоцитів крові;
- визначення концентрації сироваткових імуноглобулінів основних класів (М, G, А);
- визначення фагоцитарної активності лейкоцитів.

Інформативність і надійність цих тестів достатньо висока. Результати можна одержати протягом першої доби.

Більш детальний аналіз імунологічного статусу бажано проводити на другому етапі, якщо мають місце відхилення в орієнтовних тестах або при наявності спеціальних показань.

Для встановлення рівня і вираженості імунологічного дефекту рекомендують наступні тести, які називаються **аналітичними або тестами другого рівня**:

- визначення субпопуляцій регуляторних Т-лімфоцитів (Т-хелперів і супресорних клітин);
- визначення спонтанної міграції лейкоцитів і тест гальмування міграції лейкоцитів з використанням ФГА;
- постановка (при відсутності протипоказань) шкірних тестів гіперчутливості сповільненої і негайної дії на туберкулін, грибові антигени, алергени;
- дослідження проліферативної активності Т- і В-лімфоцитів в реакції бласттрансформації на мітогени, антигени;
- визначення активізаційних маркерів Т-лімфоцитів;
- оцінка синтезу імуноглобулінів в культурі В-лімфоцитів;
- оцінка активності кілерних лімфоцитів (К- і НК клітин);
- визначення компонентів комплементу;
- оцінка різних етапів фагоцитозу.

Оцінка стану В-системи імунітету

1. Визначення концентрації імуноглобулінів у сироватці (метод радіальної імунодифузії за Манчіні). Принцип полягає в тому, що досліджувану сироватку вносять у лунки агару, який містить поліклональні антитіла проти IgM, IgG або IgA у відомій концентрації. Імуноглобуліни дифундують в агар, в місцях їх взає-

модії з специфічним антитілом утворюються кільця преципітації, розмір яких залежить від кількості імуноглобулінів в сироватці. Іноді використовують імуноферментні тест – системи і моноклональні антитіла. Визначення IgE проводять радіоімунним і імуноферментним методами. Рівень сироваткових імуноглобулінів залежить від функціонального стану В-системи імунітету, яка постійно перебуває в стані спонтанної стимуляції різними мікроорганізмами, харчовими антигенами та ін.

2. Антитілоутворення після природної або штучної імунізації. Іншим показником функціонування В-системи імунітету є дослідження рівня антитіл у крові досліджуваних без попередньої штучної імунізації: ізогемаглютининів α і β , антистрептолізинів, антитіл до *E. coli*.

При штучній імунізації можуть бути використані такі препарати: АКДП, бактеріофаг ϕ X174, фосфат полірибози та інші. Після введення антигену регулярно (не рідше як 1 раз на тиждень) протягом місяця визначають рівень сироваткових антитіл.

3. Стимуляція біосинтезу імуноглобулінів В-лімфоцитами *in vitro*. У зв'язку з тим, що при імунізації можуть виникати ускладнення, стали визначати здатність синтезувати антитіла окремими клітинами. Мононуклеари крові культивують *in vitro* з поліклональним активатором В-лімфоцитів – мітогеном лакноса. В результаті стимуляції В-лімфоцити, які знаходились в суспензії мононуклеарних клітин, починають виробляти імуноглобуліни. Максимум їх продукції припадає на 7-12 день культивування.

Інший спосіб базується на підрахунку бляшкоутворюючих клітин проти еритроцитів барана, оскільки при поліклональній стимуляції індукується продукція імуноглобулінів всіма клітинами, в тому числі і тими, які виробляють антитіла проти баранячих еритроцитів.

4. Шкірні проби для виявлення гіперчутливості негайного типу. Результати оцінюють через 20 хв після введення алергену в шкіру. Позитивно вважається проба, якщо з'являється пухирець діаметром не менше 5-7 мм.

5. Кількісні тести визначення Т- і В-лімфоцитів. Велике значення для дослідження стану імунної системи має підрахунок Т- і В-лімфоцитів. Лімфоцити виділяють із периферичної крові за допомогою методу градієнтного центрифугування. Кров хворого беруть із вени в пробірку з гепарином, розводять ізотонічним розчином хлориду натрію у співвідношенні 1:2 і обережно нашаровують на розчин фіколу. Для підвищення його щільності додають верографін або тріозил. Між плазмою і розчином фіколу утворюється ступеневий градієнт щільності. Після центрифугування еритроцити і гранулоцити проходять через фікол і осідають на дно, а моноцити і лімфоцити залишаються у вигляді кільця в інтерфазі. Клітини забирають піпеткою, відмивають і переносять в культуральне середовище.

Для їх підрахунку вживався **метод спонтанного розеткоутворення.**

Розеткоутворення – це процес взаємодії лімфоцитів і ксеногенних еритроцитів з утворенням клітинних конгломератів, які складаються з лімфоцита і приєднаних до нього чужорідних еритроцитів. Останні розміщуються навколо лімфо-

цита, і на вигляд такі конгломерати нагадують розетки. Спонтанне розеткоутворення спостерігається між лімфоцитами і еритроцитами певних видів тварин.

T-лімфоцити людини, маючи рецептори до баранячих еритроцитів, утворюють з ними розетки. Ось чому метод спонтанного розеткоутворення з еритроцитами барана (метод E-розеткоутворення, від E – еритроцити) використовується для виявлення T-клітин людини. Ці лімфоцити позначають як E-РУК (E-розеткоутворюючі клітини).

B-лімфоцити людини мають на своїй поверхні рецептори до еритроцитів мишей і формують з ними спонтанні розетки. Цей тест можна використати для підрахунку B-лімфоцитів. Проте для виявлення B-лімфоцитів більш широко використовували методи розеткоутворення з урахуванням інших рецепторів, які є специфічними маркерами. Такими маркерами є рецептори до Fc-фрагменту імуноглобуліну і до C3 компонента комплементу.

При зв'язуванні комплексу антиген-антитіло (еритроцити – антиеритроцитарні антитіла) з рецептором до Fc-фрагменту формуються так звані EA-розетки. Коли ж до рецептора C3 приєднується комплекс антиген-антитіло-комплемент (еритроцити- антиеритроцитарні антитіла – C3) утворюються EAC-розетки. Відповідно B-лімфоцити часто позначають як EA-РУК або EAC-РУК.

Проте останнім часом для підрахунку лімфоцитів вживаються більш сучасні і специфічні методики.

Однією із таких методик є **цитофлуорометричне дослідження**.

Одержані клітини обробляють моноклональними антитілами, кон'югованими з флуорохромами, проти мембранних антигенів лімфоцитів. Якщо одночасно визначають різні клітини, використовують антитіла, зв'язані з флуорохромами різного кольору.

Так, наприклад, B-лімфоцити визначають за допомогою поліклональних антитіл до загальних детермінант імуноглобулінів або моноклональних антитіл до одного з B-клітинних маркерів, найчастіше CD 19, 20 або 72. Для визначення субпопуляції B₁ використовують метод подвійної імуофлуоресценції з використанням антитіл до CD 19 і CD 5, мічених різними флуорохромами.

Оцінка клітинного імунітету – стану T-системи

1. Шкірні проби гіперчутливості сповільненого типу. Показником гіперчутливості сповільненого типу, а відповідно реактивності системи T-лімфоцитів, є позитивні проби при внутрішньошкірному введенні певних антигенів. По-перше, це класична реакція Пірке, яка характеризується почервонінням, а іноді набряком, в місці введення туберкуліну або його очищеного препарату PPD. Можна вводити правцевий, дифтерійний або стрептококові антигени.

2. Стимуляція лімфоцитів in vitro. У певних ситуаціях лімфоцити крові після їх стимуляції in vitro збільшуються в розмірах і перетворюються в бластоподібні клітини, які активно синтезують ДНК. Цей феномен називається реакцією бласттрансформації лімфоцитів (РБТЛ). Для її постановки використовують

специфічні (антигени) і неспецифічні мітогени (ФГА, конканавалін А, мітоген лаконосу).

Максимально виражена реакція після антигенної стимуляції спостерігається на 4-5 добу після культивування, на неспецифічні мітогени – на 3 добу. Порівняння результатів завжди проводять по відношенню до нестимульованого контролю. Найкращий спосіб обліку реакції базується на здатності клітин, що діляться, синтезувати ДНК. Збільшення мітотичної активності клітин (Т- і В-лімфоцитів) можна визначити за зростанням синтезу ДНК, додаючи за 4-6 год до кінця культивування мічені попередники ДНК (наприклад, H^3 - тимідин). Кількість захопленого клітинами ізотопу визначають за допомогою сцинтиляційного лічильника. Відношення величини включення H^3 -тимідину в стимульованих культурах до величин включення H^3 -тимідину в культурах без стимуляції, відображає вираженість бластогенезу і називається індексом або коефіцієнтом стимуляції. Чим вищий цей показник, тим сильніше виражена РБТЛ. В нормальних умовах у здорових осіб індекс стимуляції складає 10-20 і вище.

3. Кількісні тести визначення Т-лімфоцитів. Т-лімфоцити підраховують за допомогою визначення Е-розеткоутворюючих клітин. Проте, як вже зазначалось, оптимальними сучасними методами є методи, в яких використовують мічені моноклональні антитіла до основного маркера Т-лімфоцитів – CD3.

4. Визначення субпопуляцій Т-лімфоцитів. Субпопуляції Т-лімфоцитів – Т-хелпери і Т-кілери визначають цитофлуорометричним способом з використанням мічених специфічних моноклональних антитіл відповідно проти CD4 і CD8.

5. Функціональна оцінка Т-хелперів. Із периферичної крові виділяють чисту суспензію В-лімфоцитів, культивують її *in vitro* з додаванням клітин, хелперну активність яких хочуть визначити. Оцінку хелперного ефекту проводять за величиною приросту синтезу імуноглобулінів по відношенню до культур, в які не додавали лімфоцити із хелперною активністю. Облік синтезу імуноглобулінів ведеться радіоімуним або імуноферментним методом.

6. Визначення медіаторів лімфоцитів (лімфокінів). Активація лімфоцитів антигенами або іншими біологічними стимуляторами (мітогени, АЛС і т.д.) зумовлює синтез лімфоцитами лімфокінів (фактор переносу, фактор, що пригнічує міграцію макрофагів МФ, хемотаксичний фактор, лімфотоксин, інтерферони, інтерлейкіни, фактор некрозу пухлин та інші). Визначення кількості та активності цих речовин дозволяє робити певні висновки про функціональну здатність лімфоцитів, має значення в діагностиці сепсису й визначенні ефективності протипухлинної терапії.

7. Цитотоксична активність К- і ПК-клітин. Лімфоцити, виділені із крові здорових донорів, можуть руйнувати клітини-мішені, які покриті (сенсibiliзовані) специфічними антитілами. Цей тип цитотоксичності одержав назву антитілозалежної клітинно-обумовленої цитотоксичної реакції. Такі лімфоцити були названі К-клітинами (К – кілер). Це великі гранулярні клітини, основним маркером яких є CD16.

Для виявлення активності **К-клітин** використовують еритроцити, які сенсibiliзують специфічними антитілами. Після такої сенсibiliзації еритроцити (кліти-

ни-мішені) мітять ^{51}Cr та інкубують з лімфоцитами. Останні, лізуючи еритроцити, зумовлюють виділення в середовище радіоактивного хрому. Чим більше ізотопу вивільняється в середовище, тим вища величина цитотоксичності К-лімфоцитів. Зміна показників цього тесту може спостерігатися при автоімунних захворюваннях, а також при деяких імунодефіцитних станах.

Природні кілери (ПК-клітини) знищують чужорідні клітини без участі антитіл. Специфічним їх маркером є CD56. Їх можна виявити, якщо змішати лімфоцити із пухлинними клітинами, міченими радіоактивним хромом. За кількістю виходу із зруйнованих клітин радіоактивної речовини, роблять висновок про активність природних кілерів.

Як К-клітини, так і ПК-клітини також можна визначати за допомогою цитофлуорометричного методу, використовуючи відповідні моноклональні антимаркерні антитіла (анти CD16 і CD56).

Слід зауважити, що існує популяція кілерних клітин, яка володіє одночасно двома вищевказаними антигенними маркерами (CD16 і CD56).

Визначення стану системи фагоцитозу

Існує декілька методів визначення фагоцитарної активності нейтрофілів. Суть одного з них полягає в тому, що виділені нейтрофіли змішують з рівною кількістю суспензії грибків кандиди в присутності АВ-сироватки. Клітини поміщають в термостат при $37\text{ }^\circ\text{C}$ на 1 годину. Після інкубації лейкоцити руйнують 2,5 % розчином дезоксихолату натрію і фарбують 0,01 % розчином метиленової синьки. Підраховують кількість вбитих клітин грибів.

При іншому способі 0,1 мл крові хворого наносять на знежирене покривне скельце і витримують у вологій камері при $37\text{ }^\circ\text{C}$ 45 хв, після чого згусток, що утворився, видаляють пінцетом. Покривне скельце з фіксованими на ньому нейтрофілами промивають в розчині Хенкса, наносять визначену кількість культури стафілокока або кишкової палички і знову інкубують у вологій камері 30 хв. Після чого скельце промивають у розчині Хенкса, препарат висушують, фіксують і фарбують за Романовським–Гімзою. Облік фагоцитарної активності проводять, визначаючи відсоток нейтрофілів із фагоцитованими бактеріями (фагоцитарне число) і кількість поглинутих мікробів з розрахунку на один нейтрофіл (фагоцитарний індекс). У кожному препараті підраховують не менше 200 клітин.

Бактерицидна активність фагоцитів в основному обумовлена ферментним набором клітини. Тому непрямі показники порушення бактерицидної активності можна одержати шляхом визначення різних клітинних ферментів, які характеризують окисні процеси (пероксидаза, кисла і лужна фосфатаза тощо). З цією метою часто використовують реакцію відновлення нітросинього тетразолію у кольоровій цитохімічній реакції.

Результати визначення дають можливість оцінити генерацію формазану за появою синього забарвлення. Аналогічний результат дають люмінесцентні способи реєстрації утворення метаболічно активних форм кисню і вільних радикалів методами реєстрації хемолюмінесценції, яка підсилюється люмінофорами.

Існують і інші методи, які дозволяють аналізувати автоматично кількісно в окремих клітинах відновлення нітросинього тетразолію з допомогою цитофотометра, сполученого з мікроскопом, аналізаторів відеозображення тощо.

Рухливість фагоцитів (лейкоцитів або моноцитів) досліджують за величиною спонтанної міграції із капілярів, а також за зміною міграції в присутності хемотаксичних агентів. Найбільш об'єктивним методом оцінки бактерицидної активності фагоцитів є використання бактерій, мічених радіоактивними ізотопами, з наступним радіоактивним обліком зруйнованих бактерій.

Визначають також кількість нейтрофілів, що несуть на собі Fc, C3 рецептори та ін. (в реакції ЕА і ЕАС-розеткоутворення).

Визначення активності системи комплементу

В десять пробірок вносять сироватку хворого 1:10 (табл. 27), починаючи з 0,05 мл в першу, збільшуючи кількість в кожній наступній на 0,05 мл і до 0,5 мл. Відповідно до загального об'єму 1,5 мл додають в кожну пробірку визначену кількість ізотонічного розчину хлориду натрію, а потім по 1,5 мл попередньо сенсibilізованих еритроцитів. Після інкубації при 37 °С протягом години пробірки охолоджують, еритроцити осаджують центрифугуванням і оцінюють результати за гемолізом.

Таблиця 27

Визначення титру комплементу в сироватці крові

Компоненти, мл	Пробірки										Контроль	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Сироватка хворого (1:10)	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5	0,5	-
Ізотонічний розчин хлориду натрію	1,45	1,4	1,35	1,3	1,25	1,2	1,15	1,1	1,05	1,0	1,0	1,5
Гемолітична система	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Термостат 37 °С - 60 хв												
Результат												

Окремі компоненти сироваткового комплементу визначають в реакції преципітації з використанням специфічних антисироваток і за допомогою моноклональних антитіл імуноферментним методом. Це має велике практичне значення – особливо для виявлення генетичних дефектів системи комплементу. Тому що, визначаючи гемолітичну активність комплементу, можна мати тільки загальну уяву про стан комплементу і ні в якому разі не можна зробити висновок про стан імунної системи особи.

Іноді для дослідження факторів неспецифічної резистентності організму визначають в сироватці людини **титр лізоциму і бета-лізину** (табл. 28).

В 5 пробірок розливають по 0,5 мл фізіологічного розчину. В першу пробірку вносять 0,5 мл досліджуваної сироватки (1:5). Починаючи з цієї пробірки,

Визначення активності лізоциму в сироватці крові

Компоненти	Пробірки				
	1	2	3	4	5
Фізрозчин, мл	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Сироватка хворого (1:5), мл	0,5	→	→	→	↓
Одержане розведення	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160
<i>Micrococcus luteus</i> (1 млрд/мл)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Експозиція	15 хв при 45 °С				
Результати					

послідовно переносять із пробірки в пробірку, закінчуючи четвертою по 0,5 мл. З четвертої – 0,5 мл виливають. Потім в усі пробірки додають по 0,5 мл 1 млрд. суспензії *Micrococcus luteus*. Після прогрівання пробірок при 45 °С протягом 15 хв. враховують результати за максимальним розведенням сироватки, що викликало розчинення бактерій.

Титр бета-лізину визначають аналогічно вище поданому методу, за винятком того, що в якості тест-мікроба використовують культуру *B. subtilis*.

Нижче наведено орієнтовні показники стану імунної системи здорової людини (табл. 29).

При інтерпретації результатів імунограм необхідно проводити сукупний комплексний аналіз показників. Тільки значні зсуви показників $\pm 20\text{--}40\%$ і більше від норми дають реальну інформацію про зміни. Вказані показники завжди потрібно оцінювати в динаміці і виключати можливість їх коливань у зв'язку з фізичним навантаженням, харчуванням, часом доби, сезонністю тощо.

А.М. Земсков запропонував універсальний метод виявлення імунних розладів за наступною формулою:

$$\left(\frac{\text{Показник конкретного хворого}}{\text{Показник прийнятий за норму}} - 1 \right) \times 100$$

Коли підрахована величина має знак “мінус”, у пацієнта є ознаки імунологічної недостатності, при знаку “плюс” – гіперфункція імунної системи. Коли визначена величина знаходиться в інтервалі від 10 % до 33 %, це відповідає першому ступеню імунних розладів, від 34 до 66 % – другому, більше 66 % – третьому.

Запропоновано виділяти легкий ступінь імунодефіциту, який характеризується нормальним або незначним зниженням кількості Т-, В-клітин, нормальною спонтанною міграцією лейкоцитів. При середньому ступені відмічається зменшення кількості лімфоцитів, Т-клітин, значне зниження міграції лейкоцитів. Важкий ступінь дефекту імунітету проявляється значною лейко- і лімфопенією, зменшенням вмісту Т-клітин, пригніченням міграції лейкоцитів.

Останнім часом запропоновано нові підходи до оцінки імунного статусу людини. Один з них базується на патогенетичному принципі аналізу імунного статусу.

Цей спосіб передбачає оцінку основних етапів імунної відповіді – розпізнавання, активацію, проліферацію, диференціацію та імунорегуляцію.

Таблиця 29

Показники імунного статусу людини

Показники	Вміст в 1 мкл (%)		
Абсолютне число лейкоцитів	4500-7000 (100%)		
У тому числі: нейтрофілів	4000 (65%)		
Еозинофілів	200-400 (4%)		
Абсолютне число лімфоцитів	1500-2000 (25%)		
- CD3 (Т-загальні)	800-1200		
- CD4 (Т-хелпери)	500-900		
- CD8 (Т-кілери)	400-600		
- CD16 (NK)	170-400		
- CD20 (В-клітини)	200-400		
HLA II	340-720		
Імуноглобуліни			
IgG	8-12 г/л		
IgM	0,5-1,9 г/л		
IgA	1,4-4,2 г/л		
IgE	20-100 КЕ/л		
ЦіК, (умов. од.)	20-80		
Фагоцитоз			
	Спонтанний	Стимульований	Індекс стимуляції
НСТ-тест (од. млн.кл.)	70-120	150-200	1,2-2
Фагоцитоз (%)	48-88		
Індекс фагоцитозу	1,3-3		
Адгезія (%)	40-55	70-80	
Реакція бласттрансформації			
	ФГА	PWM	
РБТЛ	20-100	5-20	
Комплемент			
C1q	100-250		
C3	700-1800		
C4	200-500		
C5a	0,01-0,03		

Процес розпізнавання можна вивчати, досліджуючи взаємодію антигенпрезентуючих клітин і лімфоцитів, розпізнавання специфічного антигену, імунну відповідь у змішаній культурі лімфоцитів.

Другий етап – активацію оцінюють за експресією антигенів ГКГ II, рецепторів до ІЛ-2, трансферину тощо.

Третій етап – вивчають проліферацію лімфоцитів під впливом мітогенів (ФГА, ЛПС, КонА) і антигенів.

Четвертий етап – диференціацію клітин досліджують шляхом лізису клітин-мішеней Т-лімфоцитами, природними кілерами, макрофагами, а також синтез імунноглобулінів і продукцію цитокінів.

Імунорегуляцію оцінюють за синтезом макрофагами цитокінів і дослідженням субпопуляцій Т- і В-лімфоцитів.

Центральне місце в патогенетичному принципі вивчення імунного статусу займає концепція позитивної і негативної клітинної активації.

При позитивному результаті процес активації лімфоцитів, їх проліферація і диференціація завершуються реалізацією їх безпосередніх функцій. Додатково до вищенаведених тестів суттєвим є визначення експресії на Т-лімфоцитах молекул CD2, CD28, CD 40L, на В-лімфоцитах – CD23, молекул ГКГ II, синтез інтерлейкіна 13 та ін.

Негативна активація завжди закінчується апоптозом. Тому важливе значення має визначення апоптозних маркерів на імунокомпетентних клітинах (Fas антигену і ліганд Fas антигену та ін).

Розділ 10

ІМУНОПРОФІЛАКТИКА ТА ІМУНОТЕРАПІЯ ІНФЕКЦІЙНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ

Характеристика вакцинних препаратів. Інфекційні хвороби можна попередити шляхом активної або пасивної імунізації. Активна імунізація проводиться з допомогою вакцинних препаратів.

Вакцини – препарати, одержані з бактерій, вірусів та інших мікроорганізмів, їх хімічних компонентів, продуктів життєдіяльності або виготовлені штучним шляхом, які застосовуються для активної імунізації людей і тварин з метою профілактики і лікування інфекційних хвороб.

Усі вакцини за способом одержання й характером антигенів поділяють на живі, вбиті, хімічні, субклітинні, субодичні, анатоксини, штучні на основі рекомбінантних ДНК, антиїдіотипові. За кількістю антигенів розрізняють моно-, ди-, три-, тетравакцини тощо.

Для забезпечення виробництва нешкідливих, стандартних вакцин існує єдина система їх випробування і застосування. Вона передбачає: одержання вакцинного штаму, виготовлення достатньої кількості препарату, експериментальна перевірка його на стерильність, токсичність, реактогенність, імуногенність на тваринах, оцінка ефективності на обмеженому контингенті людей, вивчення ефективності при масовому застосуванні.

Живі вакцини – біологічні препарати, виготовлені з живих бактерій або вірусів із пониженою вірулентністю, але вираженими імуногенними властивостями. Вони нездатні в звичайних умовах викликати захворювання, але слабкий інфекційний процес при цьому має місце. Тому живі вакцини, як найбільш ефективні препарати для щеплення, індукують довготривалий і напружений поствакцинальний іму-

нітет. Досить однократного введення препарату, щоб розвинулась несприйнятливність до збудника.

Для виготовлення живих вакцин використовували методи зниження вірулентності (атенуацію) бактерій, вірусів, створюючи несприятливі умови культивування.

Серед живих вакцин найбільш широко використовується протитуберкульозна вакцина БЦЖ (BCG – *Bacterium Calmette, Guerin*).

При виготовленні деяких вакцин збудники культивують у курячому ембріоні (рикетсії висипного тифу, віруси грипу, кору, паротиту), вирощують вакцинні штами у культурах тканин (вакцини проти кору, жовтої гарячки, поліомієліту, сказу).

Крім атенуації, живі вакцини можна одержувати шляхом **селекції** (відбору) з існуючих у природі штамів таких варіантів, які мають найменшу вірулентність (вакцини проти бруцельозу, туляремії, віспи, поліомієліту).

У той же час, незважаючи на високу ефективність, живі вакцини мають ряд недоліків. Їх важко зберігати, стандартизувати, контролювати активність. У людей з імунодефіцитами живі вакцини можуть викликати захворювання.

У даний час знову набуває великого значення метод атенуації. Але докорінно змінилися самі принципи атенуації – зниження вірулентності мікроорганізмів. З цією метою використовують генетично модифіковані мікроорганізми (бактерії, віруси). Такі вакцини містять або непатогенні мікроорганізми, які синтезують антигенні детермінанти певного патогенного збудника, або штами патогенних бактерій, у яких вилучені гени патогенності.

Наприклад, створено штам холерного вібриону, у якого вилучено ген, який кодує А1-пептид – відповідальний за синтез ентеротоксину. Ефективність імунізації таким штамом висока.

Інший сучасний спосіб одержання атенуованих вакцин полягає у вилученні з геному патогенних бактерій ділянок генів, які відповідають за незалежні життєво важливі функції. Вважається, що такі штами будуть мати незначну здатність до розмноження і продукції факторів патогенності. Одержано протисальмонельозну вакцину, у бактерії якої внесені зміни в гени, що кодують синтез ароматичних сполук і метаболізм пуринів.

Сучасні живі атенуовані вакцини більш ефективні ніж інактивовані чи субодиничні.

Інактивовані (вбиті) вакцини. Виготовлення вбитих вакцин складний і відповідальний процес. Він розпочинається з підбору вакцинного штаму, який повинен мати виражені вірулентні та імуногенні властивості. Культуру засівають на оптимальні живильні середовища для одержання значної кількості біомаси бактерій. Після цього готують маточні суспензії, які піддають інактивації. Залежно від її способу, розрізняють гріті вакцини (культуру прогрівають при 56-60 °С протягом 1-2 год); формолові вакцини, спиртові, ацетонові тощо (при дії на мікроби відповідних хімічних речовин). На наступному етапі вакцини стандартизують тобто встановлюють певну густоту їх суспензії (1-4 млрд мікробних тіл в 1 мл). Препарати піддають обов'язковій перевірці на стерильність, антигенність, імуногенність, реактогенність тощо. Після цього одержані вакцини розливають в ампули й закупорюють.

Із вбитих вакцин використовують лептоспірозу, гонококову, грипозну, поліомієлітну Солка, японського та кліщового енцефаліту, антирабічну.

Хімічні вакцини. З метою введення в організм очищених антигенних препаратів, вільних від баластних речовин, з бактерій чи вірусів за допомогою хімічних методів або ультразвуку вилучають окремі антигенні компоненти. Вони й складають основу хімічної вакцини. Такі очищені антигени можна концентрувати й адсорбувати на різних основах, збільшуючи цим їх імуногенну активність. Такі сорбовані вакцини створюють в організмі депо препарату, з якого в кровоток поступово всмоктуються антигени, що забезпечує тривалу імуностимулюючу дію. До найбільш відомих хімічних вакцин належать черевно-тифозна, пневмококова, менінгококова.

Субклітинні вакцини – вакцини, які містять окремі фрагменти мікробних клітин. Наприклад, до складу пневмококової, менінгококової, проти *Haemophilus influenzae* вакцин входять капсульні полісахариди цих бактерій; вакцина проти гепатиту В містить поверхневий антиген вірусу.

Субодиничні вакцини – вакцини, які містять лише окремі білки патогенного мікроорганізму. Для їх створення успішно використовується технологія рекомбінантних ДНК.

Перевагами таких вакцин є те, що вони містять очищений імуногенний білок, вони безпечні, не здатні викликати захворювання, стабільні. Їх хімічні властивості відомі, в їх складі відсутні інші білки і нуклеїнові кислоти, які могли би викликати небажані побічні ефекти в організмі.

Недоліками субодиничних вакцин є те, що очистка специфічного білка коштує дорого, а просторова конфігурація виділеного білка може відрізнятись від вихідного, що може привести до зміни антигенних властивостей.

На сьогодні створені й пройшли апробацію такі субодиничні вакцини:

Таблиця 30

Основні види сучасних субодиничних вакцин

Антивірусні вакцини	Антибактеріальні вакцини	Антипаразитарні вакцини
1. Вітряної віспи-оперізуючого герпесу	1. Ентеротоксину <i>E. coli</i>	1. Лейшманіозна
2. Цитомегаловірусна	2. Холерна	2. Протималярійна
3. Гепатиту А	3. Гонококова	
4. Гепатиту В	4. Лепрозна	
5. Простого герпесу 2	5. Менінгококова	
6. Грипозна А, В	6. Кашлюкова	
7. Парагрипозна	7. Протитуберкульозна	
8. Респіраторно-синцитіальна	8. Черевнотифозна	
9. Антирабічна	9. Протиправцева	
10. Ротавірусна	10. Пневмококова	
11. Проти ВІЛ	12. Стрептококова груп А, В	

Анатоксини – препарати, які одержують із бактеріальних білкових токсинів при дії на них формаліну (0,3-0,5 %) протягом 3-4 тижнів при температурі 39-40 °С.

Після такої обробки токсин втрачає отруйні властивості, але зберігає антигенні. Одержані анатоксини очищають, концентрують й адсорбують на гідроокисі алюмінію. Мікробіологічна промисловість випускає правцевий, дифтерійний, ботулінові, гангренозні, стафілококовий анатоксини. При імунізації цими препаратами в організмі виникають антитіла (антитоксини), які здатні нейтралізувати дію відповідних токсинів. Активність анатоксинів визначають за їх здатністю вступати в реакцію із специфічною антитоксичною сироваткою. Її виражають в одиницях зв'язування (ОЗ) або флокуляційних одиницях.

Силу анатоксину визначають у реакції флокуляції, яка за механізмом подібна до реакції преципітації. Флокуляція – феномен утворення каламутної хмаринки під час взаємодії анатоксину з антитілом. Початкова (ініціальна) флокуляція відбувається при чіткій відповідності кількості антигену й антитіла. Кількість анатоксину, яка зумовлює ініціальну флокуляцію з 1 МО (міжнародною одиницею) антитоксичної сироватки, приймають за одиницю флокуляції.

Асоційовані вакцини. Препарати, до складу яких входять декілька антигенів, одержаних із мікроорганізмів і анатоксинів. Їх переваги в тому, що вони забезпечують імунітет проти декількох інфекцій при одномоментному їх введенні. Випускають такі асоційовані вакцини: АКДП (містить коклюшні бактерії і два анатоксини – дифтерійний і правцевий, які адсорбовані), ДТ-Роліо (дифтерійний, правцевий анатоксини та інактивовані віруси поліомієліту), Пентакт-ХІВ (полісахарид бактерії інфлюєнці, правцевий і дифтерійний анатоксини, інактивованій збудник кашлюка, інактивована вакцина поліомієліту I, II, III) та інші.

Штучні вакцини. Штучне копіювання антигенів і детермінант методами генної інженерії може сприяти створенню вакцин без баластних домішок. Для отримання антигенів з необхідними детермінантами без сторонніх субстанцій існує два напрямки: 1) виділення високоочищеного антигену із природнього матеріалу методами препаративної біохімії або генної інженерії; 2) хімічний синтез антигенних детермінант. Як правило, виділяють або конструюють протективні антигени, адгезини, ферменти, протеїни оболонки, токсини. Незабаром будуть створені вакцини, які забезпечать імунітет до збудників, проти яких поки що надійного захисту немає. Такі препарати можна створити на базі рекомбінантних ДНК, хімічного синтезу та антидіотипних антитіл.

Основою таких рекомбінантних вакцин є перенесення в плазмиду або вірус гена, відповідального за продукцію необхідного антигену (рис. 58). Такі препарати поділяють на генно-інженерні вакцини з антигенів, синтезованих в рекомбінантних бактеріальних системах і дріжджах; векторні генно-інженерні живі вакцини на основі вірусу вісповакцини та інші.

У прокаріотні системи (кишечна паличка, сінна паличка) внесені плазмиди з генами, які контролюють синтез антигенів менінгококів, гонококів, холерних вібріонів, малярійних плазмодіїв.

Все більшого значення набуває новий напрям створення штучних вакцин, який одержав назву – **генної імунізації**. Імунна відповідь формується без введення антигену в організм. Методика базується на включенні в клітини мішені гена,

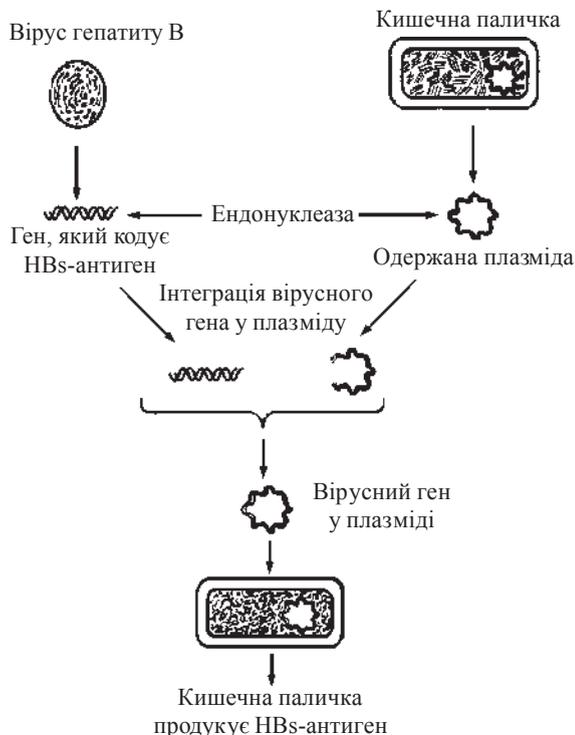


Рис. 58. Схема одержання рекомбінантної протівірусної вакцини.

який кодує антиген. Наприклад, у плазмиду *E. coli* інтегрували ген білка-антигена і такий мікроорганізм використали для внутрішньом'язової імунізації. В результаті, в організмі вироблялись білки-антигени і в сироватці відмічали наявність відповідних антитіл.

Найбільш перспективно використовувати у таких вакцинах, особливо вірусних, корові (нуклеопротеїдні) білки. Ці білки індукують імунну відповідь організму, незалежно від зміни поверхневих антигенів, особливо це стосується ВІЛ і вірусу грипу. Такі вакцини поки що вживаються для експериментальної імунізації тварин (грипозна, антирабічна, протималярійна, проти гепатиту В).

Векторні вакцини. Векторні вакцини найчастіше готуються на основі вірусу вісповакцини. В геном вірусу одночасно вносять гени, що кодуєть антигенні детермінанти різних збудників (вірусів сказу, грипу, ВІЛ, гепатиту В, простого герпесу тощо). Щеплення здійснюють таким модифікованим вірусом вісповакцини. В якості векторів також використовують аденовіруси, поліовірус, вірус вітрянки. Таким чином, векторні вакцини дозволяють провести імунізацію одночасно проти декількох захворювань, індукуючи ефективну імунну відповідь.

Досить актуальним є конструювання вакцин, які безпосередньо можна вводити через рот або через ніс, а не парентерально. У той же час такі оральні вакцини повинні бути стійкими до кислого середовища шлунка і дії травних ферментів. Створені в експерименті вакцини базуються на використанні живих рекомбінантних мікроорганізмів-мікроносіїв для білкових антигенів.

Таким чином, крім вірусів в якості вектора необхідних антигенів можна використовувати і слабо патогенні бактерії. Відомо, що поверхневі антигени бактерій є сильними імуногенами. Один із способів створення таких вакцин є розміщення протективного антигена патогенних бактерій на поверхні непатогенної бактерії. За допомогою рекомбінантних технологій вбудовуються різні епітопи в один флагеліновий ген слабопатогенних сальмонел і такі штами використовуються для пероральної імунізації (табл. 31).

Рекомбінантні оральні вакцини

Вектори	Антигени
<i>S. typhi</i>	Білок оболонки <i>S. mutans</i> , ліпопротеїн <i>Ps. aeruginosa</i> , фімбрії <i>E. coli</i> ,
<i>S. dublin</i>	Ліпополісахарид <i>V. cholerae</i>
<i>S. typhi</i>	О-антигени шигел <i>S. sonnei</i> , <i>S. flexneri</i> ,
<i>S. typhimurium</i>	Антигени збудників правця, туляремії, мембранний білок збудника коклюшу, М-білок, <i>S. pyogenes</i> , білки <i>S. major</i> , <i>Brucella abortus</i>
<i>S. typhimurium</i>	Нуклеокапсид вірусу гепатиту В, нуклеопротеїн вірусу грипу А, поверхневий антиген вірусу Денге 4,
Аденовірус	Білки вірусу сказу,
Вірус вакцини	Білки вірусу сказу, RSV, HIV,
Поліовірус	Білки вірусу HIV

Однак у деяких бактерій антигени не мають білкової структури, що не дозволяє їх одержати генно-інженерним способом. Тому почали створювати так звані антиідіотипні вакцини. Антиідіотипні вакцини це антитіла (антитіла другого порядку), які несуть справжній внутрішній образ детермінант антигену і викликають при його відсутності адекватну імунну відповідь (рис. 59).

Вже розроблені такі вакцини проти стрептококів, вірусів гепатиту В. Вони мають перевагу перед іншими препаратами, оскільки ніколи не зможуть викликати захворювань.

Відкрито і вивчено новий клас імунопотенціаторів – синтетичних поліелектролітів, які активують клітини імунної системи й зумовлюють при їх введенні разом з антигенами сильну імунну відповідь навіть у осіб з генетично детермінованою низькою відповіддю на ці антигени.

У практичній медицині використовується ряд полівакцин для лікування захворювань дихальних шляхів у хворих з хронічними запальними процесами. Наприклад, вакцина ВП-4, яка містить антигени стафілокока, клебсієли пневмонії, протей, кишкової палички при введенні через рот або через ніс виявилась досить ефективною.

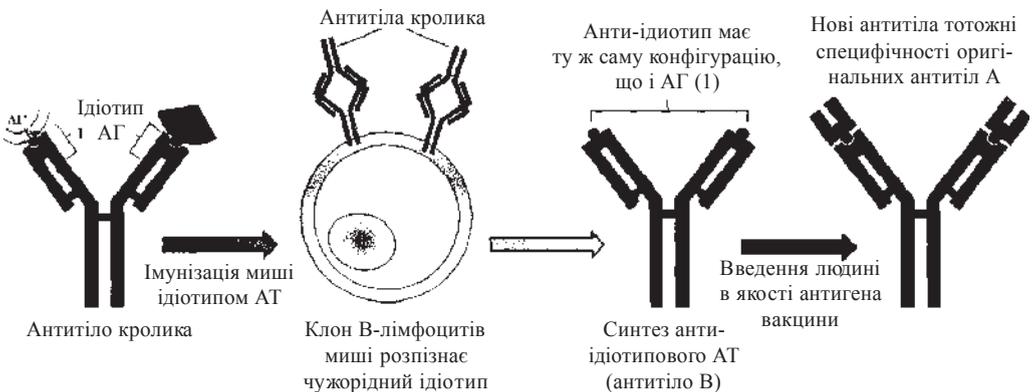


Рис. 59. Схема одержання антиідіотипних вакцин.

Створення й широке застосування таких вакцин забезпечить поступовий перехід від ін'єкційних вакцин до таких препаратів, що в значній мірі полегшить технічні й психологічні аспекти вакцинації.

Останніми роками одержані вакцини, білки яких синтезуються рослинними клітинами, в хромосому яких інтегровано гени окремих вірусів і бактерій. Проходять клінічні випробування такі вакцинні препарати, що містяться в моркві, бананах тощо. Таким чином незабаром зникне необхідність ін'єкційного методу введення вакцин.

Показання і протипоказання до проведення профілактичних щеплень

Планова імунізація проти багатьох інфекцій проводиться всьому населенню, яке не має протипоказань до щеплень. Проте, залежно від епідеміологічної ситуації в певних регіонах проводять вакцинацію проти захворювань, які дають епідемічні спалахи (дифтерія). Має значення і професійний фактор. Так, на територіях, де реєструють захворювання на сибірку, лептоспіроз, туляремію, бруцельоз, в першу чергу вакцинують людей, які можуть заразитись у зв'язку з особливостями їх роботи.

Планову вакцинацію дітей і дорослих проводять у терміни, передбачені календарем щеплень (табл. 32).

Таблиця 32

Календар профілактичних щеплень

Вік	Щеплення проти				
1 день		Гепатиту В			
3 день	Туберкульозу				
1 місяць					
3 місяці		Гепатиту В	Дифтерії, коклюшу, правця	Поліомієліту	
4 місяці			Дифтерії, коклюшу, правця	Поліомієліту	
5 місяців		Гепатиту В	Дифтерії, коклюшу, правця	Поліомієліту	
6 місяців					
12-15 місяців					Кору, краснухи, паротиту
18 місяців			Дифтерії, коклюшу, правця	Поліомієліту	
3 роки				Поліомієліту	Кору, краснухи, паротиту
6 років			Дифтерії, правця	Поліомієліту	
7 років	Туберкульозу				
11 років			Дифтерії,		
14 років	Туберкульозу		Дифтерії, правця	Поліомієліту	

Продовження табл. 32

Вік	Щеплення проти				
15 років					Краснухи (дівчата), паротиту (хлопці)
18 років			Дифтерії, правця		
Дорослі		Гепатиту В	Дифтерії, правця		

Протипоказаннями для проведення всіх видів щеплень є гострий гарячковий стан. При імунодефіцитних станах не можна проводити щеплення живими вакцинами (БЦЖ, коровою, паротитною, поліомієлітною). При хронічних захворювання нервової системи протипоказано вводити живі корову й паротитну вакцини, АКДП і ДП. Заборонено щеплення вакциною БЦЖ осіб із тяжкими формами алергічних захворювань.

Імунізацію населення здійснюють у спеціальних кабінетах профілактичних щеплень, які розміщуються в поліклініках, дошкільних закладах і школах. У кожному кабінеті повинні бути холодильник для зберігання імунологічних препаратів, стіл, кушетка, шафа для інструментів, шафа з медикаментами для першої допомоги при виникненні післявакцинальних реакцій.

До проведення щеплень допускаються спеціально підготовлені медичні працівники, які ознайомлені з інструкціями із застосування вакцин, технікою їх введення, порядком надання першої допомоги при необхідності. Імунізація проводиться під керівництвом лікаря. Усі вакцини необхідно вводити в організм із дотриманням правил асептики й антисептики. Дільнична медична сестра щомісячно відбирає дітей, яких потрібно імунізувати в наступному місяці, з врахуванням існуючого календаря щеплень.

Серотерапія і серопротекція

Часто необхідно терміново попередити розвиток захворювання в людини, яка була в контакті з джерелом інфекції. Такий захист досягають введенням готових антитіл (імуних сироваток, імуноглобулінів). Імунні сироватки та імуноглобуліни вживають і для лікування інфекційних захворювань, особливо тих, при яких вирішальну роль відіграють білкові токсини. Усі лікувально-профілактичні сироватки поділяють на антитоксичні, антимікробні й антивірусні.

Антитоксичні сироватки (протиправцева, протидифтерійна, протиботулінові, протиангренозні та ін.) виготовляють у науково-дослідних інститутах шляхом гіперімунізації коней відповідними анатоксинами (дифтерійним, ботуліновим, гангренозним тощо). Після кількох циклів гіперімунізації в коней беруть кров і одержують відповідну антитоксичну сироватку, в якій міститься величезна кіль-

кість специфічних антитіл (антитоксинів). Сироватки очищують від баластних речовин, перевіряють на стерильність, нешкідливість, апірогенність і активність. Їх обов'язково титрують, тобто визначають концентрацію антитіл, яку виражають у антитоксичних одиницях (АО) або в міжнародних одиницях (МО). За одну таку одиницю приймають найменшу кількість сироватки, яка нейтралізує певну кількість DLM відповідного токсину. Для кожного виду сироватки є своє визначення АО (МО). Так, за 1 АО протидифтерійної сироватки приймають найменшу її кількість, яка нейтралізує 100 DLM дифтерійного токсину для гвінейської свинки масою 250 г. На етикетках ампул із сироватками обов'язково вказують кількість АО (МО), що необхідно для визначення лікувальної чи профілактичної дози.

Антимікробні (антивірусні) сироватки виготовляють шляхом гіперімунізації тварин відповідними вбитими бактеріями (вірусами) або їх антигенами.

Останнім часом замість нативних антитоксичних і антимікробних (антивірусних) сироваток виготовляють відповідні γ -глобуліни, адже саме у цій фракції сироваткових білків концентруються антитіла. Для них також вказують одиниці активності, переважно МО.

Пасивну профілактику можна також здійснити за допомогою сироватки людини, яка перенесла цю хворобу (кір). Взагалі в сироватці людей у невеликій кількості містяться антитіла проти вірусів поліомієліту, кору, грипу, збудників кашлюка, скарлатини. Одержуючи із сироватки людський γ -глобулін, мають препарат із високою концентрацією захисних антитіл. В епідемічному вогнищі цей препарат призначають особам, які були в контакті з джерелом інфекції.

Людські гаммаглобуліни, які містять значну кількість антитіл проти токсинів, одержують шляхом імунізації донорів відповідними анатоксинами з подальшим осадженням γ -глобулінової фракції із сироватки.

Розрізняють **γ -глобуліни специфічної дії і нормальний γ -глобулін**. До γ -глобулінів специфічної дії належать: протиправцевий, протидифтерійний, протистафілококовий та інші.

Нормальний γ -глобулін одержують із плазми крові декількох тисяч здорових донорів і використовують для попередження респіраторних інфекцій у дітей, для профілактики гепатиту А, епідемічного паротиту, кору, вітрянки. Очищаючи γ -глобуліни від неспецифічних антитіл, отримують **імуноглобуліни спрямованої дії** (антистафілококовий, проти синегнійної палички).

Випускають **комплексний імуноглобуліновий препарат** для перорального і ректального введення, який містить IgM, IgG, IgA і характеризується значним вмістом антитіл до ентеробактерій (шигел, сальмонел, ешерихій).

У даний час широко використовують такі препарати для пасивної профілактики і лікування інфекційних захворювань:

Імуноглобуліни людини: протигрипозний, протикашлюковий, протидифтерійний, протиправцевий, проти кліщового енцефаліту, вітряної віспи, гепатиту А, протистафілококовий, протиботулінові.

Гетерологічні сироватки та імуноглобуліни: протидифтерійна, протиправцева, протиботулінові А, В, Е, протигангренозні – кінські; антирабічний імуно-

глобулін, протисибірковий імуноглобулін, одержані із сироватки коней, імуноглобулін проти кліщового енцефаліту.

Захисна дія гамма-глобулінів триває короткий період: 2-3 тижні.

Чужорідні сироватки та γ -глобуліни, одержані при імунізації тварин, при введенні людям можуть часом викликати ускладнення (анафілактичний шок, сироваткову хворобу тощо). При першому введенні вони обумовлюють розвиток сенсibiliзації, а при повторному – розвиток алергічних реакцій негайного типу. Такі реакції у осіб, які були раніше сенсibiliзовані продуктами кінського походження, можуть виникати й після першого введення гетерологічних сироваток.

Найбільш небезпечним ускладненням після застосування сироваток є анафілактичний шок. Симптоми даного ускладнення, яке розвивається, як правило, безпосередньо після ін'єкції препарату, характеризується розвитком гострої серцево-судинної недостатності й бронхоспазму.

Перші прояви шоку – неспокій, загальна слабкість або збудження, відчуття страху, запаморочення, шум у вухах, холодний піт, біль за грудиною або у животі, утруднене дихання. У тяжких випадках, особливо у відсутності екстреної медичної допомоги, через 5-30 хв. може наступити смерть.

При перших ознаках анафілактичного шоку необхідно здійснити такі заходи:

- *Припинити введення препарату.*
- *Покласти хворого (голова нижче ніг), повернути голову набік, попередити западання язика.*
- *Якщо препарат було введено в кінцівку, накласти джгут вище місця ін'єкції не більше як на 25 хв.*
- *Обколоти місце ін'єкції 0,3-0,5 мл 0,1 % розчину адреналіну з 4,5 мл 0,9 % розчину хлориду натрію.*
- *На місце ін'єкції покласти лід або грілку з холодною водою на 10-15 хв.*
- *У кінцівку, вільну від джгута, ввести розчини димедролу, допаміну, гідрокортизону.*

Терміни розвитку сироваткової хвороби після введення гетерологічної сироватки залежать від часу і частоти введення препарату. Так, після першого введення симптоми хвороби проявляються в середньому через 7-10 днів, а при повторному – через більш короткий термін, – від декількох годин до 2-3 днів. Тривалість хвороби залежить від її тяжкості і складає від декількох днів до 2 тижнів.

Для лікування застосовують протигістамінні препарати, адреналін, препарати кальцію та інші симптоматичні середники.

Для профілактики виникнення анафілактичного шоку перед введенням будь-якої гетерологічної сироватки необхідно обов'язково поставити внутрішньошкірну пробу з розведеною 1:100 сироваткою коня, яка знаходиться у коробці з препаратом (ампула маркірована червоним кольором). Розведену сироватку вводять внутрішньошкірно у згинальну поверхню передпліччя в об'ємі 0,1 мл. Облік реакції проводять через 20 хв. Проба вважається негативною, якщо діаметр на-

брюку (гіперемії) у місці ін'єкції, менший 1 см. Проба рахується позитивною, якщо вказані ознаки досягають у діаметрі 1 см і більше.

У випадку негативної шкірної проби нерозведену сироватку (ампула маркірована синім кольором) вводять в об'ємі 0,1 мл підшкірно у ділянку середньої третини плеча. При відсутності місцевої або загальної реакції через 30-60 хв внутрішньом'язово вводять необхідну дозу сироватки, підігріту до температури 36 °С.

Якщо шкірна проба позитивна, а також при розвитку реакції на підшкірну ін'єкцію 0,1 мл нерозведеної сироватки, препарат застосовують тільки за життєвою необхідністю.

Для десенсибілізації сироватку, розведену 1:100, вводять підшкірно послідовно в об'ємі 0,5 мл, 2 мл, 5 мл з інтервалом 15-20 хв, потім з такими ж інтервалами вводять підшкірно 0,1 мл і 1,0 мл нерозведеної сироватки. При відсутності реакції вводять призначену дозу сироватки.

Одночасно з початком десенсибілізації хворому проводиться протишокова терапія. Завжди наготові необхідно мати розчин адреналіну 1:1000 або 0,5 % розчин ефедрину.

Техніка проведення профілактичних щеплень. Для введення в організм людини препаратів використовують як парентеральні (внутрішньом'язовий, підшкірний, внутрішньокірний, скарифікаційний), так і непарантеральний (через рот, у свічках, у клізмах, інтраназально) методи. Практичне застосування того або іншого методу визначається, з одного боку, біологічними властивостями препарату, з іншого – його призначенням.

Внутрішньом'язове введення. Основним місцем внутрішньом'язового введення визначено верхній зовнішній квадрант сідниці, а також передньозовнішня ділянка стегна. Деякі препарати вводять також у дельтоподібний м'яз. Саме так вводять сорбовані препарати (АКДП – вакцина, АДП, АДП-М, АП анатоксин), оскільки місцева реакція при цьому виражена в меншій мірі, ніж при підшкірному введенні. Шкіру в місці ін'єкції препарату до і після введення обробляють 70 % етиловим спиртом.

Підшкірне введення. Основне місце ін'єкції – підлопаткова ділянка або верхня третина зовнішньої поверхні плеча.

Внутрішньошкірне введення. Таким способом вводять вакцину проти туберкульозу БЦЖ. Місце її введення – межа верхньої і середньої третини зовнішньої поверхні плеча. Використовують спеціальні однограмові або туберкулінові шприци й тонкі голки з коротким зрізом. Голку вводять зрізом вгору у поверхневий шар шкіри, паралельно до її поверхні. При правильному введенні повинна утворитись папула білого кольору у вигляді “лимонної кірочки” діаметром 7-8 мм, яка зникає через 15-20 хв.

Внутрішньовенне введення. Цим способом, в основному, вводять імуноглобуліни людини для внутрішньовенного введення – препарати, які позбавлені антикомплементарних властивостей. Необхідно суворо витримувати температуру препарату, що вводиться (36-37 °С), його розведення і швидкість введення. Інші імуноглобуліни вводити таким способом не можна. Внутрішньовенний спосіб викори-

стовується також при введенні специфічної плазми (антистафілокової, антисингнійної, антипротейної), а також за життєвими показниками і гетерологічних сироваткових препаратів.

Нашкірний (скарифікаційний) метод застосовують для щеплення деякими живими бактеріальними вакцинами (бруцельозна, Ку-лихоманки, сибіркова, туляремійна, чумна). На шкіру внутрішньої поверхні передпліччя наносять необхідну кількість крапель вакцини і через них скарифікатором роблять неглибокі надрізи. Кількість крапель, число надрізів, їх довжина і відстань один від одного визначаються інструкцією по застосуванню конкретного препарату.

Пероральний спосіб вакцинації використовують при щепленні проти поліомієліту, чуми, холери. Ці препарати слід вживати натщесерце.

Гібридоми і моноклональні антитіла. Гібридоми – клітини, одержані в результаті злиття лімфоцитів від імунізованої певним антигеном миші з гістогенетично близькою пухлиною (мієломою). Ці клітини здатні нескінченно ділитись і продукувати специфічні антитіла. Антитіла, що синтезуються одним клоном гібридних клітин, одержали назву моноклональних. Вперше здійснили цей процес Г. Келлер і Ц. Мільштейн у 1975 році. До моменту одержання гібридом в імунології не було препаратів специфічних антитіл такої чистоти.

Гібридоми – не тільки «фабрики» антитіл *in vitro*, вони – новий штучно створений об'єкт, на якому стало можливим проводити різноманітні дослідницькі роботи, що недавно вважались фантастикою. Клонова гібридома – це самовідтворююче джерело генетично ідентичного матеріалу, яке дозволило виділяти й клонувати гени антигенспецифічних антитіл.

Етапи одержання гібридоми. 1. Імунізація мишей антигеном, проти якого потрібні антитіла. 2. Виділення клітин селезінки імунізованих тварин. 3. Одержання клітин мієломи у мишей, уражених цією пухлиною. 4. Злиття клітин селезінки з клітинами мієломи. 5. Тестування необхідних клітин і їх клонування. 6. Культивування гібридом в організмі тварин або в культуральних середовищах. 7. Очистка гібридомних антитіл.

Моноклональні антитіла, які виробляються гібридомами, набули широкого застосування в біології й медицині. Вони використовуються для ідентифікації і очистки молекул і клітин, які несуть специфічний антиген, для імуноаналізу біологічних рідин і клітин організму, для лікування і дослідження етіології й патогенезу різних захворювань.

Частина III

СПЕЦІАЛЬНА МІКРОБІОЛОГІЯ

Розділ II

МІКРОБІОЛОГІЧНА ДІАГНОСТИКА ОКРЕМИХ ІНФЕКЦІЙНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ

Стафілококові інфекції

Рід *Staphylococcus* охоплює кулясті нерухомі аспорогенні грампозитивні факультативно-анаеробні бактерії, що належать до родини Мікососсасеае. У визначнику бактерій Д.Бергі наведені диференціальні ознаки 29 видів стафілококів. Вони поділяються на дві групи – коагулазопозитивні й коагулазонегативні. До першої групи належать *S. aureus*, *S. intermedius* і *S. hyicus*. Їх роль в інфекційній патології нерівнозначна. Найчастіше різноманітні захворювання у людей і тварин викликає *S. aureus*, значно рідше – *S. hyicus*. *S. intermedius* патогенний тільки для тварин. Впродовж багатьох років коагулазонегативні стафілококи вважали непатогенними. Але тепер ця точка зору змінилася. У зв'язку з погіршенням екологічної ситуації в більшості країн та пов'язаним з нею пониженням природного імунітету почастишали випадки гнійно-септичних уражень тканин і органів, викликаних коагулазонегативними видами, які зустрічаються на шкірі та слизових оболонках людини (*S. epidermidis*, *S. auricularis*, *S. capitis*, *S. cohnii*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. lentus*, *S. saprophyticus*, *S. schleiferi*, *S. simulans*, *S. warneri*, *S. xylosus* та ін.).

Серед епідеміологів, мікробіологів і клініцистів досить поширене переконання, що сьогодні непатогенних стафілококів не існує. Все частішають випадки виділення з крові, тканин і органів культур стафілококів без будь-яких маркерів патогенності. Однак, при елімінації їх з організму зникають всі симптоми захворювання. Все це необхідно враховувати при проведенні лабораторної діагностики стафілококових інфекцій. На жаль, у рутинних бактеріологічних лабораторіях нашої країни поки що можлива ідентифікація лише *S. aureus*, *S. epidermidis* і *S. saprophyticus*.

Стафілококи найчастіше уражають шкіру, її придатки та підшкірну клітковину. Вони викликають фурункули, карбункули, панариції, пароніхії, абсцеси, флегмони, мастити, лімфаденіти, нагноєння ран, в тому числі й операційних. У дітей стафілококи є збудниками стафілодермій, епідемічних пухирчаток, імпетиго. Їх виділяють при плевритах, бронхітах, пневмоніях, перитонітах. Вони можуть спричинити ангіни, тонзиліти, гайморити, отити, кон'юнктивіти, дещо рідше – менінгіти, абсцеси мозку, міокардити, ендокардити, артрити, інфекції судинних про-

тезів. Дуже небезпечні харчові токсикоінфекції, ентероколіти, холецистити, цистити, пієліти, пієлонефрити. При проникненні в кров або кістковий мозок викликають сепсис, остеомієліт, синдром токсичного шоку. Проте всі захворювання стафілококової етіології не розглядаються як гострозаразні.

Взяття матеріалу для дослідження. При стафілококових інфекціях досліджують гній, кров (при сепсисі), виділення слизових оболонок, харкотиння, запальний ексудат, ліквор, рановий вміст, плевральний випіт, жовч, сечу. В разі підозри на токсикоінфекцію – блювотні маси, промивні води шлунка, випорожнення, залишки їжі (особливо сир, молоко, тістечка, торти, креми, морозиво та ін.). При санітарно-бактеріологічних контролях досліджують змиви з рук, столів та інших предметів. У бактеріоносіїв матеріал забирають тампоном окремо з глотки та носових ходів.

Із відкритих гнійних уражень матеріал беруть стерильним ватним тампоном після видалення ранового нальоту, в якому може бути сапрофітна мікрофлора з повітря, шкіри тощо. При закритих гнояках роблять пункцію шприцом. Слиз із рото- й носоглотки беруть стерильним тампоном. Харкотиння й сечу забирають у стерильні пробірки, банки. Кров (10 мл), взяту із ліктьової вени, й ліквор – при пункції спинномозкового каналу, з дотриманням асептики сіють біля ліжка хворого в 100 мл цукрового бульйону. Кров рекомендують швидко (до її згортання) вносити прямо із шприца у флакон з бульйоном, ретельно перемішати, запобігаючи утворенню згустка. Проби крові не можна заморозувати. У 25 % випадків при стафілококовому сепсисі кількість бактерій в крові (КУО) може бути менше 1/мл. При підозрі на такий стан необхідно сіяти 25-30 мл крові.

Бактеріоскопічне дослідження. Майже з усіх досліджуваних матеріалів (гній, рановий вміст, ексудат, харкотиння, осад сечі тощо) за допомогою бактеріологічної петлі виготовляють мазки, забарвлюють за Грамом і мікроскопують. Лише з крові та змивів мазки не роблять оскільки в них мала кількість мікроорганізмів. У типових випадках стафілококи мають кулясту форму, фіолетовий колір, розташовуються несиметричними гронами, але зустрічаються й одинокі клітини, пари або тетради (рис. 60).

Останнім часом у зв'язку з широким використанням антибіотиків морфологія стафілококів змінилась і типового їх розташування в мазках із гною часто не спостерігають. У зв'язку з цим відрізнити стафілококи від стрептококів за їх морфологією та взаємним розташуванням часто практично неможливо. Тому потрібно робити посів, виділяти чисту культуру та ідентифікувати її.

Але й первинна мікроскопія може дати попередню відповідь в разі виявлення типових грампозитивних коків правильної круглої форми, розташованих гронами і при великій кількості бактерій у полі зору. Вона також дає змогу вибрати необхідні

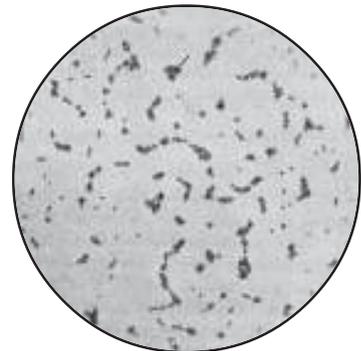


Рис. 60. Стафілокок
(мазок із чистої культури).

для посіву елективні середовища, провести пряме визначення чутливості до антибіотиків мікрофлори гною ще до виділення чистої культури (див. вкл., рис. 9).

Бактеріологічне дослідження. Матеріал від хворих і бактеріоносців засівають негайно або не пізніше 3-4 год після взяття при умові зберігання його на холоді.

В перший день петлею, шпателем або безпосередньо тампоном роблять посіви на кров'яний агар та елективні для стафілококів середовища (жовтково-сольовий (ЖСА) або молочно-жовтково-сольовий агар (МЖСА). Чашки з посівами інкубують при 37 °С протягом 48 год, або одну добу в термостаті й додатково 24 год при кімнатній температурі при хорошому освітленні. Якщо в досліджуваному матеріалі бактерій мало (дані мікроскопії) – посів для збагачення роблять ще й у тіогліколеве середовище.

На другий день проводять висів із цукрового бульйону на вказані елективні середовища, досліджують масивність росту й характер колоній після посівів інших матеріалів. На кров'яному агарі стафілококи утворюють непрозорі, злегка опуклі колонії середніх розмірів з гладенькою, блискучою, немовби полірованою поверхнею, чітко окресленим краєм, маслянистої консистенції. Патогенні штами утворюють навколо колоній прозорі зони гемолізу (див. вкл., рис. 8). На елективно-диференціальних середовищах, як правило, виростають лише колонії стафілококів. Зокрема, на жовтково-сольовому агарі вони утворюють колонії із зоною помутніння навколо них і характерним райдужним вінчиком по периферії (лецитовітелазна реакція). На молочно-жовтково-сольовому агарі виявляють наявність пігменту, який може бути золотистим, палевим, білим, жовтуватим, оранжевим та ін.

Із всіх типів колоній виготовляють мазки, забарвлюють за Грамом і мікроскопують, виявляючи типові грампозитивні стафілококи. Не менше двох типових чи підозрілих щодо стафілококів колоній пересівають на скошений агар. У першу чергу відсівають колонії з гемолізом і ті, що дали позитивну лецитовітелазну реакцію. При відсутності таких колоній досліджують не менше двох пігментованих колоній, при мікроскопії яких виявили типові стафілококи. Пробірки з посівами вміщують у термостат при 37 °С на 18-20 год.

В наступні дні проводять ідентифікацію виділених чистих культур, для чого перевіряють їх морфологічні й тинкторіальні властивості (забарвлення за Грамом), плазмокоагулюючу активність та інші властиві для стафілококів тести.

Плазмокоагулазу виявляють шляхом внесення виділеної культури у пробірку з цитратною плазмою кролика. Її можна приготувати в будь-якій лабораторії. У кролика із серця беруть 8 мл крові, вносять у пробірку з 2 мл стерильного 5 % лимонно-кислого натрію і ставлять у холодильник. Після повного осідання формених елементів плазму відсмоктують у стерильну пробірку. Вона може зберігатись у холодильнику 8-10 днів. Перед використанням її розводять 1:5 (1 мл плазми і 4 мл ізотонічного розчину хлориду натрію) і розливають в аглютинаційні стерильні пробірки по 0,5 мл. Повну петлю культури стафілококів емульгують у плазмі і вміщують у термостат на 3 год, потім залишають при кімнатній температурі на 18-20 год. Попередній облік згортання плазми проводять через 3 год, остаточний – на другий день. Дуже зручно користуватись стандартною сухою цитратною плаз-

мою кроля. Перед вживанням в ампулу додають 1 мл ізотонічного розчину хлориду натрію й після повного розчинення її розводять 1:5. Плазма людини малопридатна для постановки реакції плазмокоагуляції, оскільки в ній можуть бути консерванти, лікарські речовини, антитіла, які можуть пригнічувати утворення плазмокоагулази.

Якщо виділена культура викликає гемоліз, коагулює плазму і дає позитивну лецитовітелазну реакцію, вже на третій день можна видати результат на наявність *S.aureus*. Якщо ж культура має лише плазмокоагулазу або тільки вітелазну активність, для остаточного встановлення виду стафілокока потрібно визначити додаткові критерії патогенності: ферментацію маніту в анаеробних умовах, ДНК-азну активність, продукцію лізоциму, фосфатази, а також визначити чутливість до новобіоцину.

Ферментацію маніту в анаеробних умовах можна визначати, використовуючи стандартне сухе середовище з манітом й індикатором ВР. Після його виготовлення й регенерації в пробірці додають по 1 мл стерильного вазелінового масла і засівають культуру уколом у стовпчик. Посіви інкубують у термостаті протягом 5 діб. При розкладі маніту середовище синіє. Ця проба позитивна у 94-96 % штамів *S.aureus*.

Визначення ДНК-аз. До сухого живильного агару додають наважку ДНК із розрахунку 2 мг на 1 мл середовища, яке потім стерилізують текучою парою 30 хв. Його можна зберігати в холодильнику протягом 2-х місяців. Перед використанням агар розплавляють, додають хлористий кальцій (0,8 мг на 1 мл). На підсушене середовище в одній чашці можна засіяти смужками до 16-20 культур. Після інкубації посівів протягом 18-20 год їх заливають 5 мл 1N HCl. Через 7-10 хв кислоту зливають і проводять облік. Соляна кислота, реагуючи з ДНК, утворює непрозорий білий преципітат. Якщо культура продукує ДНК-азу, остання деполімеризує ДНК і при додаванні соляної кислоти навколо смужок культур виникає прозора зона, що свідчить про наявність фермента ДНК-аз.

Гіалуронідазну активність визначають, додаючи до 0,5 мл бульйонної культури стафілокока 0,5 мл препарату гіалуронової кислоти з пупочних канатиків. Суміш інкубують 30 хв при 37 °С і 10 хв при 4 °С. У пробірку додають 4 краплі 15 % оцтової кислоти, струшують і через 5 хв роблять облік результатів. Відсутність згустка свідчить про наявність гіалуронідази, наявність згустка – про її відсутність. Для виготовлення гіалуронової кислоти свіжу пуповину новонароджених подрібнюють, заливають подвійною кількістю дистильованої води. Суміш витримують 24 год у холодильнику, потім нагрівають і кип'ять до згорання шматочків пуповини. Отриманий гіалуронат фільтрують через ватно-марлевий фільтр і перевіряють на утворення згустка.

Лізоцимну активність стафілококів визначають за допомогою посіву виділених культур у вигляді бляшок на щільний живильний агар, до якого додають густу завесь культури *Micrococcus luteus*. При виділенні лізоциму навколо бляшок виникають зони лізису (просвітління агару).

Визначення фосфатази проводять засівом культур на живильний агар, до якого заздалегідь додають паранітрофенілфосфат (0,5 мг на 1 мл середовища).

Інкубація протягом 18-20 год при 37 °С. Поява навколо посівів інтенсивного жовтого забарвлення свідчить про виділення фосфатази.

Стійкість до новобіоцину визначають посівом культури на м'ясо-пептонний агар з новобіоцином (1,6 мкг/мл). Золотисті й епідермальні стафілококи чутливі до цього антибіотика, а *S.saprophyticus* – стійкий.

Реакція Фогес-Проскауера. Виділену чисту культуру сіють у глюкозо-фосфатний бульйон Кларка. Через три дні інкубації при 37 °С до 1 мл культури додають 0,6 мл альфа-нафтолу та 0,2 мл КОН і струшують. При позитивній реакції через 3-5 хв з'являється рожеве забарвлення.

Біологічне дослідження. Патогенні стафілококи, що викликають харчові токсикоінфекції, виділяють та ідентифікують так само, як і стафілококи взагалі. Вони відрізняються здатністю продукувати ентеротоксини А, В, С1, С2, С3, D, Е, F, які характеризуються термостабільністю та антигенною специфічністю. Найчастіше зустрічаються типи А і D. Вказані токсини отримують шляхом посіву культури в спеціальне напіврідке середовище, інкубують 3-4 доби при 37 °С в ексікаторах з 20 % CO₂. Середовище з токсином пропускають через мембранні фільтри № 3 і 4. Отриманий фільтрат прогрівають при 100°С 30 хв і вводять кошенятм-сисунам внутрішньоочеревинно або через зонд у шлунок. Через 30-60 хв у тварин виникає блювання, пізніше пронос і загальна прострація. Щоб виявити ентеротоксини у харчових продуктах, що спричинили токсикоінфекцію, ними годують кошенят. Останнім часом ідентифікацію і типування ентеротоксинів проводять за допомогою реакції імунопреципітації в агаровому гелі. Це найпростіший і найчутливіший метод виявлення ентеротоксинів.

Серологічне дослідження при стафілококових інфекціях проводиться лише тоді, коли збудника виділити не вдається, наприклад, при хронічних процесах (остеомиєліт, септикопемія) особливо якщо вони довго лікуються антибіотиками. Серед сучасних серологічних реакцій найчастіше використовують РНГА та ІФА, зокрема для визначення антитіл до рибіттейхоевої кислоти або інших видоспецифічних антигенів. Але ідентифікація антитіл до тейхоевої кислоти вирішального значення не має, а результати часто суперечливі. До того ж, реактиви для їх визначення поки що малодоступні.

Дослідження на бактеріоносійство серед медичного персоналу проводиться двічі на рік. При планових бактеріологічних обстеженнях обов'язково досліджують слиз із носа. Дослідження слизу із ротоглотки проводять вибірково, при наявності запальних процесів у зіві. Матеріал беруть із передніх відділів носа стерильним ватним тампоном і ним же сіють на ЖСА не пізніше, як через 2 год після взяття. Виділення та ідентифікацію *S.aureus* проводять так само, як і при дослідженні інших матеріалів.

При визначенні масивності обсіменіння стафілококами слизової носа тампон із досліджуваним слизом вносять у пробірку з 0,5 мл стерильного ізотонічного розчину хлориду натрію, прополіскують його в рідині струшуванням протягом 10 хв, відтискують об стінки й видаляють. Рідину багаторазово перемішують піпеткою. Окремо піпеткою наносять 0,1 мл змиву на чашку із ЖСА і ретельно розтира-

ють шпателем. Чашки з посівами інкубують при 37 °С протягом 48 год, після чого підраховують кількість колоній. Якщо з 50 колоній *S. aureus*, що виросли, дві віднесені до одного й того ж фаготипу, правомірно вважати, що й всі інші колонії, ідентичні за морфологією та пігментом, належать до *S. aureus* аналогічного фаготипу.

Приклад для розрахунку: після посіву 0,1 мл змиву виросло 50 колоній *S. aureus*. Отже, у 0,5 мл буде $50 \cdot 5 = 250$ колоній або $2,5 \cdot 10^2$.

Масивність стафілококового обсіменіння, яке виражається числом 10^2 мікробних клітин, є помірною, при ній збудник в оточуюче середовище не виділяється. При виділенні $>10^3$ бактерійних клітин рівень обсіменіння визначають як високий, при якому збудник виділяється у зовнішнє середовище не лише при кашлі та чханні, а й при спокійному диханні. За таких обставин треба обов'язково проводити санацію бактеріоносіїв.

Визначення фаговарів золотистих стафілококів має важливе значення для встановлення джерела інфекції. Методика фаготипування наводиться в інструкції для використання стафілококових бактеріофагів. Штами *S. aureus*, виділені із слизових оболонок дихальних шляхів медперсоналу хірургічних стаціонарів і пологових будинків, треба фаготипувати в обов'язковому порядку, виділені від хворих – лише за епідпоказаннями. Для визначення фаговарів використовують міжнародний набір із 23 помірних фагів, які розділені на 4 групи:

1 група – фаги 29, 52, 52А, 79, 80;

2 група – фаги 3А, 3С, 55, 71;

3 група – фаги 6, 42Е, 47, 53, 54, 75, 77, 84, 85;

4 група – фаги 94, 95, 96;

поза групою – фаги 81, 187.

За допомогою вказаних фагів вдається типувати 60-80 % виділених культур. Встановлені особливі епідемічні штами *S. aureus*, які найчастіше циркулюють у стаціонарі при внутрішньолікарняних інфекціях (напр. фаготипи 77 і 80). Отримані також набори специфічних бактеріофагів для типування *S. epidermidis*.

У чистих культур стафілококів, виділених від хворих, обов'язково визначають антибіотикограми з метою застосування адекватних препаратів для лікування або інтра- і передопераційної антибіотикопрофілактики. У стафілококових носіїв визначення чутливості культур до антибіотиків проводять лише за показаннями, наприклад, при необхідності вибирати препарат для санації. При цьому використовують дискодифузійний метод або спосіб серійних розведень.

Останнім часом у бактеріологічних лабораторіях широко стали використовувати СІБ та ПБДС для швидкої та більш економічної уніфікованої ідентифікації бактерій.

Стрептококові інфекції

Родина *Streptococcaceae* об'єднує в своєму складі сім родів: *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Aerococcus*, *Pediococcus*, *Peptostreptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*. Серед них в інфекційній патології людини найбільше значення мають стрептоко-

ки та ентерококи. Загально визнаною є класифікація стрептококів за Ленсфілдом. На основі специфічних полісахаридів і поверхневих білкових антигенів виділяють 20 серологічних груп, які позначаються великими літерами латинського алфавіту від А до V. Патогенні види належать до серогруп А, В, С і D, значно рідше – до груп F і J. Їх визначають за допомогою реакції преципітації з відповідними антисироватками. Однак, із-за відсутності преципітуючих сироваток бактеріологічні лабораторії не мають змоги проводити серологічну ідентифікацію стрептококів. Тому в сучасних умовах використовують інші критерії їх диференціації (табл. 33).

Таблиця 33

Диференціація найважливіших стрептококів і ентерококів

Види	Група	Ріст у присутності		β-гемоліз	α-гемоліз	Гідроліз ексуліну	Ферментація					
		6,5 % NaCl	40 % жовчі				лак-тоза	маніт	саліцин	сорбіт	трегалоза	
Гноерідні стрептококи												
1. <i>S.pyogenes</i>	A	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	
2. <i>S.agalactiae</i>	B	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	
3. <i>S.equi</i>	C	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	
Ротові стрептококи												
4. <i>S.pneumoniae</i>	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	
5. <i>S.salivarius</i>	K	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	
6. <i>S.mutans</i>	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	
Анаеробні стрептококи												
7. <i>S.morbillosum</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
8. <i>S.parvulus</i>	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	
9. <i>S.pleomorphus</i>	-	?	?	-	-	?	-	-	-	-	-	
Ентерококи												
10. <i>S.faecalis</i>	D	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	
11. <i>S.faecium</i>	D	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	
12. <i>S.durans</i>	D	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	

Основою лабораторної діагностики захворювань, спричинених стрептококами, є бактеріологічні та серологічні методи.

Взяття матеріалу для дослідження. При сепсисі, остеомієліті та інших видах генералізованої стрептококової інфекції беруть кров. При інших захворюваннях забирають гній, виділення слизових оболонок, харкотиння, ліквор, жовч, сечу, випорожнення тощо, залежно від локалізації патологічного процесу. Правила взяття й доставки матеріалу до лабораторії такі ж самі, що й при стафілококових інфекціях.

Первинна мікроскопія мазків із гною, ранового вмісту, секрету слизової тощо (окрім крові) проводиться після забарвлення їх за Грамом. Стрептококи мають фіолетовий колір, виглядають короткими ланцюжками, диплококами чи поодинокі (рис. 61; див. вкл., рис. 10).

Часто за характером розташування клітин у мазку важко або й взагалі неможливо визначити належність бактерій до стрептококів. Тому необхідно виділяти чисту культуру і встановлювати вид збудника.

Бактеріологічне дослідження. Для встановлення діагнозу при гострих стрептококових інфекціях (за винятком скарлатини з типовою клінічною картиною) потрібно проводити бактеріологічне дослідження. При підозрі на сепсис сіють біля ліжка хворого 10-15 мл крові у флакон, що містить 100-150 мл цукрового бульйону (співвідношення крові і середовища 1:10). Кращі й надійніші результати дають посіви крові в середовище Кітта-Тароцці з напіврідким агаром. У ньому будуть рости й анаеробні стрептококи. Посіви крові інкубують у термостаті при 37 °С. При рості стрептококів на дні середовища з'являється осад. У середовищі Кітта-Тароцці може утворюватися й газ. У мазках із осаду виявляють грампозитивні стрептококи у вигляді довгих ланцюжків. Пневмококи розташовуються короткими ланцюжками або парно у вигляді ланцетоподібних клітин, повернутих одна до одної потовщеними кінцями. Для ентерококів властиве парне розташування, рідше тетрадами або купками, але не гронами. Окремі клітини ентерококів поліморфні (великі й малі).

При відсутності росту посіви витримують у термостаті протягом 3-4 тижнів, періодично проводячи бактеріоскопію.

Культуру, що виросла, після бактеріоскопії пересівають у чашку з кров'яним агаром для визначення типу гемолізу. Через 18-20 год вирастають типові колонії, оточені світлою зоною (бета-гемоліз) або зоною позеленіння (альфа-гемоліз). Хоч здатність до гемолізу не має абсолютного діагностичного значення, все ж при дослідженні стрептококів, виділених від людини, можна відкидати негемолітичні колонії гамма-стрептококів. За дуже рідким винятком вони не пов'язані з інфекційними захворюваннями.

Щоб краще й точніше ідентифікувати виділені гемокультури стрептококів колонії з кров'яного агару рекомендують відсівати на простий МПА, молоко з метиленовим синім, жовчний бульйон (або жовчно-кров'яний агар). Гемолітичні стрептококи серогрупи А не ростуть на простих і жовчних середовищах, не знебарвлюють метиленовий синій у молоці. Ентерококи добре ростуть на агарі з жовчю. Далі різні види стрептококів можна диференціювати за біохімічними властивостями (табл. 33). Але біохімічні ознаки стрептококів не є постійними, що до деякої міри знецінює використання цих тестів.

Гній, рановий вміст, слиз із зів та носа, зібрані ватними тампонами, а також харкотиння, ліквор, сечу тощо сіють на кров'яний агар. Матеріал наносять на середовище в невеликій кількості, а потім петлею чи шпателем розсівають його легкими штрихами по всій поверхні. Не рекомендують втирати досліджуваній матеріал в агар.

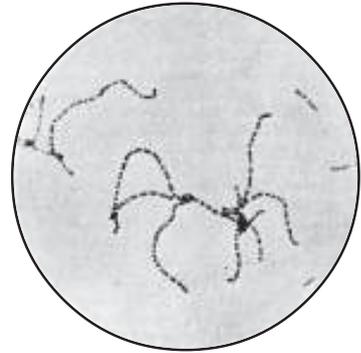


Рис. 61. Стрептококи
(мазок із бульйонної культури).

Для підвищення частоти висівання стрептококів тампони після посіву на кров'яний агар ще біля ліжка хворого занурюють у пробірку з середовищем Кітгата-Тароцці, до якого додають напіврідкий агар та 2-3 краплі дефібринованої крові кролика. Посів інкубують 3-4 год при 37 °С, а потім висівають на чашки з кров'яним агаром, виділяють та ідентифікують за звичайною схемою.

Для швидкої ідентифікації бета-гемолітичних стрептококів серогрупи А використовують експрес-метод за допомогою реакції імунофлуоресценції. Для цього мазок із виділеної культури фіксують у 95 % спирті протягом 15 хв, забарвлюють відповідними люмінесцуючими сироватками і розглядають під люмінесцентним мікроскопом. Практично всі гемолітичні стрептококи групи А чутливі до бацитрацину і дають позитивний ППР-тест, тобто гідролізують пірролідоніл-бета-нафтіламід. Ще швидше стрептококи цієї групи визначають у мазках із рото- та носоглотки, обробляючи їх сучасними комерційними тест-наборами. Групові А-антигени стрептококів екстрагують за допомогою ферментів або інших хімічних реагентів і визначають їх в реакціях латекс-аглютинації, коаглютинації або імуноферментним аналізом.

Стрептококи групи В, як правило, нечутливі до дії бацитрацину, розкладають гіппурат і дають позитивний САМР-тест (посилення гемолізу під впливом дисків, що містять стафілококовий бета-гемолізін).

Подальшу ідентифікацію проводять серотипуванням у реакціях латекс-аглютинації або коаглютинації з комерційними реагентами або міченими моноклональними антитілами. Стрептококи в мазках із вагіни можна швидко ідентифікувати за допомогою таких самих тест-систем, як і для стрептококів групи А.

Для визначення вірулентності виділених культур стрептококів використовують біопробу на білих мишах або встановлюють концентрацію поверхневого М-протеїну, властивого лише для патогенних штамів. Для цього отримують солянокислі екстракти з молодих культур стрептококів і визначають у них вміст М-антигену.

При визначенні альфа- і бета-гемолітичних стрептококів у повітрі операційних, пологових залів, кімнат для новонароджених, маніпуляційних та інших лікарняних приміщень роблять посіви повітря седиментаційним методом або за допомогою апарата Кротова на середовище Гарро (до розтопленого МПА додають 5 % дефібринованої крові та 0,2 % водного 0,1 % розчину ганціанвіолету). Ентерококи та сапрофітна мікрофлора на цьому середовищі не ростуть.

Серологічне дослідження. При хронічних стрептококових інфекціях виділити збудника, як правило, не вдається, особливо при тривалому лікуванні хворих антибіотиками та іншими протимікробними препаратами. В такому разі проводять серологічні дослідження: визначення стрептококового антигена в сироватці крові та сечі, титрування антитіл до О-стрептолізину, гіалуронідази і ДНК-ази.

Антиген стрептококів визначають в РЗК. Необхідні для цього антистрептококові сироватки отримують шляхом гіперімунізації кроликів вбитою культурою бета-гемолітичних стрептококів серогрупи А. Титром антигену вважають те найбільше розведення сироватки, яке затримує гемоліз. Кращі результати отримують

при постановці РЗК на холоді. Останнім часом для виявлення стрептококових антигенів у сироватці крові досить успішно використовують метод ІФА.

При визначенні стрептококових антигенів у сечі хворих використовують реакцію преципітації. Осад ранкової порції сечі після центрифугування обробляють протистрептококовою преципітуючою сироваткою. Результат враховують через годину при кімнатній температурі. Стрептококові антигени в сироватці крові та сечі часто виявляють при скарлатині, ангінах, ревматизмі.

Визначення антитіл проти О-стрептолізину (антистрептолізину-О) проводять внесенням робочої дози стандартного препарату О-стрептолізину в ряд пробірок із кратними розведеннями сироваток (1:25, 1:50, 1:100 і т.д.). Суміш інкубують у термостаті протягом 15 хв, потім у всі пробірки вносять по 0,2 мл 5 % зависі еритроцитів кроля і знову вміщують у термостат на 60 хв. При наявності антистрептолізину в крові хворих гемолізу не настає. Пробірка з найбільшим розведенням сироватки, в якій є виражена затримка гемолізу, містить 0,5 АО (антитоксичних одиниць) антистрептолізину-О.

Для визначення антитіл проти гіалуронідази (антигіалуронідази) до сироватки хворих у різних розведеннях вносять стандартну дозу гіалуронідази й робочу дозу гіалуронової кислоти, яку готують із пупкових канатиків новонароджених. При наявності антигіалуронідази в пробірках утворюється згусток після додавання оцтової кислоти. Пробірка з найменшою кількістю сироватки, в якій є згусток, містить 1 АО (антитоксичну одиницю) антигіалуронідази. При ревматизмі та стрептококовому гломерулонефриті в сироватці хворих виявляють >500 АО антистрептолізину і >800-1000 АО антистрептогіалуронідази вже з перших днів хвороби. Саме при цих захворюваннях найчастіше проводять обидві серологічні реакції. В багатьох країнах використовують комерційні тест-системи для визначення антитіл до стрептолізину, гіалуронідази, стрептокінази, ДНК-ази та інших екзоферментів стрептококів.

Пневмококові інфекції. Серед хвороботворних стрептококів *S.pneumoniae* (пневмокок) займає особливе місце. Він відіграє дуже важливу роль в інфекційній патології людини. Цей вид є одним із основних збудників крупозного запалення легень. За далеко неповними даними щороку в світі нараховують понад 500 тис. випадків пневмоній, викликаних пневмококами, особливо часто у дітей та людей похилого віку. Окрім запалення легень цей мікроб викликає менінгіт, ендокардит, перитоніт, отит, риніт, гайморит, сепсис, повзучу виразку рогівки та ряд інших захворювань.

Для проведення лабораторної діагностики використовують бактеріоскопічний, бактеріологічний та біологічний методи. Матеріалом для дослідження є харкотиння, гній, кров, спинномозкова рідина, слиз із рото- та носоглотки, виділення з гайморової пазухи, ока та вуха. Важливо негайно відправляти матеріал до лабораторії й досліджувати дуже швидко, оскільки пневмококи схильні до автолізу.

Бактеріоскопічне дослідження матеріалу (окрім крові) зводиться до виготовлення двох мазків. Один із них забарвлюють за Грамом, другий – за Буррі-Гінсом, що дає змогу виявити капсулу. Пневмококи розташовуються у вигляді лан-

цетоподібних диплококів, оточених спільною капсулою. Якщо в полі зору виявляють 10 і більше типових диплококів, можна з великою вірогідністю зробити висновок про наявність *S.pneumoniae*. Однак, первинна мікроскопія не дає права поставити остаточний діагноз, оскільки у мазках можуть бути капсульні непатогенні диплококи – представники нормальної мікрофлори. Тому потрібно проводити посів клінічного матеріалу й виділяти чисту культуру.

Бактеріологічне дослідження. При сепсисі біля ліжка хворого сіють 10 мл крові у флакон, що містить 100 мл сироваткового або цукрового бульйону, інкубують 18-20 год при 37 °С, потім висівають на кров'яний агар, виділяють та ідентифікують чисту культуру. При менінгіті ліквор центрифугують і з осаду роблять посів на кров'яний агар. На ньому пневмококи ростуть у вигляді маленьких круглих колоній, оточених зеленою зоною, в центрі колонії видно характерне вдавнення. Посів харкотиння або гною на живильні середовища робити недоцільно, оскільки присуття сапрофітна мікрофлора пригнічує ріст *S.pneumoniae*. Краще досліджуваний матеріал ввести в черевну порожнину білих мишей. Постановка біопробі – швидкий, надійний і точний метод виділення чистої культури пневмококів. Білі миші дуже чутливі до цих бактерій і вже через 10-12 год після зараження пневмококи проникають у кров і паренхіматозні органи, викликаючи сепсис. Посів крові з серця або шматочків внутрішніх органів під час розтину тварин дає змогу виділити чисту культуру збудника.

Для ідентифікації пневмококів використовують такі їх властивості. На відміну від інших видів стрептококів, *S.pneumoniae* не росте на середовищі з оптохіном, ферментує інулін і дуже чутливий до дії жовчі (дезоксіхолатна проба). Швидкий лізис пневмококів під дією жовчі можна виявити, якщо до 1 мл бульйонної культури додати 0,5 мл жовчі. Через 15-20 хв перебування в термостаті настає повний лізис бактерійних клітин.

Для визначення сероварів пневмококів (нині їх нараховують 85) використовують реакцію аглютинації на склі з типовими сироватками або феномен “набрякання капсул”. В присутності гомологічної сироватки капсула пневмококів сильно набрякає. Ще краще проводити серотипування за допомогою комерційних реагентів у реакціях латекс-аглютинації або коаглютинації, завдяки яким виявляють капсульні антигени.

Серед стрептококів важливий ще рід *Enterococcus*, найбільш значущими видами якого є *E.faecalis*, *E.faecium* і *E.durans*. Вони досить широко розповсюджені в природі. Основною їх екологічною нішею є кишечник людей і тварин, але їх виявляють і в складі нормальної мікрофлори шкіри промежини, сечостатевої системи, рото- і носоглотки. Вони можуть викликати нагноєння ран, бактеріємії, ураження уrogenітальної системи, особливо у хворих із довго функціонуючими катетерами, харчові токсикоінфекції, дисбактеріози кишечного тракту, рідше ендокардити.

У мазках із досліджуваного матеріалу ентерококи розташовуються парами, короткими ланцюжками або у вигляді скупчень, грампозитивні.

Бактеріологічна діагностика ентерококових інфекцій проводиться без будь-яких труднощів, оскільки ці бактерії добре ростуть на простих середовищах. Се-

лективним для них є агар ДИФ-3 (до 600 мл 3 % МПА додають 400 мл 40 % жовчі). Через 24 год інкубації колонії, що виростили, мають розміри 0,4-1,0 мм сіруватого кольору. На кров'яному агарі навколо колоній виникає неповний або повний гемоліз. На відміну від зелених стрептококів ентерококи можуть рости на МПА з 6,5 % NaCl, редукують молоко з метиленовим синім при 37 °С через 4-6 год. Ідентифікацію виділених культур проводять за морфологічними, культуральними та біохімічними ознаками.

Менінгококові інфекції

Збудник менінгококових інфекцій *Neisseria meningitidis* належить до родини *Neisseriaceae*, роду *Neisseria*. Основним біотопом менінгококів є слизова оболонка носоглотки людини. Окрім *N.meningitidis*, в цій ділянці часто знаходяться непатогенні нейсерії, що входять до складу резидентної мікрофлори здорових людей. За полісахаридними антигенами менінгококи поділяють на серогрупи А, В, С, D, 29Е, X, Y, Z, W-135 та недавно ідентифіковані Н, I, K, L.

Лабораторна діагностика менінгококових інфекцій базується на бактеріоскопії досліджуваного матеріалу, виділенні чистої культури збудника, його біохімічної та серологічної ідентифікації. Залежно від клінічної форми захворювання, матеріалом для дослідження служить спинномозкова рідина (при менінгіті), слиз із носоглотки (при назофарингіті та бактеріоносійстві), кров і вміст петехій (при менінгіті). Забір матеріалу необхідно проводити до початку етіотропної терапії, сіяти його біля ліжка хворого або негайно направляти до лабораторії, не допускаючи переохолодження, оскільки менінгококи дуже чутливі до температурних коливань.

Бактеріоскопічне дослідження. Якщо спинномозкова рідина гнійна (каламутна), мазки з неї виготовляють без будь-якої обробки, коли ж вона прозора – мазки готують з осаду після центрифугування. Препарати фарбують метиленовою синькою, за Романовським-Гімзою та Грамом. Останній метод дає найменш чіткі результати, оскільки клітини ліквору дуже змінюються, появляються чисельні артефакти, що імітують присутність менінгококів. У типових випадках бактерії в мазках виглядають як грамнегативні диплококи (рис. 62), що мають вигляд кавових зерен, які розташовуються парами, тетрадами, або хаотично, часто всередині лейкоцитів (незавершений фагоцитоз). У такому разі, при типовій клінічній картині, первинна мікроскопія ліквору набуває важливого значення для встановлення менінгококової етіології захворювання.

Мікроскопічне дослідження крові при менінгококемії зводиться до виготовлення й забарвлення товстої краплі. Виявлення численних темно-синіх диплококів, розташованих парами або у вигляді скупчень, дає змогу швидко поставити діагноз. Од-

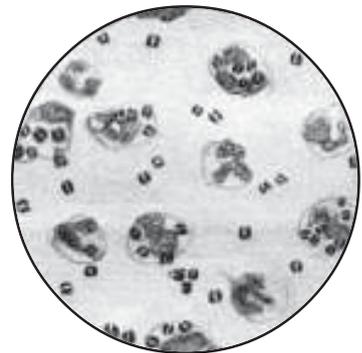


Рис. 62. Менінгококи в мазку з спинномозкової рідини.

нак, позитивні результати бактеріоскопії мазків крові бувають не завжди, навіть при типовій формі генералізованої менінгококової інфекції.

Майже постійно й дуже швидко *N. meningitidis* можна виявити мікроскопічно в мазках із метастатичних вогнищ інфекції, якими є елементи висипу (екзантеми, петехії, роzeоли, папули). Аспіровані за допомогою голки зі шприцом маленькі крапельки крові з петехій розмазують на предметному склі й фарбують за Романовським-Гімзою. Мазки із вмісту петехій можна також виготовити у вигляді відбитків. Для цього стерильною петлею обережно скарифікують поверхню петехії, потім до неї прикладають стерильне предметне скло, фіксують у полум'ї пальника й забарвлюють. На основі даних мікроскопії можна видати попередню відповідь. Таким способом менінгококи можна виявити навіть тоді, коли гемокультура не виділяється.

При мікроскопії виділень із носоглотки, взятих тампоном із глибоких відділів слизової позаду м'якого піднебіння, виявлення грамнегативних диплококів має обмежене значення, оскільки там можуть бути подібні за морфологією непатогенні види нейсерій.

Інші експрес-методи діагностики зводяться до постановки серологічних реакцій для визначення менінгококових антигенів у крові, спинномозковій та синовіальній рідині. З цією метою використовують реакції коагулінації, латекс-аглютінації, зустрічного імуоелектрофорезу, ІФА, вживаючи специфічні групові антименінгококові сироватки.

Бактеріологічне дослідження. У хворого на епідемічний гнійний менінгіт зразу ж при госпіталізації беруть 2-5 мл спинномозкової рідини. Стерильною пастерівською піпеткою з дна пробірки (краще після центрифугування) набирають 0,3-0,5 мл й по 2-3 краплі засівають на поверхню підігрітих середовищ у двох чашках Петрі, розтираючи матеріал шпателем. В одній чашці міститься сироватковий агар (до розтопленого й охолодженого до 45 °С МПА додають 20 % кінської або бичачої сироватки), у другій – “шоколадний” агар (до розтопленого й охолодженого МПА додають 10 % дефібринованої крові, тричі підігрівають, не доводячи до кипіння). Посіви на асцитичні середовища дають гірші результати. Залишки ліквору використовують для посіву на середовище збагачення (напіврідкий сироватковий агар) і одночасно для проведення вище вказаних експрес-методів діагностики. Залишок матеріалу в пастерівській піпетці використовують для виготовлення мазка.

Посіви вміщують в ексикатор, де створюють підвищену концентрацію вуглекислоти, поставивши в нього запалену свічку й герметично заклавши кришкою. Коли свічка погасне, в ексикаторі буде атмосфера з 7-10 % CO₂. Після цього посудину із засіяними середовищами ставлять у термостат при 37 °С.

Через 24 год інкубації досліджують культуральні властивості. Колонії менінгококів на сироватковому агарі ніжні, гладенькі, безбарвні, в'язкої консистенції, розміром 2-3 мм. Менінгококові колонії на “шоколадному” агарі мають сіруватий колір, блискучу поверхню, рівний край, маслянисту консистенцію, розміри 1-3 мм. Колір середовища навколо колоній не змінюється. Якщо в мазках із таких колоній виявляють грамнегативні коки, які дають позитивні проби на оксидазу та катала-

зу, це дає право віднести культури до роду нейсерій і провести диференціацію видів. З цією метою відсівають колонію на скошений сироватковий агар для виділення чистої культури. В разі відсутності росту на обох чашках, досліджують ріст у середовищі збагачення.

На третій день дослідження визначають серогрупу виділеної культури в реакції аглютинації на склі з менінгококовими сироватками. Люфільно висушені сироватки розчиняють, вносячи в ампулу 1 мл стерильного 0,85 % розчину хлориду натрію. На предметні скельця наносять окремими піпетками краплі діагностичних сироваток різних серогруп (А, В, С, D і т.д.) і краплю фізіологічного розчину (для контролю культури на спонтанну аглютинацію). Бактеріологічною петлею виділену культуру емульгують у краплі кожної сироватки та краплі фізіологічного розчину. Через 2-3 хв враховують результат реакції. Висновок про належність культури до певної серогрупи роблять на основі реакції аглютинації з відповідною сироваткою. При появі спонтанної аглютинації в краплі фізіологічного розчину реакцію не враховують.

Визначають дискодифузійним методом чутливість виділеної культури до антибіотиків і сульфаніламідних препаратів та проводять інші тести для диференціації менінгококів від інших патогенних і непатогенних нейсерій (табл. 34).

Таблиця 34

Диференціальні ознаки нейсерій і брангамел

Вид	Ріст на		Залежність росту від CO ₂ в перших генераціях	Пігмент	Оксидаза	Розклад вуглеводів					Редукція	
	простому агарі	сироватко- вому агарі				Глюкози	Мальтози	Сахарози	Фруктози	Лактози	NO ₂	NO ₃
<i>N.meningitidis</i>	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>N.gonorrhoeae</i>	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+
<i>N.flava</i>	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+
<i>N.flavescens</i>	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>N.subflava</i>	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
<i>N.perflava</i>	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
<i>N.lactamica</i>	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+
<i>N.mucosa</i>	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+
<i>N.sicca</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
<i>B.catarrhalis</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+

При генералізованій менінгококовій інфекції (менінгококемії) для виділення збудника із кров'яного руслу за допомогою стерильної венепункції беруть 10 мл крові й засівають її у флакон із 100 мл напіврідкого середовища. Через 24 год роблять висів із флакону на чашку з сироватковим (або "шоколадним") агаром. Отримавши ізольовані колонії, виділяють та ідентифікують чисту культуру так само, як із спинномозкової рідини.

Щоб посіяти екссудат із петехій шкіру навколо них обтирають 70 % спиртом. При некрозі петехій екссудат для посіву можна взяти стерильною бактеріологіч-

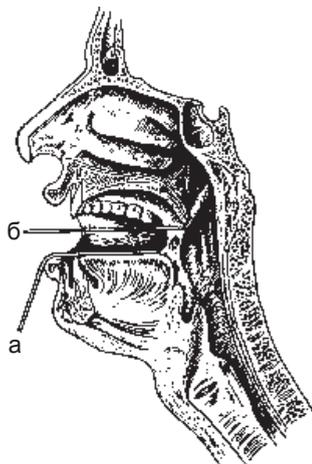


Рис. 63. Забір матеріалу з носоглотки спеціальним тампоном:

а – шпатель; б – тампон.

ною петлею з некротизованої ділянки. При неушкодженій шкірі ексудат беруть тонкою голкою, з'єднаною з шприцом, в якому міститься 0,2 мл 0,85 % розчину хлориду натрію. Фізіологічний розчин вводять у товщу петехії й відсмоктують назад. Взятий ексудат сіють на сироватковий агар із ристоміцином або лінкоміцином, які пригнічують мікрофлору шкіри. Виділення та ідентифікацію культур проводять за описаною вище схемою.

При діагностиці назофарингіту або менінгококкового носійства слиз із носоглотки беруть натще або через 3-4 год після вживання їжі спеціальним стерильним ватним тампоном, закріпленим на зігнутому під кутом 45° дроті. Кінець тампона направляють догори і вводять за м'яке піднебіння, при цьому корінь язика прикладають шпателем (рис. 63).

При вийманні тампона взятий матеріал не повинен торкатися зубів, язика і слизової щік. Матеріал негайно засівають на сироватковий агар із ристоміцином або лінкоміцином, які пригнічують ріст грампозитивних коків, або тампон занурюють у пробірку з середовищем збагачення. При посіві матеріалу на чашки його спочатку втирають на невеликій ділянці середовища (1×2 см), перевертаючи тампон всіма сторонами, потім тим же тампоном сіють штрихами з відривом на всій площі агару.

Тепер створені тест-системи на основі полімеразної ланцюгової реакції для більш надійного виявлення *Neisseria meningitidis*.

Серологічне дослідження. Для виявлення антитіл в сироватці крові хворих та перехворілих використовують РНГА з спеціальним діагностикумом, який виготовляють шляхом адсорбції групоспецифічних полісахаридних менінгококових антигенів на еритроцитах. З цією ж метою проводять імуноферментний аналіз.

Необхідно пам'ятати, що цереброспінальний менінгіт можуть викликати й інші види бактерій: *M.tuberculosis*, *H.influenzae*, *S.pneumoniae* (особливо у людей похилого віку), значно рідше стафілококи, клебсієли, сальмонели, протей, пастерели, бактероїди, бруцели, лептоспіри, мікроплазми тощо. Методи виділення та ідентифікації вказаних видів розглядаються у відповідних розділах спеціальної мікробіології.

Гонококові інфекції

Збудник гонореї і бленореї *N.gonorrhoeae* (за попередньою класифікацією гонокок) належить до родини *Neisseriaceae*, роду *Neisseria*. У мазках із виділень хворих гонококи мають форму кавових зерен, грамнегативні, розташовуються парами як всередині лейкоцитів (незавершений фагоцитоз), так і поза клітинами. За своїми морфологічними ознаками вони дуже подібні до менінгококів. Для го-

нококів властивий поліморфізм – зустрічаються дрібніші й більші клітини, рідко паличкоподібної форми.

До живильних середовищ дуже вибагливі. Краще ростуть на середовищах, що містять кров, сироватку, асцитичну рідину. Гонококи містять протеїнові й полісахаридні антигени, за якими поділені на 16 сероварів, але в рутинних баклабораторіях їх поки що не визначають.

Для мікробіологічної діагностики гонококових інфекцій використовують бактеріоскопічний, бактеріологічний, серологічний і алергічний методи.

Взяття матеріалу для дослідження. Щоб надійно і доброякісно провести бактеріологічну й бактеріоскопічну діагностику, важливо правильно взяти клінічний матеріал. Його, як правило, повинен проводити лікар.

У чоловіків досліджують виділення сечовипускного каналу, парауретральних ходів, прямої кишки, при показаннях – матеріал із ротоглотки, а також секрет передміхурової залози після її масажу. Можна також досліджувати осад і “нитки” сечі, але в них гонококи виявляються значно рідше. Перед взяттям матеріалу з уретри хворий не повинен помочитися протягом 4-5 год, не вживати антимікробні препарати і дезінфікуючі розчини. Зовнішній отвір уретри спочатку протирають стерильним ватним тампоном, змоченим 0,85 % розчином хлориду натрію, потім сухим тампоном. Мазки виготовляють не з гною, що вільно витікає, а з матеріалу, взятого шляхом зіскобу з слизової уретри бактеріологічною петлею або спеціальною ложечкою Фолькмана. При незначних виділеннях необхідно зробити попередній масаж уретри.

У жінок матеріал беруть із уретри, парауретральних ходів, шийки матки, прямої кишки, а за показаннями – і з ротоглотки. Спочатку очищають вагіну від виділень, проводять масаж уретри і шляхом зіскобу бактеріологічною петлею або ложечкою Фолькмана забирають матеріал. Шийку матки спочатку протирають сухим стерильним ватним тампоном для видалення слизової пробки. Виділення з каналу шийки матки беруть бактеріологічною петлею або пінцетом. Матеріал із дистального відділу прямої кишки беруть за допомогою ложечки Фолькмана “сліпим методом”, тобто без будь-якої підготовки хворого, або за допомогою ректоскопа чи ректального дзеркала. В цьому випадку досліджуваний матеріал забирають безпосередньо з видимого місця ураження.

При орофарингеальній гонорейі слиз із ротоглотки беруть стерильними ватними тампонами на спеціальних тримачах із сталевого дроту. Для діагностики бленорейі виділення кон'юнктиви знімають бактеріологічною петлею. Рідко гонорея ускладнюється гоносеписом, ендокардитом, артритом. Тоді матеріалом для дослідження служить кров або синовіальна рідина. Приймаючи до уваги високу чутливість гонококів до коливань температури, досліджувані матеріали доставляють до лабораторії у спеціальних термосах або сумках із грілкою.

Бактеріоскопічне дослідження є найпоширенішим, хоч і менш чутливим методом лабораторної діагностики гонорейі та бленорейі в порівнянні з виділенням чистих культур. Це особливо стосується хронічного перебігу хвороби, коли в досліджуваному матеріалі міститься незначна кількість гонококів. Однак при пра-

вильному взятті матеріалу, повторних обстеженнях пацієнтів, застосуванні методів провокації, кваліфікованій оцінці мазків бактеріоскопічне дослідження досить часто дає змогу швидко і вірно діагностувати захворювання.

Із досліджуваного матеріалу виготовляють два тонкі рівномірні препарати-мазки. Один забарвлюють метиленовою синькою, другий – за методом Грама. При відсутності метиленового синього можна забарвлювати один мазок 1 % водним розчином кристалічного фіолетового або 0,5 % розчином брильянтового зеленого протягом 1 хв. Висновок про наявність гонококів роблять, базуючись на таких їх

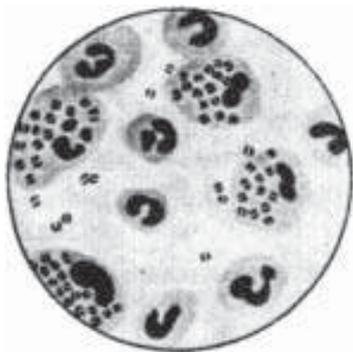


Рис. 64. Гонококи в мазку з гною.

властивостях: грамнегативне забарвлення, диплокова структура, форма кавових зерен, розташування всередині лейкоцитів (рис. 64; див. вкл., рис. 11).

Під впливом антибіотиків та інших хіміопрепаратів а також при хронічній гонорей морфологія й забарвлення гонококів можуть змінюватися. Окремі клітини набувають різну форму і величину (так звані форми Аша). Окрім того в досліджуваному матеріалі можуть знаходитись подібні до гонококів грамнегативні коки з роду *Veillonella*. Це до деякої міри обмежує діагностичну цінність методу первинної мікроскопії.

Кращі й надійніші результати дає метод імунофлуоресценції. Тонкі мазки із виділень хворих фіксують у полум'ї пальника. На них наносять мічену ізотіоціанатом флуоресцеїну антигонококову сироватку на 1 год при 35 °С у вологій камері. Після цього мазки двічі промивають буферним розчином, наносять забуферений гліцерин і покривають покрівними скельцями. При взаємодії гонококів з міченими антитілами під люмінесцентним мікроскопом видно характерне світіння навколо бактерійних клітин.

Бактеріологічне дослідження. Показаннями до виділення чистих культур гонококів є неодноразові негативні результати бактеріоскопії, наявність підозрілих щодо гонококів, але не ідентифікованих морфологічно мікроорганізмів, а також для достовірного встановлення вилікованості захворювання. Дуже важливо негайно помістити посіви в термостат. При неможливості проведення посівів на місці взяття матеріалу можна зробити висів ватним тампоном у пробірку з транспортним середовищем Стюарта, яке забезпечує збереження життєздатності гонококів під час доставки до лабораторії.

Посіви проводять за стандартною схемою в одне із спеціальних живильних середовищ у пробірках або чашках Петрі (КДС, Бейлі, кров'яний або сироватковий агар, сухе живильне середовище Харківського підприємства "Біолік" з виробництва бактеріальних та лікарських препаратів). Для діагностичного культивування гонококів у багатьох країнах використовують ще "шоколадний" агар. Найкращими є середовища, виготовлені на основі агару з кролячого м'яса або свіжих бичачих сердець. Додавання до них 20 ОД/мл поліміксину та 2 мкг/мл лінкоміцину значно підвищує частоту висівання гонококів, оскільки вказані препарати при-

гнічують ріст інших бактерій. Усі середовища перед посівом підігрівають у термостаті протягом 15-20 хв. Чашки й пробірки з посівами вміщують в ексікатори, де створюють атмосферу з 20 % CO₂. Колонії, як правило, виростають через 18-24 год, однак можливий і пізній ріст. Тоді посіви витримують у термостаті (в ексікаторі!) до 8 діб, щоденно перевіряючи появу росту.

Колонії гонококів, що виростили, мають округлу, злегка опуклу форму, рівні краї, блискучу поверхню, слизову консистенцію. Вони прозорі, як крапельки роси, майже безбарвні, хоч можуть траплятись і білуваті варіанти. Отримані колонії досліджують макро- і мікроскопічно. У мазках гонококи розташовуються парно, тетрадами і скупченнями. Типові колонії пересівають на скошений сироватковий агар для виділення чистої культури. Остаточну ідентифікацію проводять, враховуючи морфологічні, культуральні, ферментативні й антигенні властивості. Біохімічно гонококи мало активні. На сироваткових середовищах із 1,5 % різних вуглеводів вони розкладають лише глюкозу, але не мальтозу й сахарозу.

Оксидазну активність виділених культур визначають шляхом нанесення на колонії (після мікроскопії) 1 % розчину диметилпарафенілендіаміну. Оксидазопозитивні колонії спочатку червоніють а пізніше чорніють.

Диференціація гонококів від інших видів роду *Neisseria* має особливе значення при діагностиці орофарингеальної гонореї. Як відомо, на слизовій мигдаликів, рото- та носоглотки постійно знаходиться велика кількість грамнегативних нейсерій – представників нормальної мікрофлори людини. Надійними методами ідентифікації гонококів є реакції імунофлуоресценції, латекс- і коагулінації а також визначення ферментативних властивостей. Обов'язково проводять якісне визначення чутливості або резистентності мікроорганізмів до антибіотиків за допомогою методу дифузії в агар з використанням дисків.

З метою підвищення частоти знаходження гонококів у мазках при первинній мікроскопії та більш надійного виділення чистих культур особливо у випадках в'язлого, хронічного перебігу захворювання вдаються до методів провокації гонореї, тобто штучного загострення патологічного процесу, в результаті чого у виділеннях появляється більша кількість гонококів. Основними з цих методів є такі:

а) хімічний – інстиляція в уретру 0,5 % розчину нітрату срібла у чоловіків, змазування каналу шийки матки 2-5 % розчином нітрату срібла;

б) механічний – введення прямого бужа в уретру на 10 хв, або проведення передньої уретроскопії;

в) біологічний – внутрішньом'язове введення гоновакцини в кількості 500 млн мікробних тіл, або пірогеналу 200 МПД;

г) аліментарний – вживання солоної, гострої їжі;

д) термічний – прогрівання статевих органів індуктотермічним струмом;

е) фізіологічний – взяття мазків під час менструацій.

Ще краще комбінувати кілька методів провокації, наприклад, хімічний, аліментарний та біологічний.

Останнім часом для більш надійного виявлення збудника гонореї вживають полімеразну ланцюгову реакцію. Вона дозволяє виявити збудника у випадках хро-

нічної гонореї, коли бактеріоскопічне і бактеріологічне дослідження не дає позитивних результатів.

Серологічну діагностику гонореї здійснюють порівняно рідко, в основному, при хронічному її перебігу, коли бактеріоскопічне й бактеріологічні дослідження не дають позитивних результатів. В сучасних умовах проводять імуноферментний аналіз, РНГА та реакцію Борде-Жангу (РЗК). Антигенами для цих реакцій служать: вбита нагріванням полівалентна гонококова вакцина, вакцина, інактивована ультразвуком, протеїнові й полісахаридні фракції гонококів, а також піридиновий антиген. ІФА і РНГА є високоспецифічними і достовірними серологічними реакціями. У порівнянні з минулим РЗК дещо втратила свою роль. Вона не має практичного значення при діагностиці гострої гонореї, оскільки її виліковують ще до утворення значної кількості антитіл. Для встановлення достовірності вилікування вона взагалі непридатна. Реакція Борде-Жангу має важливе значення при серодіагностиці хронічної гонореї, особливо при ускладнених її формах (гоносепис, метрит, артрит, простатит тощо).

Діагностичне значення алергічних проб дещо знецінюється тим, що вони позитивні протягом багатьох років після перенесеної гонореї. Для їх постановки внутрішньошкірно вводять 0,1 мл свіжої гонококової вакцини (100 млн мікробних клітин в 1 мл). Через 24 год спостерігають гіперемію, інколи з набряком у центрі.

Ешерихіози

Терміном ешерихіози позначають групу інфекційних захворювань, які викликають бактерії роду *Escherichia* родини *Enterobacteriaceae* (див. вкл., рис. 12). Найчастіше ці захворювання спричиняє *E. coli* (понад 99 %). Дуже рідко їх можуть викликати *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. vulneris*.

Потрібно розрізняти два види ешерихіозів: 1) захворювання, які викликає умовно-патогенна кишкова паличка, звичайний представник фонові мікрофлори кишечника; 2) захворювання, що викликають патогенні серовари ешерихій.

До першого виду захворювань належать колі-сепсиси, септикопемії, менінгіти новонароджених, гнійно-запальні процеси жовчевих, сечовивідних та респіраторних шляхів тощо. Вони виникають лише при ослабленні резистентності макроорганізму (імунодефіцити, авітамінози, голодування, на фоні інших захворювань). Вони не передаються від хворої до здорової людини і тим більше не поширюються епідемічно.

До другого виду захворювань належать колі-ентерити (колі-інфекції), які уражають переважно дітей молодшого віку, передаються від хворого до здорового і часом реєструються у вигляді епідемічних спалахів. Збудники таких колі-інфекцій останнім часом поділяють на п'ять типів: ентеротоксичні кишкові палички (ЕТКП), ентеропатогенні (ЕПКП), ентероінвазивні (ЕІКП), ентерогеморагічні (ЕГКП) і етероадгезивні (ЕАКП) кишкові палички (табл. 35).

Ентеротоксигенні ешерихії часом викликають холероподібні захворювання, ентеропатогенні – класичні колі-ентерити, ентероінвазивні – дизентерієподібні

Таблиця 35

Класифікація діарейних ешерихій

Ураження	Серогрупи		
	О-антиген	Н-антиген	К-антиген
Кишечника Ентеротоксигенні (ЕТКП)	06, 08, 011, 015, 020, 025, 027, 063, 078, 080, 085, 0114, 0115, 0126, 0128, 0139, 0148, 0153, 0159, 0166, 0167	H4, H7, H9, H11, H12, H19, H20, H21, H28, H40	
Ентеропатогенні (ЕПКП)	018, 026, 044, 055, 086, 011, 0112, 0114, 0119, 0125, 0127, 0128, 0142, 0158	H2, H6, H7, H11, H12, H14, H18	
Ентероінвазивні (ЕІКП)	028, 029, 0112, 0115, 0124, 0135, 0136, 0143, 0144, 0152, 0164, 0167		
Ентерогеморагічні (ЕГКП)	026, 0111, 0157	H6, H7, H8, H11	
Сечовивідні шляхи	01, 02, 04, 06, 07, 08, 09, 011, 018, 022, 025, 062, 075		K1, K2, K5, K12, K13
Бактеріємія	01, 02, 04, 06, 07, 08, 09, 011, 018, 022, 025, 075		K1, K2, K5, K12, K15, K23
Менінгіти	01, 06, 07, 016, 018, 083		K1

ураження, ентерогеморагічні – діареї з виділенням крові. Останній тип (ентероадгезивні кишкові палички) вивчені ще недостатньо. При бактеріємії та інфекції сечовивідних шляхів часто висівають серогрупи 01, 02, 04, 06, 08, 09, 011, 018 та ін., при менінгітах – 01, 06, 07, 016, 018, 083.

Мікробіологічна діагностика ешерихіозів має особливо важливе значення, оскільки їх клінічні прояви характеризуються відсутністю патогномонічних симптомів відносно збудника. Провідним залишається бактеріологічний діагноз. Його особливість полягає в тому, що виділення й ідентифікація збудника базується на визначенні його антигенної структури, а не на вивченні біохімічних властивостей.

Взяття матеріалу для дослідження. До початку етіотропного лікування у хворих беруть випорожнення, блювотні маси, дуоденальний вміст, кров, сечу, гній, спинномозкову рідину, від трупів – кров із серця, вміст кишок, шматочки легень, печінки, селезінки, нирок. При необхідності досліджують промивні води шлунка, залишки їжі, змиви з рук обслуговуючого персоналу, повітря палат тощо.

Бактеріоскопічне дослідження. В окремих випадках роблять первинну мікроскопію крові, сечі, ліквору, гнійних виділень, секретів слизових оболонок у мазках, забарвлених за Грамом. Виявлення грамнегативних паличок допомагає бактеріологові вибрати відповідні живильні середовища і наступні етапи лабораторної діагностики. Початкова бактеріоскопія випорожнень не проводиться.

Бактеріологічне дослідження. З останніх порцій випорожнень тампоном беруть частину фекалій у пробірку з транспортним середовищем (30 % гліцерину

і 70 % фосфатного буфера) або безпосередньо біля ліжка хворого сіють на середовище Ендо (Левіна, Плоскірева, Аселя-Лібермана). При цьому невелику кількість фекалій емульгують у 0,85 % розчині хлориду натрію у співвідношенні 1:10. Через кілька хвилин після осідання грубих решток 1-2 краплі рідини вносять на поверхню середовища і скляним шпателем розтирають її на невеликій ділянці. Відірвавши шпатель від агару, роблять посів на решту поверхні середовища. Якщо виникає потреба посіяти на другу і третю чашки, матеріал наносять повторно. Кров (10 мл) засівають у флакон із МПБ. Посів інших матеріалів роблять так само, як і випорожнень.

Після інкубації в термостаті при 37 °С протягом доби вивчають характер росту на елективно-диференціальних середовищах. На агарі Ендо колонії мають дископодібну форму, злегка опуклі з рівними краями, малиново-червоного кольору. На середовищі Левіна вони забарвлені в темно-синій колір, а на середовищах Плоскірева і Аселя-Лібермана – в рожевий. До складу останнього середовища входить агар, лактоза (або сахароза) та індикатор конго-червоний. Середовище із сахарозою використовують для індикації тих ентеропатогенних ешерихій, які ферментують цей вуглевод. У зв'язку з тим, що колонії патогенних і непатогенних кишкових паличок на вказаних середовищах не відрізняються, належність виділених культур до патогенних серогруп визначають за допомогою слайд-аглютинації з діагностичними полівалентними ОК-сироватками, або адсорбованими О-сироватками, що містять антитіла до певних О-антигенів. Мікробіологічна промисловість випускає 5 наборів діагностичних ОК-сироваток: ОКА, ОКВ, ОКС, ОКД і ОКЕ. Основна полівалентна сироватка ОКА містить антитіла до О- і К-антигенів більше 20 головних серологічних груп. Суміш ОК-сироваток готують так, щоб кінцеве розведення кожної з них було 1:10. Аглютинують 10 лактозопозитивних колоній. Матеріал із кожної колонії беруть петлею так, щоб частина її залишилась для подальшого пересіву. Якщо одна з колоній дала позитивну слайд-аглютинацію, її залишок пересівають на середовище Олькеницького. Через 18-20 год враховують ферментацію лактози і глюкози (пожовтіння та розрив стовпчика і скошеної частини агару), виділення H₂S (утворення чорного кільця на межі стовпчика і скошеної частини). Виділену культуру орієнтовно відносять до певної серогрупи.

Для остаточної ідентифікації збудника необхідно поставити розгорнуту реакцію аглютинації в пробірках для окремого виявлення його О- і К-антигенів. Діагностичні аглютинуючі сироватки розводять у двох рядах пробірок (у першому – О-сироватку, у другому – К-сироватку) до титру, що вказаний на етикетках ампул. Для визначення О-антигену в кожному пробірці першого ряду вносять по 2 краплі 2-х млрд суспензії виділеної культури, прогрітої протягом 2 год при 100 °С. При кип'ятінні інактивується К-антиген, який локалізується поверхнево і затримує аглютинацію О-антигену. Останній при прогріванні не руйнується. Для виявлення К-антигену в кожному пробірці другого ряду з розведеною до титру сироваткою вносять по 2 краплі суспензії живої (не кип'яченої культури). Пробірку вміщують у термостат при 37 °С на 18-20 год. При позитивній реакції розгорнутої аглютинації до титру (або принаймні до половини титру) роблять остаточний висновок

про виділення відповідного серовару патогенних ешерихій. Негативна слайд-аглотинація 10 лактозопозитивних колоній ешерихій дає право дати відповідь про відсутність ентеропатогенних кишкових паличок.

Виділену на середовищі Олькеницького культуру, що дала позитивну розгорнуту реакцію аглютинації, сіють на середовища Гісса для вивчення її цукролітичних, пептолітичних властивостей і рухливості. Після інкубації посівів протягом доби враховують результати. Патогенні ешерихії ферментують лактозу, глюкозу, мальтозу, маніт, сахарозу (окремі штами), арабінозу, ксилозу, трегалозу, утворюють індол, не виділяють H_2S (деякі штами утворюють сірководень), не розкладають інозит і сечовину, не дезамінують фенілаланін, дають негативну реакцію Фогеса-Проскауера і не синтезують ДНК-азу. Для виявлення джерела інфекції проводять фаго- та коліцинотипування виділених культур.

Ідентифікація діареєгенних серотипів можлива також на основі виявлення специфічних маркерів. Культури типу ЕТКП продукують два види токсинів: термостабільний виявляють на мишатах-сисунцях, термолабільний – на культурах Y1 надниркових залоз. Для швидкої ідентифікації ЕПКП використовують реакцію коаглотинації на склі для виявлення білка зовнішньої мембрани. Серотипи ЕГКП, особливо серовар 0157 : H7, не ферментують сорбіт. Ентероінвазивні кишкові палички (ЕКП) викликають кон'юнктивіт у гвінейських свинок при внесенні бактерій у кон'юнктивальний мішок (тест Серені), нерухливі, не ферментують саліцин. Вони також виділяють шигаподібні токсини SLT-1 і SLT-2, які виявляють у випорожненнях хворих за допомогою ІФА. Адгезивні властивості ешерихій (ЕАКП) виявляють на культурах Hela і Hep-2.

Найшвидшим і високоспецифічним методом діагностики захворювань, викликаних ентеропатогенними ешерихіями, є використання специфічних ДНК-зондів. Вони дають змогу виявити гени плазмід, що кодують патогенність кишкових паличок або синтез їх цитотоксинів. Метод ґрунтується на тому, що одноланцюгова молекула ДНК може гібридизуватися з комплементарним до неї другим ланцюгом ДНК. У більшості патогенних ешерихій гени вірулентності локалізовані у плазмідах. Отже, зондом для виявлення цих бактерій, можуть бути мічені послідовності, клоновані з таких плазмід.

Серологічне дослідження. Виявлення антиешерихіозних аглютининів у сироватці крові хворих з діагностичною метою в рутинній лабораторній практиці не знайшло широкого використання. Антитіла якщо й виявляються, то в низьких титрах (не вище 1:100). Для серологічної діагностики колі-інфекцій більш чутливою і специфічною є реакція непрямой гемаглотинації (РНГА). Специфічний антиген для цієї реакції виготовляють шляхом сенсibilізації еритроцитів барана суспензією 48 год агарової культури ешерихій, прогрітої 2 год при 100 °С. Отже, за допомогою РНГА можна виявити лише О-антитіла, що може бути використано для диференціації захворювань від бактеріоносійства, особливо, якщо взяти для реакції еритроцитарний діагностикум з автоштамом.

Достовірність серологічної діагностики ешерихіозів зростає при виявленні окремих класів імуноглобулінів. Зміна підвищеної концентрації IgM на IgG обу-

мовлена гострим інфекційним процесом. Виявлення в сироватці крові антитіл лише класу IgG свідчить про бактеріоносійство.

Отже, лабораторна діагностика ешерихіозів основана на виділенні збудника захворювання і наступній ідентифікації патогенних і непатогенних штамів кишкових паличок за допомогою діагностичних ОК-сироваток в орієнтованій і розгорнутій реакціях аглютинації.

Захворювання, спричиненні умовно-патогенними ентеробактеріями

Впродовж останніх років значно зросла роль умовно-патогенних грамнегативних бактерій в патології людини. Поряд із гнійно-септичними і опортуністичними інфекціями вони досить часто є причиною внутрішньолікарняних захворювань. Збудниками запальних процесів різних тканин і органів та гастроентероколітів часто можуть бути представники таких родів: *Proteus*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Edwardsiella*, *Providencia*.

Мікробіологічну діагностику цих захворювань проводять так само, як і більшості кишкових інфекцій. Основою її є виділення чистих культур та ідентифікація їх до виду за допомогою визначення біохімічних властивостей та реакції аглютинації з відповідними антисироватками. Матеріалом для дослідження найчастіше служать випорожнення, блювотні маси, кров, гній, ліквор, сеча, жовч, дуоденальний вміст, секційний матеріал.

Посіви проводять на середовище Ендо, Плоскирева, Левіна, вісмут-сульфітний агар з наступною мікроскопією колоній, пересівом їх на середовище Олькеницького та строкатий ряд Гісса, постановкою реакції аглютинації з О- і Н-антисироватками. В ряді випадків застосовують тести, що дають можливість надійно встановити вид виділеної культури. Дуже важливо проводити й кількісне дослідження, що дозволяє точніше встановити збудника захворювання. При патологічних процесах, викликаних умовно-патогенними бактеріями, концентрація справжнього збудника, як правило, становить 10^5 - 10^6 клітин в 1 мл досліджуваного матеріалу. Це особливо важливо при виділенні мікробних асоціацій.

Нижче приведені основні властивості окремих видів бактерій та особливості лабораторної діагностики спричинюваних ними захворювань.

Протейні інфекції. Від хворих на харчові токсикоінфекції, цистити, пієліти, плеврити, пневмонії, абсцеси, менінгіти, сепсис, гнійні ускладнення ран і опіків та при дисбактеріозах найчастіше виділяють *Proteus vulgaris*, *P.mirabilis*, *P.penneri*.

У мазках із досліджуваного матеріалу, забарвлених за Грамом, протей має вигляд грамнегативних поліморфних паличок без спор і капсул, часто утворює нитковидні форми.

На середовищах Ендо і Плоскирева виростають прозорі блискучі безбарвні колонії. На вісмут-сульфітному агарі через 48 годин утворюються сірувато-коричневі колонії, під якими формується чорно-коричнева зона. Н-форма (джутикова) на простому агарі дає характерний повзучий ріст або "феномен роїння". Культура

має неприсмний гнильний запах. При посіві уколом у стовпчик напіврідкого агару визначають рухливість. Повзучий характер росту протею використовують для виділення чистих культур посівом у конденсаційну воду скошеного агару за методом Шукевича.

Ідентифікація бактерій роду протею дуже проста. Їх легко розпізнати за характерним ростом на простому агарі: 85-100 % культур дають “феномен роїння”. Диференціацію видів проводять за біохімічними ознаками (табл. 36).

Таблиця 36

Диференціальні ознаки бактерій роду *Proteus*

Вид	Ферментація			Утворення		Орнітин-декарбок-силаза	Реакція Фогеса-Проскауера
	мальтози	сахарози	ксилози	індолу	H ₂ S		
<i>P. vulgaris</i>	+	+	+	+	+	-	-
<i>P. mirabilis</i>	-	-	+	-	+	+	±
<i>P. myxofaciens</i>	+	+	-	-	-	-	+
<i>P. penneri</i>	+	+	+	-	±	-	-

При наявності діагностичних сироваток види протею ідентифікують в реакції аглютинації. Найважливішою ознакою, яка відрізняє протеїв від інших ентеробактерій є їх здатність дезамінувати внесений до агару фенілаланін. Розклад останнього до фенілпірвіноградної кислоти в присутності FeCl₂ призводить до забарвлення середовища в зелений колір.

Цитробактер-інфекції. До роду *Citrobacter* входять 11 видів бактерій, які виявляють у воді, ґрунті, харчових продуктах та інших об'єктах оточуючого середовища. Вони постійно живуть у кишечнику здорових людей як представники нормоценозу. Більшість видів цитробактерів не патогенні для людини. Від хворих на ентерит, уретрит, холецистит, остеомієліт, отит (особливо у ослаблених пацієнтів) найчастіше виділяють *Citrobacter freundii*, *C. koseri*, *C. amalonaticus*. Вони також можуть викликати ураження дихальних шляхів, септицемії, ендокардити. *C. diversus* часом викликає менінгіти й абсцеси мозку.

Лабораторна діагностика основана на виділенні, біохімічній та серологічній ідентифікації збудника. У мазках із досліджуваних матеріалів виявляють маленькі прямі грамнегативні палички, розташовані поодинокі або парами.

Цитробактери добре ростуть на простих середовищах. Вони здатні утилізувати цитрат. На агарі Ендо штами, що розкладають лактозу, утворюють рожеві колонії але без металевого блиску. На середовищі Плоскирева лактопозитивні колонії мають насичений червоний колір з темним центром, на вісмут-сульфітному агарі – коричневі або чорні колонії. При підозрінні на цитробактер-інфекцію рекомендують робити посіви на агар із цефсулодіном, іргазаном і новобіоцином, на якому збудники утворюють колонії з червоним центром і прозорою безбарвною периферією (“бичаче око”).

При посіві в середовища Гісса цитробактери ферментують глюкозу, лактозу, маніт, мальтозу, рамнозу, сорбіт, арабінозу і ксилозу. Вони виділяють каталазу, не

продукують оксидазу, дають негативну реакцію Фогеса-Проскауера, ростуть на агарі Сімонса.

Більш точною і надійною є серологічна ідентифікація. Спочатку виділену культуру аглютинують полівалентною О-сироваткою. Тепер виготовляють 42 О-сироватки. Оскільки в нашій країні найчастіше зустрічаються серогрупи ОА, ОD, ОF раціонально в першу чергу проводять аглютинацію виділених культур саме з сироватками СіОА, СіОD, СіОF. Остаточну ідентифікацію проводять за допомогою Н-монорецепторних сироваток.

Ентеробактер-інфекції. До коліподібних рухливих бактерій роду *Enterobacter* входить 13 видів. Від хворих людей найчастіше виділяють *Enterobacter cloacae*, *E.aerogenes*, значно рідше – *E.gergovial*, *E.sakasaki*. Ентеробактери рідко викликають самостійні інфекції. Частіше вони інфікують пацієнтів, яких у стаціонарах лікують антибіотиками широкого спектру дії. Як правило, зараження відбувається через руки медичного персоналу. Останнім часом ентеробактери є причиною 15% всіх внутрішньолікарняних інфекцій, з них біля 10% септицемій. Трохи рідше вони викликають менінгіти, контамінують хірургічні й опікові рани, уражують органи дихальної і сечостатевої систем та шлунково-кишкового тракту. Досить часто *E.cloacae* і *E.aerogenes* контамінують лікарські розчини для внутрішньовенних ін'єкцій.

У зв'язку з відсутністю патогномонічних симптомів при клінічних проявах захворювань вирішальне значення має лабораторна діагностика ентеробактер-інфекцій. Вона включає виділення чистих культур збудників та їх біохімічну й серологічну ідентифікацію.

Ентеробактери добре ростуть на простих та диференціально-діагностичних середовищах Ендо, Левіна, Плоскирева. Лактозопозитивні штами утворюють слизуваті або неслизисті колонії. На агарі Ендо вони мають малиновий або рожевий колір з металевим блиском або без нього. На середовищі Плоскирева вони, як правило, набувають жовтуватого відтінку. У мазках із колоній видно грамнегативні палички, окремі штами мають капсулу.

Ідентифікацію виділених культур проводять поки що виключно за біохімічними властивостями. Перважна більшість штамів ферментують глюкозу, лактозу, мальтозу, маніт, сахарозу, трегалозу, не виділяють індол і сірководень, розріджують желатин, дають позитивну реакцію Фогеса-Плоскауера. В ряді високорозвинутих країн почали використовувати реакції слайд-аглютинації з О- і Н-сироватками.

Гафнія-інфекції. До роду *Hafnia* належить типовий і єдиний вид *Hafnia alvei*. Це грамнегативні рухливі палички, які не утворюють спор і капсул, за своїми морфологічними ознаками подібні до інших ентеробактерій. Їх знаходять у ґрунті, воді, харчових продуктах, випорожненнях людей і тварин та деяких видів птахів. У ослаблених хворих гафнії можуть викликати спорадичні опортуністичні інфекції (септицемії, гастроентерити, ентероколіти, цистити, уретрити та ін.). Найчастіше їх виділяють із крові, сечі, випорожнень, ранового вмісту, особливо на фоні інших захворювань.

Лабораторна діагностика основана на виділенні чистих культур та їх біохімічній і серологічній ідентифікації. На середовищах Ендо і Плоскирева вони ростуть у вигляді напівпрозорих мутнуватих безбарвних колоній або з відтінком кольору середовища. За своїм видом і розміром нагадують колонії шигел. На середовищі Олькеницького не утворюють газу й сірководню.

Виділені культури ідентифікують за біохімічними й антигенними властивостями. Гафнії виділяють каталазу і не продукують оксидазу. Вони постійно ферментують арабінозу, гліцерин, ксилозу, мальтозу, маніт, рамнозу і трегалозу, дають позитивну реакцію Фогеса-Проскауера. При наявності діагностичних сироваток остаточну ідентифікацію проводять в слайд-аглотинації з О- і Н-антисироватками.

Сераціози. Рід *Serratia* є одним із найстаріших представників родини ентеробактерій. Тепер виділено 10 видів серацій, але в рутинних баклабораторіях виділяють лише три: *Serratia marcescens*, *S.rubidaea*, *S.liquefaciens*. Раніше їх вважали сапрофітами і лише останнім часом почали виділяти при госпітальних бактерієміях, пневмоніях, ентеритах, інфекціях сечовивідних шляхів, нагноєннях хірургічних ран і ураженнях шкіри. Серації часто передаються через руки медперсоналу. Найбільш часто вони проникають в організм через постійні катетери, інтубаційні пристрої а також з розчинами для різноманітних ін'єкцій. У наркоманів часто виникають артрити, ендокардити, остеомиєліти.

Досліджуваний матеріал у хворих беруть залежно від локалізації патологічних процесів. Найчастіше це кров, гній, сеча, випорожнення, жовч, харкотиння. У мазках серації виглядають як прямі грамнегативні палички, окремі штами мають капсулу.

Мікробіологічна діагностика основана на виділенні чистих культур серацій і визначення їх видової належності за допомогою культуральних властивостей і біохімічних тестів.

Посіви проводять на кров'яний агар, диференціальні середовища Ендо, Плоскирева і особливо МПА з ДНК-азою, толуїдиновим синім і цефалотином. На кров'яному агарі *S.marcescens* і *S.rubidaea* утворюють прозорі сірувато-білі колонії, гладенькі або дрібнозернисті. Через 24-48 год при кімнатній температурі вони продукують червоний пігмент. На диференціальних середовищах колонії безбарвні, гладенькі, злегка опуклі. На агарі з ДНК-азою і толуїдиновим синім серації утворюють колонії з характерним синім обідком, в той час як колонії інших ентеробактерій його не мають.

Ідентифікацію виділених культур проводять виключно за допомогою біохімічних тестів. Серації постійно ферментують гліцерин, мальтозу, маніт, саліцин, сахарозу і сорбіт. Такі спирти і вуглеводи, як адоніт, інозит, ксилозу і целобіозу вони розкладають варіабельно, ростуть на цитратних середовищах і дають позитивну реакцію Фогеса-Проскауера. На жаль, до останнього часу не налагоджено промислове виготовлення діагностичних сироваток, відсутня антигенно-діагностична схема, що не дає змоги проводити серологічну ідентифікацію серацій.

Едвардсієльоз. Серед трьох видів бактерій, віднесених до роду *Edwardsiella*, патогенність для людини має лише *E.tarda*. Більша частина захворювань на ед-

едвардсіельоз обумовлена контактом із прісною й солоною водою, а також із тваринами, що проживають в них або п'ють їх. Зокрема природним резервуаром *E. tarda* служать риби, рептилії моллюски, морські їжаки, птахи, корови, свині, собаки тощо. Едвардсієли викликають ураження сечовивідних шляхів, септицемію, менінгіт. Знаходили їх і в інфікованих ранах, а також у хворих на гострий ентероколіт.

Єдиним надійним способом лабораторної діагностики едвардсіельозу є виділення чистої культури збудника і його ідентифікація. Матеріалом для дослідження є випорожнення, кров, блювотні маси, сеча, жовч, спинномозкова рідина, вода. Їх висівають на середовища Ендо, Левіна, Плоскирева та вісмут-сульфітний агар. Едвардсієли ростуть у вигляді безбарвних напівпрозорих колоній, подібних до росту патогенних ентеробактерій. Колонії на вісмут-сульфітному агарі не мають характерного металевого блиску, немає і почорніння агару під ними. При мікроскопічному дослідженні культур виявляють рухомі грамнегативні палички, які не утворюють спор і капсул.

При проведенні біохімічної ідентифікації виділених культур необхідно мати на увазі, що вони каталазо-позитивні, але оксидазо-негативні, ферментують до кислоти і газу арабінозу, глюкозу, мальтозу, маніт, манозу і трегалозу. *E. tarda* виділяє індол і H_2S , відновлює нітрати, не росте на цитратному агарі, не дає позитивної реакції Фогеса-Проскауера, не гідролізує сечовину й не розріджує желатин.

Серологічну ідентифікацію едвардсієл використовують лише у великих лабораторних центрах, але повна схема визначення сероварів ще відсутня, оскільки не виготовлені сироватки проти всіх антигенних варіантів.

Провіденція-інфекції. До роду *Providencia* належать 5 видів бактерій. Довгий час їх відносили до роду *Proteus*, оскільки патогенез уражень, клінічні прояви і методи діагностики були дуже подібними. Типовий вид *Providencia alcalifaciens*. Всі види провіденцій проявляють патогенність і можуть викликати діареї, інфекції сечовивідних шляхів, септицемії, нагноєння ран і опіків.

Для проведення лабораторної діагностики захворювання до лабораторії направляють кров, сечу, випорожнення, гній тощо. Посіви проводять на диференціально-діагностичні середовища Ендо, Левіна, Плоскирева. Колонії, що виростають на них, безбарвні, майже повністю прозорі, дуже подібні до колоній сальмонел і шигел. До 40 % штамів на простому агарі можуть давати феномен роїння у вигляді дерев, протуберанців, але не концентричних тіл, як у *Proteus vulgaris*. Рекомендують використовувати середовище з колістином (100 мкг/мл) та інозитом (1%), на якому провіденції утворюють великі жовті колонії. Останнім часом запропоновано РАМ-агар Сеніора, до складу якого входять галактоза, ксилоза і маніт. Колонії провіденції на цьому середовищі мають червоний колір, в той час як у всіх інших оксидазо-негативних бактерій вони лимонно-жовті. Для визначення видів користуються також біохімічними тестами. Серологічну ідентифікацію виділених культур та визначення титру антитіл методом парних сироваток не проводять.

Черевний тиф і паратифи

Черевний тиф і паратифи – гострі інфекційні захворювання, які супроводжуються бактеріємією, тривалою постійною гарячкою, ураженням лімфатичних утворів кишечника, вираженою інтоксикацією, мають фекально-оральний механізм передачі. Збудниками черевного тифу є *Salmonella typhi* (див. вкл., рис. 13), паратифу А – *S. paratyphi A*, паратифу В – *S. schottmuelleri*, паратифу С – *S. paratyphi C*. Черевний тиф і паратиф А – типові антропонози, збудники паратифів В і С, окрім людини, можуть ще викликати захворювання тварин і птахів. Всі названі бактерії належать до роду *Salmonella*, родини *Enterobacteriaceae*. Хворі або бактеріоносії виділяють збудників з випорожненнями, сечею і слиною. За клінічною картиною розрізнити черевний тиф і паратифи практично неможливо. Остаточний клінічний діагноз можна встановити лише після виділення та ідентифікації збудника.

Взяття матеріалу для дослідження. Важливе значення для успішного проведення лабораторної діагностики черевного тифу і паратифів має правильний і своєчасний забір досліджуваного матеріалу залежно від фази патогенезу і строків черевнотифозного захворювання. Мікробіологічні дослідження при паратифах проводять так само, як і при черевному тифі. Досліджуваний матеріал для виділення чистої культури збудника, по можливості, слід брати до початку антибіотикотерапії. Найчастіше беруть кров, кістковий мозок, дуоденальний вміст (жовч), екссудат із роцеол, випорожнення, сечу, гній, спинномозкову рідину, секційний матеріал при летальних випадках.

Бактеріологічні методи дослідження. Для ранньої діагностики черевного тифу і паратифів найефективнішим є виділення збудника з крові й кісткового мозку, в меншій мірі з жовчі, сечі, випорожнень та інших досліджуваних матеріалів. Висів паличок черевного тифу і паратифів із кров'яного руслу чи кісткового мозку має абсолютну, 100 % діагностичну цінність.

Метод гемокультури. Ретельно дотримуючись правил асептики, кров хворого в кількості 10 мл беруть за допомогою шприца із ліктьової вени в ранні строки (починаючи з перших годин захворювання) й біля ліжка хворого сіють у флакон із 100 мл жовчного бульйону або середовища Рапопорт (10 % жовчний бульйон із 2 % глюкози, 1 % індикатора Андрaде; перед стерилізацією в середовище поміщають скляний поплавок для вловлювання газу).

В разі неможливого посіву крові біля ліжка хворого, її доставляють до лабораторії в пробірці. Сироватку відділяють від згустка і використовують для серологічного дослідження. Згусток ретельно подрібнюють і засівають на ті ж самі середовища у співвідношенні 1:10. Таке розведення необхідне для усунення бактерицидних властивостей крові. У більш пізні періоди хвороби при наявності гарячки треба брати 15-20 мл крові й сіяти на 150-200 мл живильного середовища. Жовчні середовища є елективними для збудників черевного тифу і паратифів. У маленьких дітей кров для посіву беруть із мочки вуха, п'ятки або пальця і в меншій кількості.

Засіяні флакони інкубують при 37 °С. На другий день вивчають характер росту. При відсутності росту флакони залишають у термостаті до 10 днів, а при

підозрінні на L-форми – до 3-4 тижнів. Наступні висіви на диференціальні середовища роблять через 48 і 72 год, на 5 та 10 добу.

Сальмонели черевного тифу викликають почервоніння бульйону Рапопорт внаслідок ферментації глюкози до кислоти, а збудники паратифів ще й газу, який нагромаджується у поплавку. Культуру, що виросла у флаконі, висівають на трицукрове середовище Олькеницького та Ендо (Плоскирева, Левіна, вісмут-сульфіт-агар). Якщо культура чиста (при мікроскопії грамнегативні палички), далі працюють лише з середовищем Олькеницького.

Посіви лише на Ендо (або інші елективні середовища) досліджують у тих випадках, коли на агарі Олькеницького виростає не чиста культура, що трапляється рідко. В такому разі типові ізольовані колонії пересівають на середовище Олькеницького (або скошений МПА), отримують чисту культуру й ідентифікують її. Колонії всіх трьох збудників на середовищах Ендо, Левіна і Плоскирева безбарвні, ніжні, прозорі, на вісмут-сульфітному агарі – чорного кольору.

Метод мієлокультури. У фазі паренхіматозної дифузії збудники черевного тифу і паратифів можна виділити з кісткового мозку. Методика стерильної пункції безпечна для хворого, вона розширила можливості бактеріологічної діагностики цих захворювань. Місце пункції обробляють спиртом, знеболюють новокаїном. Для забору матеріалу використовують голку Біра з рухливою муфтою, що дозволяє регулювати глибину проникнення голки. Після проколу за допомогою шприца відсмоктують 0,3-0,5 мл пунктату з грудної кістки і сіють у 5-10 мл жовчного бульйону або середовища Рапопорт. Виділення чистої мієлокультури проводять так само, як і при посіві крові. Метод мієлокультури дає позитивні результати частіше ніж метод гемокультури. Його особливо рекомендують застосовувати при легких і стертих клінічних формах захворювань.

Метод білікультури. Для бактеріологічного дослідження жовчі проводять дуоденальне зондування. Спочатку через тонкий зонд вводять у дванадцятипалу кишку 30-40 мл 25 % розчину сірчаної кислоти магnezії. До лабораторії доставляють пробірки з двома або трьома порціями жовчі (А і В, або А, В, С). Кожну з порцій можна сіяти окремо або ж суміш усіх трьох разом у кількості 5-10 мл засівають у флакони з 50-100 мл селенітового бульйону чи середовища Рапопорт. Кислий дуоденальний вміст, білуватий його відтінок та наявність пластівців роблять матеріал непридатним для бактеріологічного дослідження. Посіви інкубують при 37 °С протягом 18-20 год, виділяють та ідентифікують чисті культури. Метод заслуговує особливої рекомендації для виявлення бактеріоносіїв та встановлення формування стійкого бактеріоносійства у реконвалесцентів.

Метод розеолокультури використовують у випадках невиразного перебігу хвороби, коли методи гемо- та білікультури не дали позитивних результатів, а на шкірі хворого є типова висипка. Шкіру в місці локалізації розеоли протирають спиртом, гострим скальпелем скарифікують розеолу до появи крапельок лімфи. Стерильною піпеткою на них наносять кілька крапель жовчного бульйону, змішують і швидко втягують суміш у пастерівську піпетку. Посів роблять біля ліжка хворого у 50 мл селенітового або жовчного бульйону. При необхідності доставляти матеріал до лабораторії кінець піпетки запаюють на вогні.

Метод уринокультури застосовують переважно для діагностики бактеріоносійства у реконвалесцентів. Найчастіше бактерії в сечі виявляють на 3-4 тижні хвороби. Після ретельного туалету зовнішніх статевих органів сечу краще брати за допомогою катетера в стерильний посуд. У лабораторії 30-50 мл сечі центрифугують і осад сіють в середовище збагачення (селенітове, Мюллера, Кауфмана), а також на 1-2 чашки з середовищем Ендо (Плоскирева, вісмут-сульфіт-агар). Виділення й ідентифікацію проводять так само, як і при дослідженні інших матеріалів.

Метод копрокультури для діагностики захворювання використовують рідко, оскільки бактерії в фекаліях появляються пізно. Частіше його застосовують для обстеження реконвалесцентів на бактеріоносійство та здорових осіб, які влаштовуються на роботу і працюють в системі громадського харчування, водопостачання та дитячих закладах. Матеріал у хворих і реконвалесцентів беруть без використання проносного. Здоровим особам за 3-4 год до забору матеріалу дають 30 г магnezіальної солі. Пробу відбирають з рідкої частини фекалій. При патологічних домішках у випорожненнях (слиз, гній, кров) їх включають до взятого матеріалу. Проби фекалій в кількості 5-10 г набирають дерев'яним шпателем у спеціальні стандартні стерильні пластмасові патрони одноразового використання або скляні широкогорлі баночки. На них наклеюють етикетку, де вказують дату забору, прізвище та ініціали хворого і мету дослідження. Краще всього посів зробити біля ліжка хворого. При неможливості швидко доставити матеріал до лабораторії, його вносять у консервант у співвідношенні 1:3. Найчастіше для цього використовують рідину, що містить 30 % стерильний розчин гліцерину у фосфатному буфері.

У бактеріологічній лабораторії фекалії сіють одночасно двома способами – прямим на елективне середовище (вісмут-сульфіт-агар, Плоскирева, Ендо, Левіна) і на одне із середовищ збагачення (селенітове, Мюллера, Кауфмана). Вибір середовищ проводить бактеріолог.

При прямому висіві на відповідне щільне середовище невелику кількість випорожнень розміщують у пептонній воді або у 0,85 % розчині хлориду натрію і залишають на 30 хв для осідання крупних частинок. Із поверхні рідини беруть краплю матеріалу і засівають у чашки з елективним середовищем.

Посів на середовище збагачення (в ньому сальмонели розмножуються краще і швидше, ніж супутня мікрофлора) одночасно з прямим посівом є обов'язковим при дослідженні здорових людей на бактеріоносійство, оскільки вони виділяють невелику кількість бактерій. Однак, у зв'язку з широким вживанням населенням різноманітних антибіотиків, необхідно використовувати середовища збагачення і при посівах випорожнень від хворих, особливо при епідемічних показаннях.

При посіві на середовища збагачення шматочки фекалій емульгують у 10 мл цього ж середовища. Наступний висів із нього на щільне елективне середовище доцільно робити вже через 5-6 год підрощування в термостаті.

Спинномозкову рідину досліджують при наявності менінгеальних і менінгоenceфалітичних синдромів. Посіви гною, ексудату, харкотиння, грудного молока породіль проводять у такому ж порядку, як вище описано. При дослідженні секційного матеріалу сіють кров із серця, шматочки паренхіматозних органів, вміст тон-

кого кишечника. В лабораторії матеріал розтирають у ступках із стерильним піском, переводять у рідку фазу і досліджують так само, як і випорожнення.

Дослідження води на виявлення тифозних і паратифозних мікробів проводять при розслідуванні водних спалахів захворювань та інших епідеміологічних показаннях. Оскільки збудники у воді знаходяться у невеликій кількості, для їх надійнішого виявлення застосовують методи, які дозволяють концентрувати бактерії з досліджуваного об'єму води. Найкраще це можна зробити за допомогою мембранних фільтрів. Для цього 2-3 л води пропускають через фільтри № 2 (або № 3). Фільтри з адсорбованими на них бактеріями опускають у селенітовий бульйон або накладають на вісмут-сульфідний агар. Через 8-10 год інкубування в термостаті роблять висів із селенітового бульйону на одне з диференціальних щільних середовищ з метою отримання ізольованих колоній і наступного виділення чистих культур. Із поверхні фільтрів на вісмут-сульфід-агарі після 24-48 год вирощування в термостаті пересівають колонії чорного кольору на середовище Олькеницького й ідентифікують виділені культури.

Якщо виявити збудників черевного тифу і паратифів не вдається, можна досліджувати воду на наявність відповідних бактеріофагів. Для цього воду спочатку фільтрують через фільтр і 1-2 мл фільтрату вносять у стерильну чашку Петрі, заливають 15 мл розтопленого і охолодженого до 45-50 °С МПА, ретельно перемішують. На поверхню застиглому агару засівають секторами культури збудників черевного тифу і паратифів. Поява негативних колоній свідчить про присутність відповідного фагу.

Ідентифікація чистих культур. Виділені культури ідентифікують за морфологічними, культуральними, біохімічними властивостями, антигенною структурою та фаголізабельністю. При мікроскопії мазків, забарвлених за Грамом, черевнотифозні і паратифозні бактерії мають вигляд паличок червоного кольору із заокругленими кінцями розміром 0,5-0,8 г 1-3 мкм, активно рухливі у висячій чи надавленій краплі.

Ріст у МПБ супроводжується помутнінням. На МПА виростають ніжні, круглі, гладенькі, прозорі або напівпрозорі колонії розміром 2-4 мм. Однак колонії тифозних мікробів, що мають Vi-антиген, каламутні. У *S. paratyphi B* колонії грубіші, через кілька днів по периферії колоній утворюється слизовий валик.

На середовищах Ендо, Левіна, Плоскирева колонії безбарвні, прозорі, часом рожеваті (Ендо) або злегка голубуваті (Левіна). На вісмут-сульфідному агарі черевнотифозні мікроби утворюють колонії чорного кольору, іноді зі світлим обідком. Паратифозні бактерії на цьому середовищі можуть утворювати коричневі або зеленуваті колонії. Після зняття колонії на середовищі залишається чорний слід.

На середовищі Олькеницького тифозна паличка розкладає глюкозу до кислоти (жовтіє стовпчик агару), не ферментує лактозу і сахарозу (забарвлення скошеної частини не змінюється), виділяє сірководень (почорніння на межі стовпчика і скошеної частини). Паратифозні бактерії ферментують глюкозу до кислоти і газу (пожовтіння та розриви стовпчика агару).

Біохімічні ознаки тифозно-паратифозних мікробів вивчають при посіві на середовища "строкатого" ряду Гісса (табл. 37).

Таблиця 37

Ферментативні властивості ешерихій і тифозно-паратифозних бактерій

Вид	Лактоза	Глюкоза	Мальтоза	Маніт	Сахароза	Індол	H ₂ S
<i>Escherichia coli</i>	кГ	кГ	кГ	кГ	кГ±	+	±
<i>Salmonella typhi</i>	-	к	к	к	-	-	+
<i>Salmonella paratyphi A</i>	-	кГ	кГ	кГ	-	-	-
<i>Salmonella schottmuelleri</i>	-	кГ	кГ	кГ	-	-	+

Більш надійною є серологічна ідентифікація виділених культур в реакції аглютинації з діагностичними сироватками. Спочатку реакцію ставлять на склі з адсорбованими аглютинуючими сироватками, які містять антитіла до антигенів 09 (*S. typhi*), 02 (*S. paratyphi A*) і 04 (*S. schottmuelleri*). Якщо виділена культура за біохімічними властивостями подібна до тифозної, але не аглютинується 09-сироваткою, її необхідно проаглютинувати з Vi-сироваткою.

Для постановки реакції аглютинації на предметне скло наносять краплю відповідної сироватки і рядом краплю фізіологічного розчину. Бактеріологічною петлею набирають культуру з середовища Олькеницького, емульгують її в краплі фізіологічного розчину і з'єднують із краплею сироватки. При відповідності культури і сироватки появляється аглютинація, за результатами якої визначають належність досліджуваної культури до серогрупи. Серовар встановлюють в реакції аглютинації з монорецепторними H-сироватками.

В разі відсутності в лабораторії адсорбованих монорецепторних сироваток ставлять розгорнуту реакцію аглютинацію в пробірках (р-ція Грубера) з видовими тифозними і паратифозними сироватками. Діагностичну сироватку необхідно розводити до титру, вказаного на етикетці ампули. Якщо реакція аглютинації випадає до титру, або принаймні до половини титру, тоді культура відповідає виду сироватки.

Фаготипування виділених культур. Важливе епідеміологічне значення, особливо для встановлення джерела інфекції, має фаготипування тифо-паратифозних мікробів. Збудники черевного тифу з Vi-антигеном лізуються Vi-бактеріофагами. Їх нараховують 86 типів. Всі вони високоспецифічні. Є набори фагів і для типування паратифозних сальмонел.

Для фаготипування беруть молоді культури (4-6-годинні) досліджуваних штамів, набори типових бактеріофагів у тест-розведеннях та стандартне свіжовиготовлене й добре підсушене середовище. Культуру засівають суцільним газоном, чашки обов'язково підсушують у термостаті. На поверхню газону пастерівською піпеткою, штампом-реплікатором або каліброваною петлею наносять типові фаги. Попередньо дно чашки розмічують на квадрати, в яких вписують номер типового фагу. Після підсихання крапель чашки інкубують у термостаті 5-6 год і враховують результати. Фаготип встановлюють за наявністю лізису культури відповідним фагом. Для визначення джерела інфекції проводять також коліцинтипування сальмонел.

Останнім часом в добре оснащених мікробіологічних лабораторіях використовують більш чутливі й специфічні методи лабораторної діагностики черевного

тифу і паратифів. Так, для виявлення О- і Ві-антигенів в крові, випорожненнях та інших матеріалах застосовують РЗК, реакцію непрямой гемаглютинації з еритроцитарними антигільними (О- і Ві) діагностикумами. Перспективне також використання реакції коагулінації, агрегат-аглютінації та ІФА. Для прискореної ідентифікації збудників черевного тифу і паратифів застосовують ДНК-зонд, що несе на собі ген Ві-антигена. Результат отримують через 3-4 год.

Серологічне дослідження проводиться як для діагностики захворювання, так і для встановлення бактеріоносійства. З діагностичною метою ставлять розгорнуту об'ємну реакцію Відаля і РНГА з О- і Ві еритроцитарними діагностикумами. РНГА є більш надійна й специфічна. Останнім часом все ширше використовують виявлення антитіл за допомогою методу ІФА. Діагностична цінність серологічних реакцій значно підвищується при постановці їх методом парних сироваток.

Реакція Відаля. Аглютиніни до збудників черевного тифу і паратифів виявляють у сироватці крові, починаючи з 8-10 дня захворювання й пізніше. Динаміка їх накопичення досить своєрідна: спочатку появляються антитіла до О-антигену, але їх титр швидко зменшується після видужування. Н- і Ві-антитіла з'являються пізніше, але роками зберігаються у високих титрах після хвороби, щеплень і у бактеріоносійв. У зв'язку з цим для правильної оцінки серологічної реакції важливо одночасно виявляти всі типи аглютининів.

Для постановки реакції аглютінації Відаля необхідно три компоненти: 1) антитіла (сироватка хворого); 2) антиген (бактерійний або еритроцитарний діагностикум); 3) 0,85 % розчин хлориду натрію (електроліт).

Для одержання сироватки у хворого з вени, пальця або мочки вуха в стерильну пробірку беруть 2-3 мл крові, ставлять її в термостат на 30 хв для згортання. Утворений згусток обводять пастерівською піпеткою, відділяючи його від стінок пробірки, вміщують на 30-40 хв у холодильник, відсмоктують сироватку і роблять її робоче розведення 1:50. Потім у шести паралельних рядах аглютінаційних пробірок роблять наступні розведення сироватки від 1:100 до 1:1600 за стандартною схемою (табл. 38)

Таблиця 38

Схема постановки реакції Відаля

Компоненти	Номери пробірок						
	1	2	3	4	5	6 Кс	7 Кд
0,85 % розчин хлориду натрію, мл	1	1	1	1	1	-	1
Сироватка хворого в розведенні 1:50, мл	1 →	1 →	1 →	1 →	1 ↓	1	-
Одержане розведення сироватки	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:100	-
Діагностикум, краплі	2	2	2	2	2	-	2
Інкубація в термостаті при 37 °С – 2 год; 18 °С – 18 год							
Облік реакції							

Примітка: Кс – контроль сироватки, Кд – контроль діагностикуму.

В якості антигенів для реакції аглютинації використовують черевнотифозні монодіагностикуми 09 і Hd, а також паратифозні О- і Н-діагностикуми. Вони є 3-х млрд зависі вказаних бактерій, вбитих нагріваннями або формаліном. О-діагностикуми готують кип'ятінням культур або обробляють їх спиртом, Н-діагностикуми – обробкою культур формаліном. В кожную пробірку ряду, окрім шостої, (контроль сироватки – КС) додають по 2 краплі діагностикуму. Сьома пробірка є контролем діагностикуму (КД). Штативи з пробірками енергійно струшують і ставлять на 2 год у термостат, після чого роблять попередній облік результатів реакції. Остаточний облік проводять через 18-20 год знаходження пробірок при кімнатній температурі. При позитивній реакції аглютинації утворюється білуватий осад на дні пробірки із більш-менш прозорою рідиною над ним. При негативній реакції рідина залишається каламутною, осад на дні пробірки відсутній. Аглютинацію вважають специфічною, коли в контрольних пробірках (КС і КД) аглютинат не утворюється. Під час обліку результатів звертають увагу на характер аглютинатів: О-аглютинація буде дрібнозернистою, а Н-аглютинація – крупнопластівцевою.

При типовій клінічній картині черевного тифу діагностичним титром реакції Відаля у хворих, що не прищеплювалися, вважають розведення 1:100 і вище, при атипичних чи стертих формах захворювання – не нижче 1:200. Останнім часом реакцію Відаля не вважають дуже специфічною. Вона може бути позитивною і при інших захворюваннях, що супроводжуються гарячкою, після щеплення або раніше перенесеної хвороби тощо. І все ж висока специфічність реакції може бути виявлена при її постановці в динаміці методом парних сироваток. Ні анамнестичні, ні прищепні чи групові антитіла не покажуть наростання титру з другою сироваткою, взятою через 10-12 днів. Всі ці особливості в якійсь мірі обмежили постановку цієї реакції з діагностичною метою. Особливо це проявляється при раньому лікуванні хворих антибіотиками. Останні значною мірою інактивують антигени (збудники), титр антитіл у таких пацієнтів низький і не може вважатись діагностичним.

Реакція Vi-гемаглютинації. При серологічній діагностиці черевного тифу і паратифів останнім часом ширше використовують РНГА, особливо для виявлення Vi-антитіл. Вона ставиться спочатку з комплексним еритроцитарним діагностикумом АВСДЕ, потім з черевнотифозним еритроцитарним 09- і Hd діагностикумом, і, насамкінець, з Vi-еритроцитарним діагностикумом.

Vi-антитіла при черевному тифі не мають значного діагностичного чи прогностичного значення. Виявлення цих антитіл має важливе значення для виявлення осіб, підозрілих на бактеріоносійство.

Реакцію ставлять у пластмасових планшетах з лунками. Кров у хворих чи бактеріоносіїв беруть так само, як і для реакції Відаля. Сироватку розводять у лунках від 1:10 до 1:160 в об'ємі 0,5 мл. У кожную лунку потім вносять по 0,25 мл еритроцитарного діагностикуму. Планшети ставлять у термостат на 2 год, потім залишають при кімнатній температурі ще на 18-20 год. Результати враховують за чотириплюсовою системою: ++++ – еритроцити повністю аглютинувались, на дні лунки пухкий осад у вигляді перекинutoї “парасольки”; +++ – “парасолька” менша,

не всі еритроцити аглютинувались; ++ – аглютинат маленький, є осад неглютинованих еритроцитів; (-) – негативна реакція, на дні лунки щільний осад еритроцитів у вигляді “монетного стовпчика”.

Діагностичне значення має реакція в титрі 1:40 і вище. Але для постановки остаточного діагнозу “бактеріоносійство” потрібно обов’язково виділити чисту культуру збудника за методом копро-білі- чи уринокультури.

Постановка алергічної проби. Як допоміжний метод діагностики черевного тифу використовують шкірну алергічну пробу з Vi-тифіном, що містить Vi-алерген, який при взаємодії з Vi-антитілами викликає місцеву алергічну реакцію шкіри у вигляді почервоніння і набряку через 20-30 хв. Проба з Vi-тифіном стає позитивною в період реконвалесценції й може бути використана для ретроспективної діагностики.

Сальмонельози (харчові токсикоінфекції)

Гастроентерити сальмонельозної етіології – гострі антропо-зоонозні інфекції, які викликають численні бактерії з роду *Salmonella*; характеризуються переважним ураженням кишкового тракту й інтоксикацією. Всього відомо понад 2200 сероварів сальмонел, із них більше 400 є патогенними для людини. Переважна їх більшість патогенні як для людей, так і для різних видів тварин та птахів. Винятком є сальмонели черевного тифу, паратифу А, які патогенні лише для людини і викликають зовсім інші клінічні форми захворювань.

Основними збудниками сальмонельозів є *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. choleraesuis*, *S. heidelberg*, *S. anatum*, *S. haifa*, *S. derby* та ін. Сальмонели мають О-, Н- і К-антигени. За О-антигеном вони поділяються на 50 серологічних груп, які позначаються великими літерами латинського алфавіту (А-Z) і цифрами (51-65).

Головним методом лабораторної діагностики сальмонельозів, виявлення бактеріоносіїв і контамінації харчових продуктів та інших об’єктів оточуючого середовища є бактеріологічне дослідження.

Взяття досліджуваного матеріалу. Від хворих на сальмонельоз забирають блювотні маси, промивні води шлунка, випорожнення, кров (у перші години захворювання при підозрі на бактеріємію), кістковий мозок, жовч, сечу, спинномозкову рідину. Для виявлення бактеріоносіїв серед працівників підприємств громадського харчування, водопостачання та дитячих закладів досліджують фекалії після прийому проносного. При розтині трупів беруть вміст шлунка і кишок, кров із серця, шматочки паренхіматозних органів, лімфатичні вузли брижі.

При діагностиці харчових токсикоінфекцій обов’язково беруть також залишки підозрілої їжі, продукти, з яких її готували, змиви з поверхні столів, кухонних дощок, рук обслуговуючого персоналу тощо. Досліджуваний матеріал забирають в стерильний посуд у таких кількостях: випорожнення, блювотні маси – 50 мл; промивні води – 100 мл; м’ясо і м’ясні продукти – 0,5 кг; креми, масло, морозиво, молоко, сметану та інші рідкі й напіврідкі продукти – 100-150 г; тушки птахів направляють цілком.

До лабораторії матеріали доставляють в упакованому та опечатаному вигляді. При неможливості швидкої доставки їх зберігають при 4-6 °С не більше доби.

Перед посівом наважку щільних (густих) матеріалів гомогенізують у стерильній ступці з пептонною водою або 0,85 % розчином хлориду натрію у співвідношенні 1:5. Блювотні маси та кислі харчові продукти нейтралізують 10% розчином бікарбонату натрію. Випорожнення розмішують у стерильному фізіологічному розчині 1:10. Поверхню м'яса, шинки, ковбаси, сиру стерилізують, прикладаючи розжарений металевий шпатель, вирізають пробу з глибини, роблять мазки-відбитки для первинної мікроскопії, потім вносять її у фарфорову ступку, розтирають із стерильним піском і додавають ізотонічний розчин хлориду натрію.

Бактеріологічне дослідження. Посів крові для виділення гемокультури проводять так само, як і при черевному тифі у флакон із жовчним бульйоном чи середовищем Рапопорт. Випорожнення, сечу, промивні води, блювотні маси, гній, секційний матеріал, харчові продукти й змиви обов'язково сіють в середовище накопичення (селенітовий, магнієвий чи жовчний бульйон), а також паралельно на середовище Плоскирева або вісмут-сульфітний агар. Крем, масло, морозиво сіють після їх розтоплення при 43-45 °С (краще з додаванням Твіну-80). Посіви вирощують при 37 °С. Через 6-8 год із середовища накопичення роблять пересів на агар Плоскирева. Наступного дня досліджують ізольовані лактозонегативні колонії (безбарвні на середовищі Плоскирева і чорні або зеленкуваті на вісмут-сульфітному агарі), мікроскопують їх і пересівають на трицукровий агар Олькеницького для накопичення чистої культури. На третій день виділені культури ідентифікують.

Для вивчення біохімічних властивостей їх сіють у середовища Гісса або досліджують у стандартних ентеротестах. Більшість сальмонел розкладають глюкозу, мальтозу, маніт до кислоти і газу, не ферментують адоніт, лактозу, сахарозу, саліцин, не продукують індол, виділяють сірководень, не розкладають сечовину, не розріджують желатин, дають негативну реакцію Фогеса-Проскауера.

Для надійнішої ідентифікації сальмонел використовують реакцію аглютинації на склі з адсорбованими груповими сироватками А, В, С, Д і Е. Саме серед цих п'яти серогруп зустрічаються сальмонели, які найчастіше викликають захворювання. При отриманні позитивного результату хоча б із однією груповою сироваткою, наступну реакцію аглютинації проводять з адсорбованими О-сироватками, характерними для даної серогрупи, а потім і з монорецепторними Н-сироватками (першої, а при необхідності й другої фази). При цьому необхідно користуватись схемою класифікації сальмонел за Кауфманом і Уайтом (табл. 39).

На основі реакції аглютинації з адсорбованими і монорецепторними сироватками роблять остаточний висновок про вид і серовар збудника. Можна також використати реакцію флуоресценції з міченими флуорохромами антитілами і метод ІФА. Культури, які не аглютинуються сальмонельозними сироватками, ідентифікують за морфологічними, культуральними, біохімічними властивостями, а також за допомогою О-1 бактеріофага, який лізує переважну кількість сальмонел.

Збудники сальмонельозів найчастіше виділяють із фекалій хворих, рідше з блювотних мас і промивних вод, ще рідше з крові, жовчі та сечі. Ці результати

мають неоднакову діагностичну значущість. Виділення збудників із крові, кісткового мозку, спинномозкової рідини, блювотних мас і промивних вод є беззаперечним підтвердженням діагнозу. Знаходження сальмонел у випорожненнях, сечі, жовчі може бути обумовлене бактеріоносійством. Важливим доказом етіологічного значення сальмонел у виникненні гастроентеритів є наростання титру антитіл у реакції аглютинації з автоштамом.

Таблиця 39

Серологічна класифікація сальмонел (фрагмент)

Група	Вид	О-антиген	H-антиген	
			1 фаза	2 фаза
A	<i>S. paratyphi A</i>	1, 2, 12	a	-
B	<i>S. schottmuelleri</i>	1, 4, 5, 12,	b	1, 2
	<i>S. aboni</i>	1, 4, 5, 12	b	e, n, x
	<i>S. typhimurium</i>	1, 4, 5, 12	i	1, 2
	<i>S. derby</i>	1, 4, 5, 12	f, g	1, 2
	<i>S. haifa</i>	1, 4, 5, 12	z	1, 2
	<i>S. heidelberg</i>	1, 4, 5, 12	r	1, 2
C	<i>S. hirschfeldii</i>	6, 7, Vi	c	1, 5
	<i>S. choleraesuis</i>	6, 7	c	1, 5
	<i>S. thomson</i>	6, 7	k	1, 5
	<i>S. newport</i>	6, 8	e, h	1, 2
	<i>S. bonn</i>	6, 7	e, v	e, n, x
D	<i>S. typhi</i>	9, 12, Vi	d	-
	<i>S. enteritidis</i>	1, 9, 12	g, m	1, 7
	<i>S. dublin</i>	1, 9, 12	g, p	-
	<i>S. rostoc</i>	1, 9, 12	g, p, u	-
	<i>S. moscow</i>	1, 9, 12	g, q	-
	<i>S. gallinarum</i>	1, 9, 12	-	-
E	<i>S. london</i>	3, 10	l, v	1, 6
	<i>S. anatum</i>	3, 10	e, h	1, 6
	<i>S. amsterdam</i>	3, 10	g, m, s	-
	<i>S. zanzibar</i>	3, 10	k	1, 5

Постановка біопроб. На відміну від паратифозних мікробів А і С сальмонели, що викликають гастроентерити, патогенні для білих мишей. Цю особливість можна використати для диференціації вказаних бактерій. Білих мишей на початку аналізу перорально заражують досліджуваним матеріалом, а після виділення культури – суспензією бактерій. Через 1-2 доби після зараження тварини гинуть від септицемії. Із крові чи паренхіматозних органів загиблих мишей виділяють культуру сальмонел. Постановка біологічної проби має допоміжне значення.

Серологічна діагностика. У тих випадках, коли при наявності клінічних симптомів, характерних для сальмонельозної токсикоінфекції, мікробіологічне дослідження не проводилось, або збудник не виділено, ставлять реакцію аглютинації з сироваткою крові перехворілих. Серологічні дослідження проводять також з ме-

тою ретроспективного аналізу масових захворювань на підприємствах громадського харчування і в організованих колективах.

Сироватку крові беруть у перші дні, а потім через 8-10 днів від початку хвороби. Реакцію аглютинації ставлять одночасно з обома сироватками, щоб виявити наростання титру антитіл в динаміці. Діагностичне значення має підвищення титру аглютининів у 4 рази і більше.

Перевагу віддають постановці РНГА з полівалентними еритроцитарними діагностикумами, що містять антигени серогруп А, В, С, Д, Е. Методика постановки РНГА така ж сама, як і при черевному тифі. Можливе визначення титру аглютининів і методом ензимічних антитіл.

Дизентерія (шигельоз)

Дизентерія – гостра або хронічна інфекційна хвороба, що характеризується проносом, ураженням слизової оболонки товстої кишки та інтоксикацією організму. Це одне з найчастіших кишечних захворювань у світі. Його викликають різні види бактерій роду *Shigella*: *S.dysenteriae*, *S.flexneri*, *S.boydii*, *S.sonnei* (див. вкл., рис. 14). У повоєнні роки в промислово розвинених країнах дизентерію найчастіше викликають *S.flexneri* й *S.sonnei*.

В Україні користуються міжнародною класифікацією цих бактерій, яка враховує їх біохімічні властивості та особливості антигенної структури. Всього нараховують 44 серовари шигел (табл. 40).

Таблиця 40

Класифікація бактерій роду *Shigella*

Підгрупа, вид	Серовари	Підсеровари
A – <i>S. dysenteriae</i>	1-12	-
B – <i>S. flexneri</i>	1	1a, 1b
	2	2a, 2b
	3	3a,3b, 3c
	4	4a, 4b
	5	5a, 5b
	6	-
	X	-
	Y	-
C – <i>S. boydii</i>	1-18	-
D – <i>S. sonnei</i>	-	-

Основним методом мікробіологічної діагностики дизентерії є бактеріологічний. Схема виділення збудника класична: посів матеріалу на середовище збагачення та агар Плоскирева, одержання чистої культури, вивчення її біохімічних властивостей та ідентифікація за допомогою полівалентних і моновалентних аглютинуючих сироваток.

Взяття матеріалу для дослідження. Позитивний результат мікробіологічного аналізу значною мірою залежить від своєчасного і правильного забору дослі-

джуваного матеріалу. У хворих і бактеріоносіїв найчастіше беруть випорожнення, значно рідше – блювотні маси і промивні води шлунка та кишок. Фекалії (1-2 г) беруть скляною паличкою із судна або пелюшок, включаючи шматочки слизу і гною (але не крові). Краще всього для дослідження взяти слиз (гній) із місць ураження слизової оболонки під час колоноскопії. При заборі та посіві матеріалу важливо суворо дотримуватись певних правил.

Бактеріологічне дослідження по можливості потрібно починати до початку етіотропного лікування. Посуд до взяття фекалій (судна, горшки, банки) ошпарюють окропом і ні в якому разі не обробляють дезінфікуючими розчинами, до яких шигели дуже чутливі. Досліджуваний матеріал потрібно швидко (біля ліжка хворого) посіяти в середовище збагачення і паралельно на селективний агар в чашці Петрі. Брати випорожнення можна, не чекаючи дефекації, за допомогою ватного тампона або ректальних трубок Цимана.

Взятий матеріал або засіяні середовища треба негайно доставити до лабораторії. При неможливості посіву в лікарні і швидкої доставки випорожнення зберігають у консерванті (30 % гліцерину + 70 % фосфатного буферу) при 4-6 °С не більше доби.

Збудники дизентерії дуже рідко проникають в кров і сечу, у зв'язку з чим ці об'єкти звичайно не сіють. Бактеріологічний аналіз секційного матеріалу необхідно проводити якомога скоріше після смерті (товстий кишечник, мезентеріальні лімфатичні вузли, шматочки паренхіматозних органів). При спалахах дизентерії досліджують також харчові продукти, особливо молоко, сир, сметану.

Бактеріологічне дослідження. Посіви випорожнень проводять паралельно на селективне середовище Плоскирева для отримання ізольованих колоній і обов'язково в селенітовий бульйон з метою накопичення шигел, якщо їх мало в досліджуваному матеріалі. Бактеріологічною петлею вибирають слизово-гнійні шматочки, ретельно прополіскують їх у 2-3-х пробірках з ізотонічним розчином хлориду натрію, наносять на середовище Плоскирева і скляним шпателем втирають в агар на невеликій ділянці. Потім відривають шпатель від середовища і втирають ним залишковий матеріал досуха в решту незасіяної поверхні. При посіві в 2-3 чашки на кожну з них наносять нову порцію посівного матеріалу. В селенітовий бульйон грудочки слизу і гною сіють без прополіскування.

При відсутності слизово-гнійних шматочків фекалії емульгують у 5-10 мл 0,85 % розчину хлориду натрію і 1-2 краплі надосаду засівають на середовище Плоскирева. У селенітовий бульйон сіють неемульговані випорожнення у співвідношенні 1:5. При посіві блювотних мас і промивних вод використовують селенітовий бульйон подвійної концентрації і забезпечують співвідношення посівного матеріалу до середовища 1:1. Засіяні біля ліжка хворого живильні середовища безпосередньо вміщують у термостат. Всі посіви вирощують при 37 °С протягом 18-20 год.

На другий день неозбросним оком або за допомогою лупи 5×-10× досліджують характер росту на середовищі Плоскирева, де шигели утворюють дрібні, прозорі, безбарвні колонії. Шигели Зонне можуть давати колонії двох видів: одні плес-

куваті із зазубреними краями, інші – круглі, опуклі, з вологим блиском. 3-4 колонії мікроскопують, досліджують на рухливість і пересівають на середовище Олькеницького для виділення чистої культури. Якщо на агарі Плоскирева росту немає, або відсутні характерні колонії шигел, роблять висів із селенітового бульйону на агар Плоскирева або Ендо. При достатній кількості типових колоній ставлять орієнтовну реакцію аглютинації на склі з сумішню сироваток Флекснера і Зонне.

На третій день враховують характер росту на середовищі Олькеницького. Шигели викликають характерні зміни трицукрового агару (жовтіє стовпчик, колір скошеної частинки не змінюється, почорніння відсутнє). Підозрілу культуру сіють в середовища Гісса для визначення біохімічних властивостей (табл. 41), або використовують ентеротести.

Таблиця 41

Біохімічні властивості шигел

Вид	Ферментація вуглеводів						Індол	Каталаза
	лактоза	глюкоза	мальтоза	маніт	дульцит	сахароза		
<i>S. dysenteriae</i>	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>S. flexneri</i>	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>S. boydii</i>	-	+	±	+	+	-	+	-
<i>S. sonnei</i>	+	+	+	+	-	+	-	+
	повільно					повільно		

Примітка: “+” – ферментація вуглеводів, утворення індолу, каталази; “-” – відсутність ознак

Серологічна ідентифікація виділених культур проводиться за допомогою реакції аглютинації на склі спочатку з сумішню сироваток проти видів Флекснера і Зонне, які найчастіше зустрічаються, а потім із моновидовими та монорецепторними сироватками. Останнім часом випускають комерційні як полівалентні, так і моновалентні сироватки проти всіх видів збудників дизентерії.

Для визначення виду шигел використовують також реакцію коагулінації. Вид збудника встановлюють за допомогою позитивної реакції з білком А золотистого стафілокока, на якому адсорбовані специфічні антитіла проти шигел. На типову колонію наносять краплю сенсibilізованого антитілами протеїну А, похитують чашку й через 15 хв під мікроскопом спостерігають появу аглютинату. Реакцію коагулінації можна ставити вже на другий день дослідження, якщо на середовищі є достатня кількість лактозонегативних колоній.

З метою швидкої і надійної ідентифікації шигел ставлять також пряму й непряму реакції імуофлуоресценції та ензимічених антитіл. Остання при дизентерії є високоспецифічною і все частіше використовується при лабораторній діагностиці захворювання.

Для виявлення антигенів у крові хворих, у тому числі в складі циркулюючих імунних комплексів, можна використати реакцію агрегат-гемаглютинації та метод ІФА (діагностична тест-система “Шигелапласт”). Антигени шигел у випорожненнях і сечі виявляють за допомогою РНГА, РЗК і коагулінації. Ці методи високоефективні, специфічні й придатні для ранньої діагностики.

Щоб встановити належність виділених культур до роду шигел ставлять також кератокон'юнктивальну пробу на гвінейських свинках. У кон'юнктивальний мішок вносять петлю агарової культури або краплю бульйонної. Важливо не травмувати при цьому рогівку. Свіжовиділені шигели викликають виражений кератит на 2-5 добу після введення культури. Сальмонели також можуть викликати кон'юнктивіт, але вони не уражають рогівку. Однак, слід пам'ятати, що ентероінвазивні кишкові палички (ЕІКП) особливо серовари 028, 029, 0124, 0143 та ін. також викликають експериментальний кератокон'юнктивіт у гвінейських свинок.

Бактеріологічний метод діагностики дизентерії є найдостовірнішим, але в різних лабораторіях (залежно від кваліфікації бактеріологів і лаборантів) він дає лише 50-70 % позитивних результатів. Окрім діагностики захворювань, бактеріологічне дослідження проводять також для виявлення бактеріоносіїв, особливо серед працівників продовольчих підприємств, дитячих установ і лікарняних закладів. З метою встановлення джерел інфекції визначають фаговари й коліциновари шигел.

Серологічну діагностику дизентерії проводять рідко. Інфекційний процес не супроводжується значним антигенним подразненням, тому титри антитіл у сироватці хворих і реконвалесцентів невисокі. Їх виявляють на 5-8 добу захворювання. Найбільше антитіл утворюється на 2-3-му тижні.

Об'ємну реакцію аглютинації з мікробними діагностикумами ставлять так само, як і реакцію Відаля при черевному тифі і паратифах. Сироватку крові розводять від 1:50 до 1:800. Діагностичним титром антитіл до *S.flexneri* у дорослих хворих вважають 1:200, до *S.dysenteriae* і *S.sonnei* – 1:100 (у дітей відповідно – 1:100 і 1:50).

Більш достовірні результати отримують при постановці РНГА особливо при використанні методу парних сироваток. Діагностичне значення має збільшення титру в 4 і більше разів. Еритроцитарні діагностикуми виготовляють, в основному, з антигенів *S.flexneri* та *S.sonnei*.

Допоміжне значення для діагностики має також постановка алергічної внутрішньошкірної проби з дизентерином Цуверкалова (розчин білкових фракцій шигел Флекснера і Зонне). Вона стає позитивною у хворих на дизентерію, починаючи з 4-го дня. Облік реакції проводять через 24 год. При появі гіперемії і набряку шкіри діаметром 35 мм і більше реакція оцінюється як сильно позитивна, при 20-34 мм – помірна і при 10-15 мм – сумнівна.

Клебсієльози

Клебсієльози – захворювання, які викликають бактерії роду *Klebsiella*. Вони можуть бути гострими і хронічними; гострі викликають *Klebsiella pneumoniae*, *K.oxytoca*, *K.planticola*, *K.terrigena*, хронічні – *K.ozzaena* і *K.rhinoscleromatis*. Найчастіше запальні і септичні процеси викликає *K.pneumoniae* – пневмонії, бронхіти, септицемії, отити, перитоніти, інфекції жовчних і сечовивідних шляхів, харчові токсикоінфекції, госпітальні ранові та опікові інфекції тощо. Значно рідше

зустрічаються такі хронічні хвороби, як смердючий нежить (озена) і риносклерома. Останнім часом резистентні до антибіотиків штами клебсієл можуть стати збудниками внутрішньолікарняних інфекцій.

Основним методом лабораторної діагностики клебсієльозів є бактеріологічне дослідження. Серологічний метод застосовують рідко. Проводять також мікроскопію мазків.

Матеріалом для мікробіологічного аналізу може бути харкотиння, слиз із рото- і носоглотки, промивні води і блювотні маси, гній, кров, ліквор, сеча, жовч, випорожнення, секційний матеріал, інфільтрати слизової при риносклеромі, кірочки при озені, змиви з предметів тощо.

Бактеріоскопія. У мазках, забарвлених за Грамом, капсульні форми клебсієл мають вигляд грамнегативних, еліпсоподібних, товстих паличок довжиною 5-8 мкм і шириною 3-5 мкм (рис. 65). Безкапсульні форми мають менші розміри (0,3-0,6 × 1-3 мкм), поодинокі, парні або ланцюжкове розташування. У гістологічних зрізах із склеромних гранулем видно багато гігантських клітин Мікуліча, наповнених желатиноподібною масою, в якій знаходяться клебсієли, оточені капсулою.

Бактеріологічне дослідження проводять за такою ж схемою, що й при подібних захворюваннях, викликаних іншими видами ентеробактерій. Посів матеріалу роблять на селективне середовище К-2 (МПА з сечовиною, рафінозою, бромтімоловим синім). Через добу на ньому виростають крупні, опуклі, блискучі, слизуваті колонії жовтого, зеленувато-жовтого або голубого кольору. На середовищах Ендо і Плоскирева більшість клебсієл утворюють колонії з металевим блиском, характерні для лактозопозитивних бактерій.

На простому або гліцериновому агарі через 2-4 год вирощування основні види клебсієл утворюють характерні колонії з різною внутрішньою структурою, що виявляють при агар-мікроскопії таких молодих колоній. У *K. pneumoniae* вони мають петлеподібну будову, у *K. rhinoskleromatis* – концентричну, а у *K. ozenae* – розсіяно концентричну. Це дає змогу диференціювати названі види клебсієл між собою.

Зрілі колонії мікроскопують і відсівають на косий агар для виділення чистих культур. Ідентифікацію останніх проводять посівом в середовища строкатого ряду Гісса, жовчний бульйон, визначають рухливість, наявність уреазі. Клебсієли нерухомі, більшість штамів розкладають глюкозу, лактозу, сахарозу, сечовину, дають позитивну реакцію Фогеса – Проскауера, не виділяють сірководень (табл. 42).

І все ж основною й надійнішою є серологічна ідентифікація клебсієл. Для її проведення використовують дві реакції: капсульну аглютинацію на склі з живою культурою і О-аглютинацію. При постановці першої з них на предметне скло наносять діагностичні протиклебсієльозні капсульні

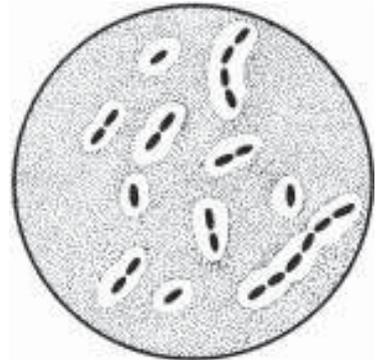


Рис. 65. Клебсієли: мазок із чистої культури.

Таблиця 42

Диференціальні ознаки клебсієл

Вид	Ферментація				Індол	Реакція Фогеса- Проскауера	Утилі- зація цитрату
	Глю- коза	Лак- тоза	Саха- роза	Сечо- вина			
<i>K. pneumoniae</i>	+	+	+	+	-	+	+
<i>K. oxytoca</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>K. planticola</i>	+	+	+	+	±	+	+
<i>K. terrigena</i>	+	+	+	-	-	+	±
<i>K. ozaenae</i>	±	±	+	-	-	-	±
<i>K. rhinoskleromatis</i>	±	-	±	-	-	-	-

сироватки, а також краплю 0,9 % розчину хлориду натрію (контроль). Біля крапель сироваток та ізотонічного розчину розтирають повну петлю досліджуваної культури, змішують їх, добиваючись ретельної гомогенізації. При позитивному результаті утворюється аглютинат у вигляді грубих ниток або тяжів. У контрольній краплі аглютинації не повинно бути.

Для О-аглютинації виділені культури стерилізують в автоклаві протягом 150 хв при 2-ох атм. При цьому руйнується капсула, культура не взаємодіє з К-сироватками і аглютинуються О-сироватками. Простерилізовану культуру потрібно двічі відмити у фізіологічному розчині шляхом центрифугування і з осадом поставити реакцію аглютинації на склі.

Із додаткових методів ідентифікації клебсієл використовують фаготипування. Фаги капсульних бактерій мають чітку видову специфічність. Техніка проведення реакції аглютинації та фаготипування детально викладена в інструкціях до відповідних препаратів.

Визначають також чутливість виділених культур до антибіотиків за допомогою дискодифузійного методу.

Серологічні дослідження проводять шляхом постановки розгорнутої реакції аглютинації з сироваткою крові хворих і капсульним та безкапсульним антигенами, а також зв'язування комплекменту (титр 1:40 і вище) та більш чутливої і специфічної реакції непрямої гемаглютинації з еритроцитарним клебсієльозним діагностиком. Для постановки останньої сироватку хворих розводять у лунках полістиролових планшет від 1:20 до 1:320 в об'ємі 0,25 мл і додають такий же об'єм 1% зависі сенсibiliзованих еритроцитів. Облік результатів проводять через 2 год експозиції планшет при 37 °С. Діагностичний титр 1:160 і вище. Надійніше результати отримують при постановці реакції в динаміці, коли виявляють 4-кратне наростання титру антитіл.

Холера

Холера – гостра, карантинна, особливо небезпечна інфекційна хвороба з фекально – оральним механізмом передачі, характеризується рясним поносом,

блюванням, сильною інтоксикацією та зневодненням організму. Збудниками захворювання є два біовари холерного вібріона *Vibrio cholerae* і *Vibrio eltor*. Обидва відносяться до роду *Vibrio* родини *Vibrionaceae*. Окрім цих збудників, до роду *Vibrio* відносяться також умовно – патогенні вібріони: *V.metschnikovii*, *V.parahaemolyticus*, *V.alginolyticus*, *V.vulnificus*, *V.fluvialis*. За певних умов вони можуть викликати у людини гастроентерити.

Узяття і доставка матеріалів. Для мікробіологічного дослідження стерильною ложкою беруть випорожнення, блювотні маси, промивні води хворого в об'ємі 10-20 мл, переносять їх роздільно у стерильні скляні банки, закривають скляними чи гумовими пробками і заливають парафіном. Найкращі результати дає дослідження проб, взятих до початку антимікробної терапії.

Другу порцію випорожнень і блювотних мас в об'ємі 1-2 мл засівають біля ліжка хворого у 10-50 мл транспортного середовища (1 % пептонна вода рН 7,8 чи рН 9,3). Якщо випорожнень в момент забору матеріалу немає, вирізають забруднені фекаліями ділянки білизни. Досліджують також жовч, узяті за допомогою дуоденального зондування.

Під час епідемічного спалаху холери широко практикують ректальний забір. Для цього стерильний ватний тампон або алюмінієву петлю вводять у пряму кишку на глибину 5-19 см, забирають вміст і вносять у флакон або пробірку з 1 % лужною пептонною водою.

Від трупа беруть невеликі ділянки тонкої кишки з верхнього і нижнього відділу, які перев'язують з обох кінців лігатурами. Забирають також відрізок прямої кишки довжиною 10-15 см. Жовчний міхур вирізають з частиною паренхіми печінки.

При бактеріологічному обстеженні людей, що були в контакті з хворими або вібріоносіями, а також реконвалесцентів перед виписуванням із стаціонару доцільно заздалегідь дати їм проносне, яке одночасно діяло б і як жовчогінне (напр. 25-30 г сульфату магнію). Для дослідження відбирають рідку частину випорожнень, що надійшли з верхнього відділу тонкої кишки і мають вміст жовчного міхура.

За епідеміологічними показниками досліджують воду відкритих водоймищ, водопровідну воду, стічні води, мул, гідробіонтів (риб, жаб, устриць, молюсків, рачків тощо), харчові продукти. Змиви з об'єктів навколишнього середовища відбирають з площі 0,25 м² ватними тампонами, змоченими 1% лужною пептонною водою, і в ній транспортують до лабораторії.

На кожному банку, флакон, пробірку наклеюють направлення, в якому вказують прізвище, ініціали, вік хворого, його домашню і службову адресу, попередній діагноз, дату і час взяття проб, підпис лікаря, що направив матеріали. Відібрані проби потрібно доставити до лабораторії протягом 3-х годин. Якщо це неможливо, матеріал сіють в 1 % пептонну воду з телуритом калію (1:100000) і на чашки з лужним м'ясо-пептонним агаром. При великій віддалі до лабораторії всі проби вміщують у металеві пенали або банки, обмостивши ватою чи стружками. Потім їх пакують у дерев'яний ящик, пломбують, надписують “верх, обережно!” і з великими пересторогами спеціальним транспортом із посланцем доставляють до лабораторії.

Холера – особливо небезпечне захворювання. Тому бактеріологічне дослідження потрібно проводити в режимних лабораторіях, в яких працює спеціально підготовлений персонал. Якщо поблизу такої лабораторії немає, досліджуваний матеріал направляють до найближчої звичайної бактеріологічної лабораторії. Тоді прийом інших аналізів припиняють, встановлюють суворий протиепідемічний режим, персоналу забороняють працювати натщесерце. Лабораторія повинна працювати цілодобово.

Бактеріологічне дослідження. Лабораторна діагностика холери має винятково велике значення, оскільки виділення збудника дає право встановити остаточний діагноз і розгорнути профілактичні заходи для припинення епідемічного розповсюдження захворювання. Окрім того, вона дозволяє виявити вібрионів, оцінити контроль за об'єктами оточуючого середовища і ефективність дезінфекції. Бактеріологічну діагностику проводять поетапно.

Перший етап. Із досліджуваних матеріалів виготовляють мазки, фіксують спиртом або сумішшю Никифорова, забарвлюють за Грамом і мікроскопують під імерсійним об'єктивом. Холерні вібриони виглядають трохи зігнутими паличками червоного кольору, розташованими між тяжами слизу у вигляді своєрідних скупчень, що нагадують “табунці рибок” (рис. 66).

Поряд з типовими вібрионами в мазках часом виявляють кулясті, колбоподібні, спіралеподібні клітини. Це зменшує діагностичну цінність бактеріоскопічного методу. На цьому етапі з метою прискорення дослідження доцільно використовувати реакцію імунофлуоресценції з міченими діагностичними ОІ холерними сироватками та РНГА з антигільним еритроцитарним діагностиком. Використовують і імунотушовий метод: фіксовані мазки обробляють 2 хв у вологій камері тушшю, змішаною з протихолерною сироваткою, промивають і мікроскопують. Холерні вібриони фарбуються в чорний колір.

Для швидкого і надійного виявлення холерних вібрионів у різних об'єктах навколишнього середовища, особливо тих, що погано або зовсім не культивуються, використовують метод полімеразної ланцюгової реакції.

Одночасно з бактеріоскопією проводять посів досліджуваного матеріалу в

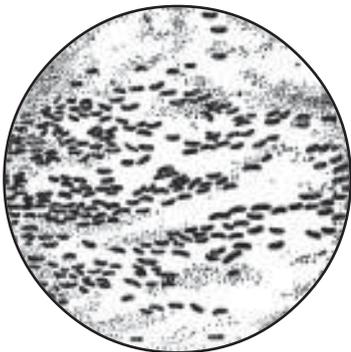


Рис. 66. Холерні вібриони у мазку з випорожнень.

рідкі і на щільні живильні середовища. З рідких середовищ найчастіше використовують 1 % лужну пептонну воду з телуритом калію і середовище Монсура, з щільних – лужний МПА, селективні середовища ТСBS, Аронсона, Монсура. Посіви роблять в 1 % пептонну воду, лужний МПА і на одне з селективних середовищ (краще всього ТСBS). При доставленні матеріалу в транспортному середовищі з нього роблять висів у 50 мл 1 % пептонної води рН 9.3 (середовище збагачення).

Середовище Аронсона: МПА, до якого додають сахарозу і фуксин, знебарвлений сульфідом натрію.

Середовище Монсура: на 1 літр дистильованої води беруть 15 г агар-агару, 1 г желатину, 10 г хлориду натрію, 50 г таурохолату натрію, 30 г карбонату натрію.

Середовище TCBS (тіосульфат-цитрат-бромтимол сахарозний агар) має стандартний склад, випускається в готовому сухому вигляді. На 1 л дистильованої води додають 69 г сухого порошку.

Другий етап. Через 5-6 год інкубації посівів у термостаті виготовляють мазок з поверхні рідкого середовища, висячу краплю для визначення рухливості й проводять орієнтовну реакцію аглютинації на склі з O1 (або RO, O139) діагностичною сироваткою (“слайд-аглютинація”).

Одночасно роблять висів з 1% пептонної води на лужний МПА або інші селективні середовища з метою отримання ізольованих колоній. При відсутності видимого росту в першій пептонній воді проводять висів з неї в другу пептонну воду (в разі первинного посіву в середовище збагачення з рН 9,3 подальший висів з нього проводять через 14-20 г). Посіви в рідкі і на щільні середовища проводять великою бактеріологічною петлею діаметром 5 мм. За результатами дослідження видають попередню відповідь про виявлення холерного вібріона.

Третій етап. Висів із другого середовища збагачення проводять на лужний МПА (або на одне з елективних щільних середовищ) через 5-6 г при рН 7,8 і через 14-20 год при рН 9,3.

Четвертий етап. Через 16-24 год вирощування посівів на щільних елективних середовищах проводять макро- і мікроскопічне дослідження ізольованих колоній та пересів на двовуглеводне середовище Ресселя (лактозно-сахарозний агар) або на тривуглеводне середовище Клігlera (глюкозо-лактозо-сахарозний агар) з метою виділення чистої культури та її ідентифікації.

Колонії холерних вібріонів на лужному МПА в типовій S-формі мають розміри 2-3 мм, круглі, гладенькі, плоскі, голубуваті, прозорі, гомогенні, з рівними краями, маслянистої консистенції, легко знімаються петлею і емульгуються. При посіві матеріалів від хворих, що приймали антибіотики, та віброносіїв, можуть вирости атипові колонії. На агарі Аронсона колонії холерних вібріонів мають яскраво-червоний колір, на середовищі TCBS вони жовті на зеленому фоні, на середовищі Монсура колонії без кольору, напівпрозорі, з темним центром. З колоніями на лужному МПА ставлять пробу на оксидазу, а з тими колоніями, що вирости на елективних середовищах, цю пробу ставити недоцільно.

При відборі колоній використовують індикаторні папірці (СП-1 – набір для ідентифікації вібріонів). Оксидазопозитивні колонії перевіряють в “слайд аглютинації” з холерною сироваткою O1 (RO, O139) в розведенні 1:100 і варіантоспецифічними сироватками Інаба і Огава (1:50) готують мазки для забарвлення за Грамом і обробляють люмінесцентною сироваткою. Позитивні результати дають право видати попередню відповідь про виявлення холерного вібріона.

П'ятий етап. Досліджують характер росту на полівуглеводних середовищах. Холерний вібріон на агарі Ресселя змінює колір стовпчика при збереженні первісного кольору скошеної частини без утворення газу. Середовище Клігlera жовтіє повністю без утворення газу і сірководню. Культури перевіряють за морфологіч-

ними і аглютинабельними властивостями, а в разі потреби визначають групу за Хейбергом (табл. 43).

Таблиця 43

Біохімічна характеристика за Хейбергом

Вуглеводи	Г р у п и							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Манноза	+	-	+	-	+	-	+	-
Сахароза	+	+	+	+	-	-	-	+
Арабіноза	-	-	+	+	-	-	+	-

Ставлять також розгорнуту об'ємну реакцію аглютинації в пробірках за загальноприйнятою методикою відповідно з інструкцією до діагностичної сироватки. При відсутності реактивів на оксидазу можна використати пробу “тяжа”. На предметне скло наносять краплю 0,5% водного розчину дезоксихолату натрію або 2,5% розчину миючого засобу “Прогрес”, додають повну петлю агарової культури досліджуваних вібріонів і ретельно перемішують. При позитивній реакції суспензія негайно втрачає мутність, стає слизовою і в'язкою – тягнеться за петлею у вигляді тяжа, що характерно для вібріонів.

Останнім часом розроблені тести для диференціації класичного варіанту холерного вібріона від біовару ельтор (табл. 44).

Таблиця 44

Основні відмінності між *V. cholere* і *V. eltor*

Тести	<i>V. cholere</i>	<i>V. eltor</i>
Гемоліз еритроцитів барана	∓	±
Аглютинація курячих еритроцитів	∓	±
Ріст на агарі з поліміксином (30 од/мл)	-	+
Лізис холерним фагом С	+	-
Лізис фагом Ельтор-2	-	+
Реакція Фогеса-Проскауера	-	+

Чутливість виділених культур холерних вібріонів до антибіотиків та хіміотерапевтичних препаратів визначають за допомогою методу дифузії в агар з використанням стандартних дисків або методом серійних розведень.

Шостий етап. Остаточню враховують результат ідентифікації чистих культур і видають остаточну відповідь про виділення холерного вібріону серогрупи: O1, RO (Інаба, Огава, Гікошима) або O139. Якщо виділені вібріони за більшістю ознак відносяться до холерних, але не аглютинуються сироватками, видають відповідь про виділення холерних вібріонів не O1 групи (так званих НАГ-вібріонів). Обов'язково відмічають гемолітичну активність, чутливість до антибіотиків і лізис культури відповідним бактеріофагом.

Методи прискореної діагностики. Найкращим є люмінесцентно-серологічний метод, він дає можливість через 1,5-2 год виявити холерних вібріонів у досліджуваному матеріалі, а також у середовищі після підрошування в кількості 10^6

мікробних клітин в 1 мл. Методика виготовлення мазків, обробка люмінесцентною сироваткою, мікроскопія та оцінка результатів є загальною для виявлення всіх видів бактерій. Вона викладена в інструкції, що додається до сироватки.

За допомогою методу іммобілізації вібріонів під впливом специфічної холерної O1 сироватки можна виявити збудника протягом 15-20 хв при концентрації його в досліджуваному матеріалі не менше ніж 10^5 мікр.тіл/мл. На предметне скло наносять 2 краплі рідких випорожнень, блювотних мас або верхнього шару (плівки) з середовища накопичення. Першу краплю накривають покривним скельцем (контроль), до другої додають краплю холерної O1 сироватки (1:100), перемішують і також накривають покривним скельцем. Надавлені краплі досліджують під фазово-контрастним мікроскопом або використовують темнопольний конденсор. При наявності в пробах холерних вібріонів у першій краплі видно характерний рух, у другій – іммобілізація мікробних тіл та їх аглютинація.

Для прискореної діагностики застосовують також чутливу реакцію непрямой гемаглютинації з використанням холерного антитільного еритроцитарного діагностичного.

Метод масового дослідження на вібрионосійство проводять під час епідемічних спалахів холери. Випорожнення одночасно забирають з прямої кишки алюмінієвими петлями від 10 чоловік, раціонально згрупованих, і вносять їх в одну колбу з 200 мл лужної пептонної води і O1 холерною аглютинуючою сироваткою, розведеною до половини титру. Інкубацію проводять при 37°C протягом 3-4 годин. Холерні вібріони, що розмножились, починають аглютинуватись і у вигляді пластівців опадають на дно колби. При позитивному результаті матеріал забирають від кожної з 10 осіб і досліджують роздільно. Такий метод дає значну економію живильних середовищ і робочого часу бактеріологів.

Серологічні дослідження мають лише допоміжне значення і зводяться до визначення в сироватці хворих і вібрионосійів вібриоцидних антитіл, аглютининів та антитоксинів. Від хворих потрібно брати парні сироватки з інтервалом у 8-10 днів (першу пробу беруть на 3-5 день хвороби).

Найбільш чутливою є реакція визначення вібриоцидинів. Ці антитіла визначаються з 3-го дня захворювання в титрах 1:100-1:1000 і максимально нарастають до 10-12-го дня. При постановці реакції спочатку ізотонічним розчином хлориду натрію розводять комплемент 1:20 і розливають його в ряд пробірок по 0,9 мл. Потім в першу пробірку вносять 0,1 мл сироватки хворого, перемішують і послідовно переносять по 0,1 мл до розведення 10^{-10} , отримуючи десятикратні розведення в об'ємі 0,9 мл. У кожну пробірку додають по 0,1 мл суспензії культури холерного вібріона, в якій міститься 1-2 тис. мікробних клітин. Реакцію супроводжують відповідними контролями комплекменту, сироватки і культури. Пробірки витримують при 37°C протягом 60 хв і роблять висіви з них на сектори агару в чашках Петрі, інкубують у термостаті 18-20 год і підраховують кількість вирощених колоній. Титром вібриоцидних антитіл вважають максимальне розведення сироватки, яке спричиняє загибель не менше 50 % вібріонів у порівнянні з кількістю колоній, що вирости після висіву з пробірки контролю комплекменту.

Протихолерні аглютиніни виявляють за допомогою розгорнутої реакції аглютинації. Досліджувану сироватку розводять 1% лужною пептонною водою в об'ємі 1 мл від 1:10 до 1:640. Антигеном служить 3-годинна бульйонна культура холерного вібріона, який виділили в даному вогнищі. У два ряди пробірок з розтитрованими парними сироватками вносять по 1 краплі культури і ставлять на 60 хв у термостат при 37 °С, потім до ранку в холодильник, після чого враховують результати. Реакцію супроводять, як звичайно, контролями сироватки і антигена. Результат вважають орієнтовно позитивним при аглютинації першою сироваткою в розведенні 1:40 і вище. Діагностичне значення має не менше ніж 4-кратне наростання титру антитіл у реакції з другою сироваткою.

Більш чутливою і специфічною вважають двокомпонентну реакцію непрямой гемаглютинації з еритроцитарним холерним діагностиком. Необхідні компоненти реакції та методика її постановки в макро- та мікрооб'ємах наведені в інструкції до діагностикому. Обов'язково потрібно ставити і цю реакцію методом парних сироваток. Діагностичне значення має принаймні 4-кратне наростання титру антитіл у динаміці.

Визначення антитоксинів у сироватці крові проводять за допомогою непрямой гемаглютинації. Досліджувану сироватку розводять мікро- або макрооб'ємним способом і додають еритроцитарний холерний ентеротоксичний діагностиком. Діагностичним титром вважають розведення сироватки 1:160. Доцільно досліджувати парні сироватки.

Дослідження матеріалів довкілля. Найчастіше досліджують воду відкритих водоймищ, водопровідну воду, гідробіонтів, харчові продукти, мух, змиви з різних предметів.

У досліджувану воду (дві проби по 500 мл) додають розчин основного пептону до 1% концентрації, інкубують 5-8 год при 37 °С і досліджують поверхневу плівку так само, як і плівку з пептонної води після посіву випорожнень чи блювотних мас. Надійніші результати отримують при використанні методу фільтрації через мембранні фільтри № 2 або 3, змиви з яких після фільтрування води засівають у лужну пептонну воду і на селективні середовища. При цьому досліджують великі кількості води (1,5-2,5 л). Із змиву з фільтрів можна також робити мазки для забарвлення їх люмінесцентною холерною сироваткою, а також ставити реакцію непрямой гемаглютинації.

Від гідробіонтів після їх розтину сіють жовчний міхур, шлунок і кишечник (після їх гомогенізації) в 1% лужну пептонну воду і на елективний агар. Дафній і рачків розтирають у ступці і засівають петлею в 1 % пептонну воду.

Тверді харчові продукти подрібнюють, розтирають у ступці з ізотонічним розчином хлориду натрію і засівають у кількості 10 г у 50-100 мл 1 % пептонної води та на агарові середовища. Молоко і молочні продукти, змиви з об'єктів довкілля та мух засівають в 1% пептонну воду і досліджують за звичайною схемою.

У різних об'єктах навколишнього середовища можуть знаходитись і інші представники родини *Vibrionaceae*, морфологічно подібні до вібріонів. Особливо це стосується родів *Aeromonas*, *Pseudomonas* і *Plesiomonas*. Відрізнити їх від хо-

лерних і холероподібних вібріонів можна, в основному, за біохімічними тестами (табл. 45)

Таблиця 45

Диференціація вібріонів від інших споріднених родів

Рід	Оксидаза	Жела- тиназа	Ферментація				Тест “тяжа”
			Глюкози	Манози	Маніту	Інозиту	
<i>Vibrio</i>	++++	+	+	+	+	-	+
<i>Aeromonas</i>	++++	+	+	+	+	-	±
<i>Pseudomonas</i>	++	±	-	-	-	-	-
<i>Plesiomonas</i>	++	-	-	-	-	+	-

Для видової ідентифікації холерних вібріонів провідними тестами є аглютинація культури O1 холерною сироваткою, лізис холерним фагом С IV або eltor 2.

Кампілобактеріози і гелікобактеріози

Інфекційні захворювання, що спричиняють бактерії роду *Campylobacter*, дістали загальну назву кампілобактеріози. Вони мають гострий перебіг, супроводжуються гарячкою, ураженням шлунка і кишечника і з кожним роком зустрічаються все частіше. Серед 13 видів кампілобактерій найголовнішими є: *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*. У 1991 р. виділено окремий вид *Helicobacter pylori*. Його стабільно виявляють у хворих на виразку шлунка, гастрит і дуоденіт. Цим захворюванням дали загальну назву гелікобактеріози.

Окрім ентеритів і ентероколітів, цих найчастіших кампілобактеріозів, значно рідше зустрічаються септицемії, ендокардити, перикардити, менінгіти, ураження сечостатевої системи. У вагітних жінок можливі аборти, передчасні роди, інфікування новонароджених під час пологів.

У зв'язку з тим, що клінічна картина цих захворювань не має характерних симптомів і подібна до викликаних іншими бактеріями, лабораторні дослідження набувають важливого значення. Для діагностики широко використовують мікроскопічний, бактеріологічний і дещо менше серологічний методи.

Матеріалом для дослідження служить кров, ліквор, випорожнення або вміст прямої кишки, взятий за допомогою ректальних тампонів, плацентарна і навколоплідна рідина, вміст абсцесів, біоптати слизової оболонки шлунка і 12-палої кишки. Досліджують також воду, молоко, інші харчові продукти, змиви з предметів тощо.

Бактеріоскопічний метод використовують для швидкої ідентифікації кампіло- і гелікобактерій. Тонкі мазки з фекалій або інших клінічних матеріалів фіксують на вогні, забарвлюють фуксином Пфейфера протягом 10-20 с і промивають водою. Оскільки для забарвлення інших бактерій потрібно 3-5 хв, то протягом 10-20 сек встигають зафарбуватись лише кампілобактерії. Особливо чітко їх типові форми виявляють при забарвленні кристалічним фіолетовим. Під звичайним світловим мікроскопом вони виглядають як тонкі, спірально зігнуті бактерії, що мають



Рис. 67. Кампілобактерії.

один повний завиток, С- і S- подібну форму або нагадують крила чайки. *Helicobacter pylori* має дещо більші розміри. Можна також використати фазово-контрастну мікроскопію суспензії випорожнень у бульйоні для культивування бруцел або рідкому середовищі Мюллера-Хінтона (МПБ з крохмалем і казеїном). При цьому виявляють не тільки типові особливості морфології кампілобактерій, а й дуже характерну їх рухливість (рис. 67).

Бактеріологічний метод. Оптимальні результати отримують, коли матеріал беруть у транспортне тіогліколеве середовище і в ньому доставляють до лабораторії. Якщо ж посіви роблять не пізніше 24 год, транспортне середовище не використовують.

Для виділення кампіло- і гелікобактерій найчастіше застосовують середовище Бутцлера (до кров'яного агару додають цефоперазон – 30 мг/л, рифампіцин – 10 мг/л і амфотеріцин В – 2 мг/л). Антибіотики пригнічують ріст супутньої мікрофлори. Посіви інкубують в атмосфері 10 % CO₂ при температурі 25 °С, 37 °С і 42 °С протягом 24-72 год.

Кампілобактерії утворюють два типи колоній: 1) правильної круглої форми з рівними краями діаметром 1-2 мм, блискучою опуклою поверхнею, прозорі, гомогенні; 2) неправильної округлої форми діаметром 2-8 мм, безбарвні або світло-сірого кольору, прозорі, нагадують краплі води.

При посіві кількісним методом ріст колоній, як правило, виявляють на третьому і четвертому квадрантах, але потрібно ретельно оглядати всю чашку, оскільки вони можуть вирости лише на першому квадранті в оточенні колоній супутньої фекальної мікрофлори.

Ідентифікація колоній кампіло- і гелікобактерій не викликає труднощів для досвідченого бактеріолога. Типові колонії досліджують мікроскопічно, забарвлюючи препарати за Грамом. У мазках збудники мають вигляд тонких, зігнутих, частіше спіралеподібних клітин, можуть мати один і більше витків і досягати в довжину до 8 мкм. У культур, які вирощували протягом 72 год і довше, клітини можуть набувати кокоподібної форми, що може привести до помилок в ідентифікації. Потім виділяють чисту культуру, яку ідентифікують за рядом ознак: виділення оксидази, каталази, уреаз, ріст при температурі 25 °С, 37 °С і 42 °С, гідроліз гіпсурату, відновлення нітратів, чутливість до цефалотину (табл. 46).

Для серотипування кампіло- і гелікобактерій використовують реакцію аглютинації зі стандартними діагностичними сироватками і суспензією прогрітих культур. Хороші результати типування отримані також в реакціях коаглютинації, латекс-аглютинації і непрямой гемаглютинації. Встановлено 50 серотипів *S. jejuni* і 20 серотипів *S. coli*, але їх кількість з року в рік зростає. Ще точніші результати серотипування отримані при використанні методу імуоферментного аналізу. Зокрема, розроблена надійна тест-система для визначення антигенів *H. pylori* в біоптатах слизової оболонки шлунка і кишечника.

Таблиця 46

Диференціальні ознаки кампілобактерій і гелікобактерій

Вид	Оксидаза	Каталаза	Уреаза	Ріст при			Гіппурат- Na	Цефалотин
				25 °С	37 °С	42 °С		
<i>C. jejuni</i>	+	+	-	-	+	+	+	Р
<i>C. fetus</i>	+	+	-	+	+	-	-	Ч
<i>C. coli</i>	+	+	-	-	+	+	-	Р
<i>C. lari</i>	+	+	-	-	+	+	-	Р
<i>H. pylori</i>	+	+	+	-	+	-	-	Ч

Примітка: “+” – позитивна ознака; “-” – негативна ознака; Р – резистентні; Ч – чутливі

Серологічний метод діагностики захворювань проводять значно рідше. Він відіграє важливу роль при масових епідеміологічних обстеженнях в ряді країн американського і африканського континентів. В Україні такі дослідження поки що не проводились.

Для виявлення антитіл можна використовувати практично всі серологічні тести. Але перевагу віддають реакції непрямой імунофлуоресценції та методу імуноферментного аналізу. Можна застосовувати і реакції звичайної аглютинації, латекс-аглютинації та непрямой гемаглютинації. Є повідомлення про використання імуноблотінгу та радіоімунного методу для визначення антитіл до *C. jejuni* і *H. pylori*. Вони мають винятково високу чутливість, але досить дорогі і широкого вжитку не набудуть.

Чума

Чума – гостра, зоонозна особливо небезпечна, карантинна інфекційна хвороба з ураженнями шкіри, лімфатичних вузлів, легень, геморагічною септицемією й інтоксикацією. Збудник чуми – *Yersinia pestis* – належить до роду *Yersinia* родини *Enterobacteriaceae*. До цього роду входять ще два патогенних для людини види ієрсиній: *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*. Крім трьох основних збудників ієрсиніозів виділяють ще 8 видів, які в інфекційній патології людини значення не мають, правда, окремі з них можуть зрідка викликати опортуністичні інфекції.

Джерелом чуми в природі є різні види диких і домашніх тварин, гризунів, а переносниками – їх блохи. Проникаючи в людську спільноту, чумна інфекція може стати антропонозом, який розповсюджується у вигляді епідемій і пандемій.

Збудник чуми має кілька антигенів, із них найбільш вивчені D-, F1-, T-, V-, W. Але серологічне його типування розроблено ще недостатньо і в рутинній лабораторній практиці не використовується.

Мікробіологічне дослідження проводиться з метою діагностики захворювання, виявлення інфікування тварин і переносників в ендемічних осередках та встановлення контамінації ієрсиніями різних об'єктів оточуючого середовища. При цьому використовують бактеріоскопічний, бактеріологічний, біологічний і серологічний методи, а також алергічну пробу з пестином для ретроспективної діагнос-

тики. Перший випадок захворювання на чуму у людини повинен бути обов'язково підтверджений виділенням збудника.

Взяття матеріалу для дослідження як і всі етапи виділення збудника та роботи з гризунами чи лабораторними тваринами проводять у протичумних костюмах першого типу. В лабораторії потрібно створити суворий протиепідемічний і дезінфекційний режими, які регламентовані спеціальними інструкціями. Залежно від клінічної форми чуми, від хворого беруть такі матеріали: виділення з виразки або карбункула (шкірна форма); пунктат із бубону (бубонна форма), кров (при всіх формах), фекалії та спинномозкову рідину (при ураженнях кишечника або мозкових оболонок). Матеріал важливо взяти до початку антибіотикотерапії. При направленні секційного матеріалу беруть кров, кістковий мозок, шматочки паренхіматозних органів. Крім того, до лабораторії доставляють живих і загиблих гризунів, бліх, харчові продукти, воду. В окремих випадках досліджують повітря, змиви з поверхні об'єктів.

Взятий матеріал вміщують у скляні банки з притертими пробками, обгортають вощаним папером, зовні їх обтирають 5 % розчином лізолу, наклеюють етикетку, на якій вказують дату, місце, характер матеріалу, прізвище хворого, діагноз. Банки щільно вкладають у герметичну тару, надписують "верх" і направляють службовим транспортом із довіреною особою до найближчої протичумної установи або лабораторії для діагностики особливо небезпечних інфекцій. Персонал, що проводив забір матеріалу, підлягає повній санітарній обробці.

Бактеріоскопія. З досліджуваного матеріалу в лабораторії виготовляють 5-6 мазків, фіксують їх етанолом або сумішшю спирту й ефіру протягом 15-20 хв. Один мазок забарвлюють за Грамом, другий – метиленою синькою, третій – міченою люмінесцентною сироваткою проти *Y. pestis* (пряма РІФ), 2-3 мазки залишають у резерві. Виявлення в мазках характерних, біполярно забарвлених, овоїдних, грамнегативних бактерій (рис. 68; див. вкл., рис. 15), які дають до того ж специфічне люмінесцентне світіння у вигляді яскравого зеленуватого ореолу навколо клітин, при характерних клінічних симптомах та врахуванні епідеміологічної ситуації, дає право поставити попередній діагноз чуми.

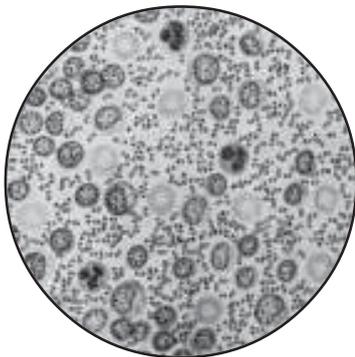


Рис. 68. Збудник чуми у мазку з бубону.

Бактеріологічне дослідження. Незважаючи на характерну клінічну картину захворювання, бактеріологічну діагностику треба проводити обов'язково в усіх випадках. Для посівів використовують високопоживні середовища з додаванням стимуляторів росту, хоч палички чуми невибагливі до живильних середовищ. Досліджувані матеріали, не контаміновані сторонньою мікрофлорою (кров, пунктат бубонів, ліквор), сіють у флакони, що містять 50-100 мл МПБ і паралельно в чашки з МПА або агаром Хотінгера. Матеріал, забруднений супутньою флорою, висівають на МПА з сульфідом натрію, середовища Туманського (МПА з 1 % гемо-

лізованої крові та генціановим фіолетовим в концентрації 1:100000-1:400000) або Коробкової (0,15 % напіврідкий агар з 0,3 % гемолізованої крові та генціановим фіолетовим 1:200000). Для інактивації чумного фагу на поверхню щільних середовищ наносять і рівномірно розподіляють 0,1 мл антифагової сироватки. Посіви вирощують при 28 °С і 37 °С.

Через 18-20 год на рідких середовищах появляється плівка із спущеними до низу ниткоподібними утвореннями, подібними до сталактитів, на дні утворюється пухкий осад. Розвиток колоній на щільних середовищах проходить три стадії. Через 10-12 год під мікроскопом ріст нагадує скупчення безбарвних пластинок (стадія “битого скла”). Пізніше (18-20 год) утворюються колонії з опуклим каламутно-білим центром, оточеним фестончастою каймою (стадія “мереживної хустинки”). Через 40-48 год настає фаза “дорослих колоній” із буруватим центром і зазубреною периферичною зоною (рис. 69).

Із типових колоній готують мазки, забарвлюють за Грамом і метиленовим синім, роблять пересів на скошений агар (або бульйон) для виділення чистої культури. Наступного дня, переконавшись що культура чиста, приступають до її ідентифікації. Для цього проводять реакцію аглютинації і преципітації з діагностичними антисироватками проти соматичного і капсульного антигенів, ставлять РНГА з ліофілізованими еритроцитарними антитільними діагностикумами, пробу на лізис чумним бактеріофагом і заражають чистою культурою гвінейських свинок. Обов'язково визначають антибіотикочутливість дискодифузійним методом на агарі або методом серійних розведень у бульйоні.

Чисту культуру засівають в середовища Гісса для визначення ферментативних властивостей. Збудник чуми розкладає до кислоти глюкозу, маніт, галактозу, левульозу, ксилозу, окремі штами ферментують арабінозу і гліцерин.

Свіжовиділені штами не розкладають адоніт, рамнозу і сахарозу, не виділяють оксидазу, уреазу, але мають фермент каталазу, не згортають молоко, не утворюють індол. Необхідно провести диференціацію *Y. pestis* від інших ієрсиній (табл. 47).

Визначальними ознаками при ідентифікації збудника чуми є аглютинація культури антисироватками, лізис чумним бактеріофагом і позитивна біопроба.

Біологічне дослідження при діагностиці чуми є обов'язковим. Біологічну пробу ставлять як із первинним матеріалом, так і з виділеною чистою культурою. Для зараження використовують гвінейських свинок, рідше – білих мишей. Якщо матеріал не контамінований супутньою мікрофлорою (кров, пунктат бубону), його вводять підшкірно або внутрішньоочередово. При забрудненні матеріалу сторонньою флорою зараження проводять шляхом втирання емульгованого матеріалу в депільовану і скарифіковану шкіру живота гвінейської свинки. При пози-



Рис. 69. Колонії *Y. pestis*.

Таблиця 47

Диференціація збудників чуми, псевдотуберкульозу і кишкового ієрсиніозу

Ознаки	<i>Yersinia pestis</i>	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
Рухливість	–	+	+
Ферментація адоніту	–	+	–
Ферментація рамнози	–	+	–
Ферментація сахарози	–	–	+
Лізис чумним фагом	+	–	–
Утворення H ₂ S	+	+	+
Плазмокоагулаза	+	-	-
Каталаза	+	+	+
Уреаза	–	+	+
Колонії на цитратному дезоксицхолевому агарі	червоні	жовті	жовті

тивній біопробі тварини гинуть через 2-3 дні при зараженні в черевну порожнину, або через 5-7 днів – при нанесенні матеріалу на шкіру. Роблять розтин загиблих свинків, вивчають патологоанатомічні зміни: гіперемія судин, збільшення печінки, селезінки, лімфатичних вузлів, наявність на їх поверхні та на розрізі некротичних ділянок. Із крові і паранхіматозних органів роблять мазки і мазки-відбитки, проводять висіви на живильні середовища. У мазках виявляють величезну кількість біполярно забарвлених грамнегативних овоїдних паличок. Виділені від тварин чисті культури ідентифікують так само, як і культури після бактеріологічного дослідження. Трупні гвінейських свинків, як і досліджуваних диких гризунів, занурюють у 5 % розчин лізолу, а потім спалюють.

Серологічна діагностика чуми не набула широкого використання. Останнім часом проводять постановку РНГА з еритроцитарним діагностикумом, на якому адсорбований капсульний антиген *Y. pestis*. Діагностичним титром вважають розведення сироватки 1:40. Взагалі ж серологічні реакції проводять здебільшого з метою ретроспективної діагностики та при масових епізоотичних обстеженнях гризунів в ендемічних осередках чуми.

Прискорені методи діагностики. Запропоновані експресні методи виявлення збудника чуми за допомогою флуоресцюючих антитіл, в РНГА з використанням антитільних еритроцитарних діагностикумів. Вони дають змогу виявити *Y. pestis* у досліджуваному матеріалі через 2 год.

До прискорених методів діагностики відносять також реакцію преципітації в стандартних агарових пластинках з протичумною сироваткою та метод швидкого росту збудника чуми на елективному середовищі з використанням бактеріофага. Для цього 0,2-0,3 мл матеріалу сіють в 4 пробірки з середовищем Коробкової і 0,1 мл на агар в чашці Петрі. В одну з пробірок вносять 0,2-0,3 мл чумного фага. Посіви інкубують при 28 °С протягом трьох годин. Із пробірок, в яких видно ріст, готують 2 мазки, забарвлюють за Грамом і метиленовим синім. При позитивному результаті в мазках видно ланцюжки грамнегативних овоїдних паличок, забарвлених біполярно. У пробірці з фагом росту немає. Із пробірки з ростом по 0,4 мл

матеріалу вводять у черевну порожнину декількох мишей. Через 8-10 год проглядають чашки з агаром для виявлення росту збудника чуми.

Через 10-12 год забивають мишей, від них сіють ексудат і матеріал із паренхіматозних органів у пробірки з напіврідким агаром і досліджують так само, як вище описано. Отже, попередній результат отримують через 4 год, а остаточний – через 18-20 год.

Для ретроспективної діагностики чуми часом використовують алергічну пробу з пестином.

Псевдотуберкульоз

Псевдотуберкульоз – гостра інфекційна хвороба з групи бактерійних зоонозів, характеризується гарячкою, поліморфним висипом, гепатолієнальним синдромом, ураженнями травного каналу, суглобів, лімфатичної системи. Збудник – *Yersinia pseudotuberculosis*. Псевдотуберкульозні бактерії мають соматичні О-антигени і джгутикові Н-антигени, поділяються на 13 сероварів і підсероварів. Захворювання у людей найчастіше викликають ієрсинії сероварів I, III, IV. Основним резервуаром і джерелом інфекції для людини є дикі і синантропні гризуни, з виділеннями яких ієрсинії потрапляють на різноманітні продукти харчування. Основний шлях передачі збудників псевдотуберкульозу аліментарний, хоч не можна виключити і респіраторне інфікування. Зараження відбувається після вживання контамінованих ієрсиніями продуктів, що зберігалися при низьких температурах (4-12 °С) в холодильниках і овочесховищах. В силу своєї психрофільності при таких умовах бактерії можуть розмножуватись і нагромаджуватись у харчових субстратах.

При лабораторній діагностиці псевдотуберкульозу використовують бактеріологічний, серологічний, біологічний і алергічний методи. Матеріалом для дослідження служить кров, пунктат із лімфатичних вузлів, змиви з носоглотки, харкотиння, блювотні маси, кал, сеча, жовч.

Бактеріологічне дослідження. Первинну бактеріоскопію можна використати лише при дослідженні пунктатів лімфовузлів або органів від трупа. Мазки-відбитки краще забарвлювати за методом Грама і Романовського-Гімзи. Цей метод самостійного діагностичного значення не має і є допоміжним. Він орієнтує бактеріолога на вибір живильних середовищ.

Посіви досліджуваних матеріалів роблять на середовище Ендо та Серова (100 мл 1 % ПВ, 1 мл індикатора фенолрот, 0,75 г глюкози, рН 7,4-7,6) інкубують при 37 °С 48-72 год. Посіви на середовище Серова витримують 15-20 діб у холодильнику з наступним висівом на диференціальні середовища. Підозрілі колонії дрібні, круглі, опуклі, безбарвні досліджують мікроскопічно й пересівають на середовище Олькеницького. Колонії *Y. pseudotuberculosis* у R-формі майже такі самі, як у збудника чуми, але в своєму розвитку не мають стадії “битого скла”. Ідентифікують культури за звичайною схемою (посів на середовище Гісса, фаголізис, визначення серотипів за допомогою діагностичних аглютинуючих сироваток). Диференціацію з іншими ієрсиніями проводять за додатковими тестами (табл. 47).

Для серологічної діагностики псевдотуберкульозу ставлять розгорнуту об'ємну реакцію аглютинації (подібно до реакції Відаля) з відповідними діагностичними. Антитіла в крові хворих накопичуються на другому тижні хвороби. Діагностичний титр 1:200 і вище. Ще кращі результати дає постановка РНГА з антигенним еритроцитарним діагностиком. Позитивною цю реакцію вважають при титрі антитіл 1:400 і вище. Розроблена також схема постановки реакції ензиммічених антитіл з використанням полістирилових планшет з адсорбованим на твердій фазі антигеном.

Біологічну пробу краще проводити на гвінейських свинках, оскільки ієрсинії, виділені від людини, мало патогенні для мишей. Заражені свинки гинуть через 4-12 днів. У тварин досліджують мазки – відбитки з органів і роблять посіви на живильні середовища з наступною ідентифікацією виділених культур.

Алергічну пробу ставлять, починаючи з другого тижня захворювання. Стан сенсibiliзації розвивається з 7-20-го дня і зберігається протягом 2-5 років. Алерген вводять внутрішньошкірно в об'ємі 0,1 мл. Облік реакції проводять через 48 год. При позитивній пробі виникає почервоніння й інфільтрат, які часом сверблять і болючі.

Кишечний ієрсиніоз

Ієрсиніоз кишечника викликає *Yersinia enterocolitica*. Захворювання характеризується гарячкою, переважним ураженням травного каналу, токсико-алергічними проявами, різноманітністю клінічних форм. Зараження людини настає аліментарним шляхом через харчові продукти і воду, контаміновані виділеннями хворих тварин. Джерелом інфекції для людини є хворі на ієрсиніоз гризуни і синатропні тварини (корови, свині, кози, телята, коні). Це захворювання має місце у більшості країн світу, але найчастіше зустрічається у скандинавських країнах. В Україні спостерігаються спорадичні випадки.

Антигенна структура *Y. enterocolitica* складна. За характером О-антигену розрізняють 34 серовари. Переважна більшість культур, виділених від хворих людей, відносяться до сероварів 03, 05, 08, 09.

Мікробіологічна діагностика кишечного ієрсиніозу багато в чому подібна до бактеріологічних досліджень при псевдотуберкульозі. При підозрінні на це захворювання обов'язково досліджують кров, випорожнення, блювотні маси, дуоденальний вміст, сечу, ліквор. При оперативних видаленнях червоподібного відростка та лімфатичних вузлів посіви роблять з цих емульгованих органів. Якщо на початку хвороби є запалення глотки і мигдаликів, досліджують слиз із носоглотки.

Посіви роблять на щільні диференціально-діагностичні агарі Ендо або Плоскирева та середовище збагачення (селенітовий бульйон). Для виділення *Y. enterocolitica* із фекалій зарубіжні фірми пропонують щільні селективні середовища, що містять цефсулодин, іргазан і новобіоцин (CIN-агар) та агар Мак Конкі.

Оптимальна температура для культивування 28-30 °С. На цих середовищах колонії дрібні, блискучі, часто опуклі, мають голубуватий відтінок. На агарі Ендо

мають слабо рожеве забарвлення. R-форми колоній для цього виду ієрсиній не характерні.

Ізольовані колонії досліджують мікроскопічно, на рухливість при 25 °С, відсівають на середовище Олькеницького й ідентифікують так само, як і *Y. enterocolitica*.

Для серологічної діагностики кишечного ієрсиніозу використовують реакцію об'ємної аглютинації, РНГА, метод ІФА. Важливо ставити ці реакції з парними сироватками. Наростання титру антитіл в 4 рази і більше свідчить про специфічність інфекційного процесу.

Можлива також постановка алергічної проби з діагностичною метою і експериментальне зараження лабораторних тварин.

Туляремія

Туляремія – гостра інфекційна хвороба з природною вогнищевістю, характеризується гарячкою, ураженням лімфатичних вузлів, шкіри, мигдаликів, легень, очей та інших органів. Збудник захворювання *Francisella tularensis*. Туляремійні бактерії в S-формі мають два антигени – O і Vi (капсульний). O-антиген виявляє спорідненість до антигенів бруцел. Розрізняють три підвиди збудника туляремії: голарктичний (для країн північного регіону), неарктичний (американський) і середньоазіатський. Резервуаром і джерелом інфекції є різні види диких і домашніх гризунів (ондатри, водяні пацюки, зайці, миші, хом'яки та ін.), а також свійські тварини (свині, вівці, корови). Людина заражується тільки від тварин, від людини до людини збудник не передається.

Зараження відбувається контактно-побутовим шляхом (при контакті з хворими тваринами і їх виділеннями); аліментарним (при вживанні інфікованих продуктів харчування і води); повітряно-пиловим (під час обмолоту зернових, обробки фуражу тощо); трансмісивним (через укуси кровосисних комах). Для людини мінімальна інфікуюча доза – одна мікробна клітина.

При проведенні діагностики туляремії використовують бактеріологічний, біологічний, серологічний і алергічний методи. Перевагу надають серологічним реакціям і алергічним пробам, які можна провести в будь-яких клінічних і мікробіологічних лабораторіях. Зараження лабораторних тварин і виділення чистих культур можливе тільки в лабораторіях для діагностики особливо небезпечних інфекцій.

Залежно від клінічної форми туляремії, у хворих беруть такі матеріали для дослідження: слиз із ротоглотки, пунктат бубону, харкотиння, кров, гній із кон'юнктиви, вміст пустул і виразок. Досліджують також органи загиблих гризунів, воду, повітря, кровосисних комах, харчові продукти, контаміновані виділеннями тварин і гризунів. Взяття матеріалу та його доставка до лабораторії здійснюється при суворому дотриманні правил роботи із збудниками особливо небезпечних інфекцій.

Біологічне і бактеріологічне дослідження. Бактеріологічний метод діагностики туляремії має важливу особливість – виділити збудник в перших генераціях безпосередньо від хворого майже ніколи не вдається. Тому досліджуваним матері-

алом спочатку заражають гвінейських свинок (краще) або білих мишей, а потім від них виділяють та ідентифікують чисту культуру. Цей метод є самим чутливим для виявлення туляремійних бактерій у будь-якому матеріалі. DLM для цих тварин – одна мікробна клітина.

Заражають дві гвінейські свинки або 3-5 білих мишей. Тварини гинуть на 5-14 добу. Якщо вони залишаються живими, їх забивають, роблять розтин; кров, кістковий мозок, емульговані лімфатичні вузли і паренхіматозні органи сіють на згорнуте жовткове середовище Мак-Коя і Чепіна або глюкозо-цистиновий кров'яний агар Френсіса. При необхідності до середовищ додають 100 ОД пеніциліну для пригнічення росту сторонньої мікрофлори. Запропоновано також рідке елективне середовище з амінокислотами, вітамінами, мікроелементами. На простих середовищах збудник туляремії не росте. Туляремійні бактерії можна також виділити шляхом зараження в жовтковий мішок курячих ембріонів, де їх легко виявити за допомогою методу імунної флуоресценції. Посіви вирощують у термостаті протягом 3-5 днів при температурі 37 °С. Паралельно з посівами з тих же матеріалів загинувших тварин готують мазки-відбитки й забарвлюють їх за методом Романовського-Гімзи. Збудники туляремії мають вигляд маленьких (0,2-0,7 мкм) кокоподібних або паличкоподібних бактерій. У мазках із органів вони мають ніжну капсулу.

На середовищі Мак-Коя і Чепіна туляремійні бактерії ростуть у вигляді ніжних маленьких колоній, що нагадують крапельки роси. На агарі Френсіса колонії круглі з гладенькою поверхнею, молочного кольору, слизуваті, оточені зеленим ореолом. Рідке середовище мутніє, на дні утворюється слизовий осад.

Типові колонії досліджують мікроскопічно, пересівають у напіврідке елективне середовище в пробірці; культури, що вирости, ідентифікують за морфологічними (дуже дрібні грамнегативні кокобактерії), культуральними ознаками (не ростуть на простих середовищах), біохімічними властивостями (розкладають глюкозу, мальтозу, левульозу, виділяють сірководень, не утворюють індолу) та в реакції аглютинації із специфічною аглютинуючою сироваткою. Остання реакція і позитивна біопроба є вирішальними при визначенні збудника туляремії.

Для виділення туляремійних мікробів із води 1 л її попередньо фільтрують через мембранні фільтри або центрифугують. Ресуспензованим осадом із мембрани або з дна центрифужної пробірки заражають білих мишей. Змиви з різних об'єктів та харчові продукти досліджують на наявність збудників туляремії також методом біопроби.

Серологічна діагностика. У звичайних клінічних умовах для діагностики туляремії проводять тільки серологічні реакції й алергічну пробу з тулярином. Починаючи з 10-12 дня хвороби ставлять об'ємну реакцію аглютинації, яка за методикою не відрізняється від реакції Райта. У хворого беруть 2-3 мл крові з ліктьової вени або пальця, отримують сироватку, яка повинна бути абсолютно прозорою. Реакцію ставлять із розведеннями сироватки від 1:50 до 1:800, супроводжуючи її відповідними контролями (табл. 48).

Антигеном в реакції аглютинації служить туляремійний діагностикум, в 1 мл якого міститься 10 млрд мікробних тіл. Перед вживанням його розводять у 10 разів.

Таблиця 47

Схема постановки об'ємної реакції аглютинації

Компоненти, мл	Номери пробірок						
	1	2	3	4	5	6 КС	7 КД
0,85 % розчин хлориду натрію	–	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Сироватка хворого, 1:25	05	0,5	→	→	→	↓	–
Діагностикум туляремійний	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	–	0,5
Розведення сироватки	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:50	–

Примітка: КС – контроль сироватки, КД – контроль діагностикуму.

Пробірки струшують і ставлять у термостат на 2 год, потім витримують 18-20 год при кімнатній температурі і аналізують результати. Діагностичне значення має титр 1:100. Така концентрація антитіл настає в кінці 2-го тижня, після чого титр аглютинів наростає у 4-8 разів, в той час як у перехворілих раніше він залишається практично незмінним.

Кров'яно-крапельну реакцію аглютинації вживають як прискорений орієнтовний метод діагностики туляремії, особливо при масових обстеженнях. На ретельно знежирене скло беруть товсту краплю крові з пальця хворого. До неї додають такий же об'єм дистильованої води, щоб викликати гемоліз. Поряд наносять краплю туляремійного діагностикуму (5 млрд мікробних тіл у 1 мл). Обидві краплі змішують скляною паличкою. При наявності у хворих титру антитіл 1:100 і вище аглютинація на склі настає негайно, при більш низьких титрах – через 2-3 хв. У всіх хворих із позитивною кров'яно-крапельною пробою ставлять об'ємну реакцію аглютинації.

Дуже чутливим методом серологічної діагностики туляремії є реакція непрямой гемаглютинації. Вона ефективна як при ранній, так і при ретроспективній діагностиці, а також для визначення рівня антитіл після вакцинації. Антигеном для РНГА служить туляремійний еритроцитарний діагностикум (консервовані формаліном баранячі еритроцити, сенсibiliзовані туляремійним антигеном). Методика постановки РНГА при туляремії така сама, як і при бруцельозі. Гемаглютинаційні титри сироваток у хворих досягають 1:1280-1:2560 і вище.

Високочутлива і специфічна непряма реакція імуофлуоресценції. Діагностикум для РІФ є завись вакцинного штаму туляремійних бактерій в концентрації 500 млн/мл. Сироватку розводять від 1:5 до 1:640. Діагностичним титром вважають розведення 1:40 і більше, яке дає яскраве світіння поверхні мікробних клітин. Позитивна РІФ буває також у перехворілих раніше і вакцинованих.

Для ранньої діагностики туляремії використовують також РЗК на холоді. Кров у хворого беруть в кінці 1-го тижня захворювання, антигеном служить діагностикум.

У природних осередках туляремії для контролю за розвитком епізоотій серед гризунів використовують РНГА та ІФА з метою виявлення антигенів у тушках гризунів і птахів.

Алергічні проби віднесені до ранніх і високоспецифічних методів діагностики туляремії. Вони стають позитивними вже з 3-5-го дня хвороби. Для постановки

проб використовують 2 препарати тулярину. Перший містить 500 млн бактерій в 1 мл, другий – 10 млрд. Відповідно використовують внутрішньошкірний метод введення тулярину з меншою концентрацією мікробних тіл і нашкірний – для більш концентрованого препарату.

Для постановки внутрішньошкірної проби 0,1 мл тулярину вводять у шкіру передпліччя. При постановці нашкірної проби на зовнішню поверхню плеча наносять краплю тулярину і через неї роблять 2 паралельні насічки довжиною 8-10 мм, плоским боком пера втирають препарат в насічки. Реакцію враховують через 24 і 48 год. За позитивну пробу вважають розвиток інфільтрату діаметром 5 мм і більше. Позитивна проба протягом кількох років залишається у перехворілих і вакцинованих осіб.

Бруцельоз

Бруцельоз – хронічна або гостро-хронічна зоонозна інфекційна хвороба з рецидивним довготривалим перебігом, ундулюючою гарячкою, переважним ураженням опорно-рухових органів, нервової та сечостатевої системи. Збудниками його є декілька видів бактерій, об'єднаних у рід *Brucella*: *B.melitensis*, *B.abortus*, *B.suis*, *B.ovis*, *B.canis*, *B.neotomae*.

Із всіх видів найбільш патогенною для людини є *B.melitensis*. Вона викликає 95-97 % всіх випадків бруцельозу, на долю *B.abortus* припадає 1-3 %, ще рідше захворювання викликає *B.suis* (менше 1 %). Пізніше від баранів, хворих на епідидиміт, виділили *B.ovis*, від чагарникових щурів – *B.neotomae*, від гончих собак – *B.canis*.

Брецели мають добре виражені антигенні властивості. Вони містять поверхневий Vi-антиген і видоспецифічні соматичні А і М, кількісне співвідношення яких неоднакове у різних видів. У *B.melitensis* переважає М-антиген, у *B.abortus* і *B.suis* – антиген А. Для ідентифікації бруцел використовують монорецепторні сироватки.

Основними носіями бруцел є кози, вівці (*B.melitensis*), велика рогата хвороба (*B.abortus*), свині (*B.suis*) і північні олені (*B.rangiferis*). Від хворих тварин збудник виділяється з молоком, сечею, випорожненнями і особливо з навколоплідними водами під час окотів і отелів. Людина заражується від тварин контактно-побутовим шляхом або через сире молоко і молочні продукти. Захворювання носить професійний характер. Найчастіше хворіють пастухи, доярки, ветеринарні працівники, скотарі.

Лабораторну діагностику бруцельозу проводять за допомогою бактеріологічних і серологічних досліджень, біологічної та алергічної проб, а також методу ДНК/ДНК гібридизації.

Матеріалом для дослідження може бути кров, кістковий мозок, фекалії, жовч, сеча, ліквор, харкотиння, пунктат лімфатичних вузлів, у тварин – викидні, навколоплідні води, а також молоко і молочні продукти.

У зв'язку з частими лабораторними зараженнями бруцельозом виділення чистих культур і зараження гвінейських свинок дозволяють проводити лише у

спеціальних режимних відділах санепідемстанції. Серологічні дослідження виконують у звичайних бактеріологічних лабораторіях.

Бактеріологічне дослідження. Для виділення гемокультури з ліктьової вени беруть 10-20 мл крові й порівно засівають у два флакони з печінковим, сироватковим декстрозним бульйоном або МПБ із глюкозою, гліцерином і антифаговою сироваткою для пригнічення бруцельозного бактеріофагу. Один флакон інкубують у звичайних аеробних умовах, другий – в атмосфері 10 % CO₂ (для росту *B. abortus*). Особливістю бруцел є дуже повільний ріст на середовищах при виділенні від хворих, тому посіви слід витримувати в термостаті до 4-5 тижнів, роблячи висіви на елективні агари кожні 4-5 днів. Найкращим середовищем для вирощування бруцел є сироватковий декстрозний агар (МПА, 5 % сироватки, 1 % декстрози). Для прискорення дослідження посіви крові проводять у два прямокутних флакони за методом Кастанеди. Флакони містять, крім бульйону, ще й шар агару на одній або обох стінках. Починаючи з 4-го дня після посіву, флакони періодично похитують для того, щоб зросити бульйоном поверхню агару. У випадку позитивного результату на агарі виростають колонії бруцел, які відсівають на елективні середовища й проводять ідентифікацію. Якщо протягом місяця колонії не ростуть, роблять висів із бульйону на щільне середовище.

Отримання гемокультури є одним із основних методів бактеріологічної діагностики бруцельозу у людей. Якщо хворобу викликає *B. melitensis*, гемокультура висівається у 65-90 % випадків, при зараженні *B. abortus* – у 5-15 %. Інколи гемокультура виростає вже з перших днів гарячки.

Хороші результати в гострій і хронічній стадіях хвороби дають посіви пунктів кісткового мозку. Мієлокультуру вдається виділити в 2 рази частіше, ніж гемокультуру. Кілька крапель аспірату кісткового мозку засівають у дві пробірки з тим же середовищем. Сечу для виділення уринокультури і жовч для виділення білікультури, а також молоко спочатку центрифугують. Із осаду або вершків роблять висів по 0,1-0,2 мл на чашки з агаром “Д”, (або печінковим), до якого додають генціановий фіолетовий у розведенні 1:200 тис. для затримання росту супутньої мікрофлори.

Дуже ефективні посіви матеріалу в жовток курячих жирових (незапліднених) яєць або в жовтковий мішок курячого ембріону. Кров хворого або аспірат кісткового мозку розводять бульйоном 1:3 і по 0,1-0,2 мл інокулюють у декілька яєць. Заражені яйця інкубують при 37 °С 5 днів і по 0,5 мл їх вмісту висівають на рідкі й щільні середовища. Ріст бруцел спостерігається вже через 2-3 дні.

Якщо посівний матеріал (фекалії, сеча, харкотиння, гній тощо) контамінові сторонніми мікробами, його спочатку центрифугують, осад розводять генціановим фіолетовим у 3-5 разів і по 0,2 мл вносять у яйця чи ембріони з наступним висівом на елективний агар.

Колонії бруцел на агарі дрібні (0,1-0,5 мм), круглі, опуклі, гомогенні з перламутровим відтінком. Бруцели можуть утворювати як S-, так і R-форми колоній (особливо *B. ovis*, *B. suis* і *B. canis*). Із помутнілого бульйону і типових колоній виготовляють мазки, забарвлюють за Грамом і відсівають на скошений агар для виділення чистої культури.

Ідентифікація культур проводиться за морфологічними, культуральними, біохімічними властивостями і на основі реакції аглютинації видовими і монорецепторними сироватками. Тепер є надійні тести для диференціації основних видів і біоварів бруцел (табл. 49).

Таблиця 49

Диференціація основних видів і біоварів бруцел

Вид	Біо-вар	Потреба CO ₂	Виділення H ₂ S	Ріст на агарі з барвниками		Аглютинація моноспецифічними сироватками		Лізис фагом
				Тіонін	Фуксин	<i>Brucella abortus</i>	<i>Brucella melitensis</i>	
<i>Brucella melitensis</i>	1	–	–	+	+	–	+	–
	2	–	–	+	+	+	–	–
	3	–	–	+	+	+	+	–
<i>Brucella abortus</i>	1	+	+	–	+	+	–	+
	2	+	+	–	–	+	–	+
	3	+	+	+	+	+	–	+
	4	+	+	–	+	–	+	+
	5	–	–	+	+	–	+	+
	6	–	–	+	+	+	–	+
	7	–	+	+	+	+	+	+
	8	–	–	+	+	–	+	+
	9	–	+	+	+	–	+	+
<i>Brucella suis</i>	1	–	+	+	–	+	–	–
	2	–	–	+	–	+	–	–
	3	–	–	+	+	+	–	–
	4	–	–	+	–	+	+	–

Біологічна проба. Найбільш чутливими лабораторними тваринами є гвінейські свинки і білі миші. До зараження тварин вдаються тоді, коли досліджуваний матеріал сильно забруднений сторонньою мікрофлорою і висіяти з нього чисту культуру важко. Кров хворих, ліквор, ексудат із суглобів вводять у черевну порожнину (гвінейським свинкам 2-3 мл, мишам – 0,5-1,0 мл). Осад сечі, навколлоплідних вод, молока вводять підшкірно в пахвинній ділянці. Через 20-30 днів після зараження проводять розтин тварин, сіють кров із серця та емульговані паренхіматозні органи і лімфатичні вузли на рідкі й щільні елективні середовища. Перед посівом у свинок беруть кров із серця для постановки реакції аглютинації з метою виявлення антитіл. Позитивною біопробу вважають тоді, коли виділяють бруцели будь-якого виду, або при позитивній реакції аглютинації в розведенні сироватки 1:20 і більше.

Для виявлення бруцельозних антигенів у сироватці крові, які можуть бути вільними або у вигляді циркулюючих імунних комплексів, застосовують РНГА в разі використання еритроцитарних діагностикумів з моноклональними антитілами до родоспецифічних антигенів бруцел. Використовують також реакцію коаглютинації та преципітації, а також метод імуноферментного аналізу.

Серологічні дослідження при бруцельозі включають реакцію аглютинації Райта, прискорені пластинчасті реакції на склі: Хеддлсона, роз-бенгал, латекс-аглютинації, непрямую реакцію гемолізу. Із об'ємних серологічних реакцій використовують РЗК, реакцію Кумбса (для виявлення неповних антитіл), РНГА, ІФА, РІФ, опсонофагоцитарну пробу. З них найчастіше використовують реакції Райта, Хеддлсона і РНГА.

Реакція Райта – один із основних офіційних методів діагностики бруцельозу в усіх країнах. Вона проста за технікою постановки, досить чутлива і специфічна, виявляється на початку захворювання, досягає діагностичного титру на другому тижні й зберігається позитивною протягом 1-4-х років. Отже, її можна використовувати як для діагностики гострого періоду хвороби, так і для встановлення ретроспективного діагнозу. Реакцію ставлять за класичною схемою в пробірках методом однакових об'ємів (табл. 50).

Таблиця 50

Схема постановки реакції аглютинації Райта

Компоненти, мл	Номери пробірок						
	1	2	3	4	5	6 КС	7 КД
0,85 % карболізований розчин хлориду натрію	–	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Сироватка хворого 1:25	0,5	0,5	→	→	→	0,5	–
Бруцельозний діагностикум 1:10	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	–	0,5
Розведення сироватки	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:50	–

Примітка: КС – контроль сироватки, КД – контроль діагностикуму.

Сироватку хворого і діагностикум розводять ізотонічним розчином хлориду натрію, до якого заздалегідь додають 0,5 % фенолу (карболізований ізотонічний розчин). При постановці реакції Райта і Хеддлсона використовують єдиний бруцельозний діагностикум, який є 10 млрд зависю убитих нагріванням і фенолом бруцел, забарвлених аніліновим барвником у синій колір. Перед постановкою реакції його розводять у 10 разів.

Пробірки струшують і ставлять у термостат на 18-20 год, потім ще витримують 2 год при кімнатній температурі й враховують результати звичайним способом або по 50 % аглютинації (2+). Серійні розведення 50 % аглютинації 1:50, 1:100-1:800 свідчить про те, що 1 мл сироватки хворого містить відповідно 50, 100 ... 800 МО антитіл. Інтенсивність реакції оцінюють за такою схемою: 50 МО – реакція сумнівна, 100-200 МО – позитивна, 400-800 МО – різко позитивна. Реакція Райта може бути позитивною у перехворілих раніше і у щеплених осіб, тому з розвитком хвороби її ставлять повторно і враховують наростання титру антитіл.

Часто використовують мікрометод реакції аглютинації на склі – пластинчасту реакцію Хеддлсона, особливо при масових обстеженнях на бруцельоз. Для цього добре знежирену скляну пластину 8×12 см розділяють восковим олівцем на 6 однакових квадратів. Нерозведену сироватку хворого і бруцельозний діагности-

кум наносять за допомогою піпеток згідно з схемою (табл. 51). Краплі сироватки і антигену змішують обережним похитуванням пластини або скляною паличкою, злегка підігрівають над полум'ям газового пальника. Максимальний строк спостереження 8 хв. При позитивній реакції в змішаних краплях появляються пластівці, а рідина стає більш-менш прозорою. Аглотинація в усіх 4-ох квадратах оцінюється як різко позитивна, в 3-й і 4-й дозах – позитивна, в 2-й дозі – слабо позитивна і лише в дозі 0,8 мл – сумнівна. Відсутність аглютинації з усіма дозами сироваток оцінюють як негативну реакцію.

Таблиця 51

Схема постановки пластинчастої реакції Хеддлсона

Компоненти, мл	Номери квадратів					
	1	2	3	4	5 КС	6 КД
Ізотонічний розчин Na Cl	–	–	–	–	0,03	0,03
Сироватка хворого	0,08	0,04	0,02	0,01	0,02	–
Діагностикум	0,03	0,03	0,03	0,03	–	0,03

Примітка: КС – контроль сироватки, КД – контроль діагностикуму.

Для прискореної діагностики бруцельозу вживають також реакцію аглютинації бенгальського рожевого з кислим антигеном. Антиген готують із густої заварі бруцел, убитих нагріванням, з використанням буферного розчину (рН 3,6-3,8) і барвника бенгальського рожевого. На скляну пластинку наносять 0,03 мл нерозведеної сироватки і 0,03 мл антигену, змішують їх круговим рухом скляної палички. Результат реакції враховують через 4 хв. Поява крупно- або дрібнозернистого аглютинату свідчить про позитивну реакцію.

Реакція зв'язування комплементу ставиться за звичайною схемою. Вона стає позитивною з 20-25-го дня захворювання й довго зберігається.

Постановку опсоно-фагоцитарної проби останнім часом проводять рідко. Натомість стали широко використовувати РНГА.

Реакція непрямой гемаглютинації при бруцельозі є специфічною і високочутливою. Для її проведення використовують еритроцитарний бруцельозний полісахаридний діагностикум. Частіше РНГА ставлять у полістирилових прозорих планшетах із лунками (можна і в пробірках).

Досліджувану сироватку (а також завідомо позитивну і негативну для контролю) інактивують при температурі 56 °С протягом 30 хв. Для її серійного розведення використовують нормальну сироватку кролика, заздалегідь розведену 1:100. Реакцію ставлять за такою схемою (табл. 52).

Реакція настає через 1-2 год при кімнатній температурі. Облік її проводять через 2 год. Якщо гемаглютинація настає з розведенням сироватки 1:50 – реакція сумнівна; 1:100 і вище – позитивна.

Реакція Кумбса при бруцельозі також специфічна і високочутлива. Вона є цінним діагностичним тестом особливо при хронічних формах захворювання у людей і тварин.

Таблиця 52

Схема постановки РНГА

Компоненти, мл	Номери лунок							
	1	2	3	4	5	6	7 КС	8 КД
Сироватка кролика 1:100	–	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	–	0,5
Сироватка хворого 1:50	0,5	0,5	→	→	→	→ ↓	0,5	–
Розведення сироватки	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:50	–
Діагностикум	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	–	0,05

Примітка: КС – контроль сироватки, КД – контроль діагностикуму

Алергічна проба Бюрне використовується для діагностики бруцельозу, особливо при негативних бактеріологічних і серологічних дослідженнях. Пробу ставлять, починаючи з 15-20-го дня захворювання. У середній третині передпліччя внутрішньошкірно вводять 0,1 мл бруцеліну (мелітину, абортину). Він є протеїновим екстрактом із культури бруцел. Позитивною реакцією вважають інфільтрат, почервоніння розміром 2×3 см і більше, які виникають через 24-48 год. Алергічна проба буває позитивною після перенесеного захворювання, а також у щеплених. Це знижує діагностичну цінність проби Бюрне.

Сап і меліюдоз

Сап – особливо небезпечна інфекційна хвороба, яка має гострий і хронічний септикопіємічний перебіг з утворенням пустул, виразок, абсцесів у тканинах і органах. Збудник – *Pseudomonas mallei*.

Джерелом інфекції є хворі коні, рідше віслюки, мули. Захворювання носить чітко виражений професійний характер. Найчастіше хворіють конюхи, їздові, ковалі, ветеринарні і зоотехнічні працівники. Шлях передачі – контактний, внаслідок попадання гною чи слизу від хворих тварин на шкіру або слизову оболонку, рідше – аліментарний, через воду. В Україні сап уже довго не реєструється, хоч можливе завезення хвороби з країн Африки, Азії та Середнього Сходу.

Матеріалом для мікробіологічної діагностики можуть бути гній, виділення з виразок, носоглотки, кон'юнктиви, харкотиння, кров, сеча, фекалії. Забір матеріалу і його дослідження проводять в умовах, необхідних для роботи із збудниками особливо небезпечних інфекцій.

Первинна бактеріоскопія має обмежене значення, оскільки досліджуваний матеріал сильно контаміновий сторонньою мікрофлорою, а характерних морфологічних ознак у збудника сапу немає (грамнегативні поліморфні, часом зернисті палички без джгутиків і спор). Лише при використанні РІФ можна отримати позитивні результати.

Для проведення бактеріологічних досліджень з метою виділення чистої культури патологічний матеріал сіють на гліцериновий бульйон і агар або картопляно-гліцериновий агар, до яких можна додавати пеніцилін чи бактеріостатичні барвники для пригнічення росту сторонньої мікрофлори. Виділення гемокультури про-

водять шляхом посіву 10 мл крові в 250 мл МПБ. У гліцериновому бульйоні па-личка сапу викликає помутніння з утворенням пристінкової плівки, від якої вниз спускаються ниткоподібні утвори. На гліцериновому агарі при 37 °С через 18-20 год появляються плоскі напівпрозорі колонії, які, зливаючись, утворюють густі нальоти слизової маси янтарного кольору. На картопляно-гліцериновому агарі ви-ростають ніжні напівпрозорі колонії, які через кілька днів утворюють наліт жов-то-бурого кольору, подібний до меду.

Колонії досліджують мікроскопічно, перевіряють на рухливість, відсівають на скошений агар для виділення чистої культури. Ідентифікацію збудника про-водять на основі характерних культуральних і біохімічних властивостей та реакції аглютинації на склі специфічною діагностичною сироваткою. При неможливості виділити чисту культуру виявляють антигени збудника в досліджуваному матеріалі за допомогою постановки РНГА з еритроцитарним антитільним діагностикумом.

Дуже ефективним, але й небезпечним методом діагностики сапу є внутріш-ньоочеревинне зараження самців гвінейських свинок або золотистих хом'ячків. У тварин через 2-3 дні розвивається перитоніт і гнійний орхіт (феномен Штрауса). Важливо пам'ятати, що скротальний феномен можуть також викликати *Pseudo-
monas aeruginosa* і *P. pseudomallei*. Є й додаткові диференціальні ознаки збудника сапу: відсутність рухливості, росту при 42 °С і розрідження желатину.

Із серологічних методів діагностики сапу застосовують реакції аглютинації, зв'язування комплекту і непрямой гемаглютинації. РЗК є найбільш чутливою се-рологічною реакцією. Діагностичний титр її становить 1:20 і вище.

Важливим методом діагностики захворювання є постановка алергічної про-би з малеїном. Він є основним тестом у ветеринарній практиці при розпізнаванні сапу у тварин. Препарат вводять у кон'юнктивальний мішок. У людей пробу з малеїном треба ставити обережно, оскільки можливе загострення хвороби. На внутрішній поверхні передпліччя строго внутрішньошкірно вводять 0,1 мл малеїну, розведеного 1:1000. У зв'язку з цим розроблено більш безпечний варіант поста-новки алергічної проби – введення малеїну на скарифіковану шкіру. Результати реакції враховують через 24 і 48 год.

Меліоїдоз – сапоподібне особливо небезпечне захворювання людини, диких і домашніх тварин. Збудником його є *Pseudomonas pseudomallei*. Хвороба реєст-рується переважно в країнах Азії, Австралії і Карибського регіону. Можливе заве-знення меліоїдозу із названих країн до нашої держави.

Джерелом інфекції в природі є дикі гризуни (щури, миші), домашні тварини (коти, собаки, корови, вівці, свині, коні), кенгуру. В оточуюче середовище збудник потрапляє з сечею, випорожненнями, гнійними виділеннями з носоглотки й очей хворих тварин. Основний механізм передачі меліоїдозу – контактний, рідше – алі-метарний і ще рідше – аспіраційний або трансмісивний.

Матеріалом для мікробіологічної діагностики меліоїдозу служить гній, виді-лення з носоглотки, виразок, харкотиння, кров, сеча, випорожнення. Взяття мате-ріалу, його транспортування і бактеріологічне дослідження проводять із такими ж пересторогами, як і при інших особливо небезпечних інфекціях.

Лабораторна діагностика меліоїдозу ґрунтується на тих самих принципах, що й дослідження при сепі. Посіви матеріалу проводять на кров'яний агар і гліцеринові середовища з додаванням антибіотиків (неоміцин) і бактеріостатичних барвників. Найбільш характерними ознаками для ідентифікації збудника меліоїдозу є наступні: біполярність забарвлення, складчасті колонії і зморшкувата плівка на бульйоні, гемоліз на 2 % кров'яному агарі, рухливість, позитивна РІФ. Досить чутливим методом є постановка біологічної проби на гвінейських свинках і золотистих хом'ячках (скротальний феномен).

Серологічна діагностика меліоїдозу має лише допоміжне значення. Використовують реакції аглютинації (діагностичний титр 1:640 і більше), зв'язування комплементу (діагностичний титр 1:20 і вище) та РНГА.

Шкірну алергічну пробу з меліоїдином використовують лише у ветеринарній практиці.

Сибірка (злоякісний карбункул)

Сибірка – гостре особливо небезпечне інфекційне захворювання домашніх і диких тварин, від яких заражуються і люди шляхом прямого контакту з хворими тваринами та різноманітною сировиною. Виділяють шкірну, легеневу й кишечну форми хвороби.

Збудник сибірки – *Bacillus anthracis* – належить до роду *Bacillus* родини *Bacillaceae*. Рід *Bacillus* об'єднує ще декілька видів бацил, з якими необхідно диференціювати виділені культури сибіркових паличок. Найголовніші з них – *B. cereus*, *B. anthracoides*, *B. subtilis*, *B. megaterium*.

Взяття матеріалу і відсилка проб. При проведенні лабораторної діагностики сибірки у людини досліджують різні матеріали залежно від клінічної форми захворювання: при шкірній формі – вміст везикул, карбункулів; при кишечній – випорожнення; легеневій – харкотиння. Кров досліджують при всіх клінічних формах. Від трупа беруть кров, шматочки паренхіматозних органів. Якщо негайно засіяти матеріал від трупа неможливо, з крові, пунктатів кісткового мозку і селезінки на предметних скельцях готують товсті мазки і висушують.

Всі проби вміщують у скляні банки, флакони, пробірки. Висушені мазки кладуть у чашки Петрі, обгортають вошцаним або пергаментним папером, пакет надписують “Обережно, мазки нефіксовані!” Весь відібраний матеріал ретельно вкладають у металевий або дерев'яний ящик, пломбують або опечатують сургучем, на кришці пишуть “Верх, обережно!” Оформляють супровідний документ, у якому вказують який матеріал, місце і час забору, від кого взято, і нарочним негайно відправляють до спеціальної (режимної) лабораторії.

Розтин тварин, що загинули від сибірки, не проводять, оскільки це сприяє спорудженню і розсіюванню збудника. При необхідності дозволяється брати лише вуха, його поміщають у банку, а місце розрізу припікають паяльною лампою або концентрованим розчином карболової кислоти. Беруть також взірці шкір, шерсті, вовни, щетини. У ряді випадків досліджують харчові продукти (м'ясо), воду, ґрунт.

Лабораторна діагностика сибірки складається із декількох етапів: бактеріоскопії мазків, виділення та ідентифікації чистої культури збудника, постановки біопроби, реакції термокільцепреципітації Асколі, постановки алергічної проби.

Бактеріоскопічний метод. Із крові, вмісту везикул, харкотиння виготовляють по 4 мазки з кожної проби, забарвлюють їх за Грамом, Романовським-Гімзою, сибірковою люмінесцентною сироваткою, розчином Ребігера, який одночасно фіксує і забарвлює препарат. Із різних способів виявлення капсул метод Ребігера є найпростішим і найдемонстративнішим (рис. 70). Беруть 15-20 г генціану фіолетового і розчиняють у 100 мл 40 % формаліну. Розчин витримують при кімнатній

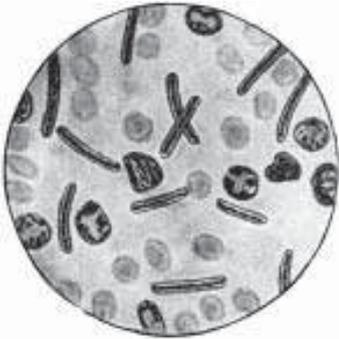


Рис. 70. Капсули *B. anthracis* у мазку з селезінки.

температурі кілька годин, потім фільтрують. Нефіксований мазок забарвлюють 15-20 секунд, промивають, висушують. Тіло бацил забарвлюється в темно-фіолетовий, а капсули – в червоно-фіолетовий колір, за Романовським-Гімзою – тіло клітин набуває голубого, а капсула – світло-рожевого кольору. При обробці мазка флуоресцентною сироваткою бацили сибірки під люмінесцентним мікроскопом виглядають як великі палички, що оточені яскраво-світлим зеленуватим обідком. Наявність у мазках типових бацил, що розташовуються ланцюжками, оточеними капсулами, дають специфічну флуоресценцію, обумовлює можливість поставити попередній діагноз сибірки.

Бактеріологічне і біологічне дослідження. Остаточний діагноз сибірки можна поставити лише після виділення чистої культури і позитивної біопроби на тваринах. Досліджуваний матеріал сіють у МПБ, чашки з МПА і кров'яним агаром. Посіви інкубують при температурі 37 °С протягом 18-20 год. Одночасно з посівами емульгованим дослідним матеріалом заражують підшкірно лабораторних тварин. Білим мишам його вводять біля кореня хвоста – 0,1 мл, гвінейським свинкам під шкіру живота – 0,2 мл, кроликам – 0,5-3,0 мл.

У бульйоні спостерігається ріст у вигляді жмутка вати, при мікроскопії якого видно типове розташування мікробів у вигляді довгих ланцюжків (стрептобацили). На поверхні МПА виростають великі шорсткі матові R-форми колоній з нерівним, волокнистим, кучерявим краєм ("голова медузи", "левава грива"). Такі колонії необхідно вивчати під малим збільшенням мікроскопа у прохідному світлі (рис. 71). На кров'яному агарі колонії мають S- або SM-форму без гемолізу, в той час як навкруги колоній антракоідів виникає велика зона просвітлення середовища.

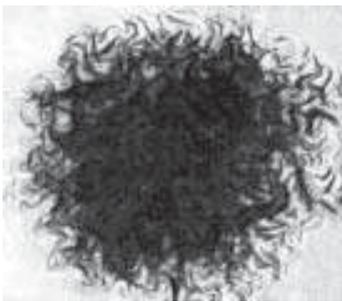


Рис. 71. Колонія *B. anthracis*.

На МПА і МПБ *B. anthracis* при звичайних аеробних умовах росте без утворення капсул, що не дає змоги визначити одну з найважливіших її ознак.

Для виявлення капсулоутворення кращими способами є зараження білих мишей з наступним забарвленням мазків-відбитків із органів та посіви на спеціальний елективний агар Буза (Венгрія) і Томова (Болгарія) або на середовище, що містить розчин Хенкса і 40 % стерильної бичачої сироватки. Посіви вирощують в атмосфері 20-40 % CO₂. Наступного дня 2-3 підозрілі колонії після мікроскопії відсівають на скошений МПА для виділення чистої культури.

Тварини гинуть через 24-36 год від гострої септицемії, проводять їх розтин, роблять посіви із крові, селезінки та досліджують мазки-відбитки як вище описано.

На 3-й день дослідження знову заражають білих мишей, але вже чистою культурою, проводять додаткові посіви і виконують тести для її остаточної ідентифікації та диференціації від антракоідів і деяких бацил ґрунту. При цьому враховують головні й додаткові ознаки. До головних критеріїв відносять специфічну патогенність, капсулоутворення, тест "перлинного намиста" на середовищі з пеніциліном, лізис специфічним фагом, люмінесцентно-серологічний тест. Додатковими ознаками є лецитиназна активність, відсутність рухливості та гемолізу (табл. 53)

Таблиця 53

Диференціальні ознаки збудника сибірки і ґрунтових бацил

Вид	Наявність капсули	Патогенність	Лізис специфічним фагом	Тест "перлинного намиста"	Люмінесцентно-серологічний тест	Рухливість	Гемоліз	Лецитиназа	Фосфатаза
<i>B. anthracis</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>B. anthracoides</i>	-	-	-	-	-	±	+	+	+
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-	-	±	+	+	+
<i>B. megaterium</i>	-	-	-	-	-	±	-	+	+
<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-	±	-	+	+

Специфічну патогенність визначають введенням білим мишам 0,2 мл суспензії культури. Виявлення у мазках-відбитках із органів загиблих тварин крупних паличок, оточених капсулою, свідчить про наявність у мікробів специфічної патогенності (див. вкл., рис. 16). При зараженні мишей занадто великими дозами культур ґрунтових бацил у тварин інколи настає захворювання, але феномен капсулоутворення відсутній.

Тест "перлинного намиста" проводять так. До бульйону Хоттінгера з кінською сироваткою (30 %) додають пеніцилін у кількості 0,5 ОД/мл і сіють 2 краплі молодої виділеної культури. Через 3 год росту в термостаті виготовляють мазки, забарвлюють метиленовим синім і мікроскопують. Сибіркові бацили розташовуються у вигляді ланцюжків із кулястих форм, що нагадують намисто з перлин. Сапрофітні ґрунтові бацили, нечутливі до пеніциліну, ростуть як звичайно, і в мазках виявляють паличкоподібні ланцюжки.

Для виявлення фаголізабельності виділених штамів на підсушений МПА в чашці Петрі з розкресленим на квадрати дном бактеріологічною петлею діаметром 5 мм на кожен квадрат наносять велику краплю 5-6 – годинної культури. Чашку знову підсушують 30 хв і потім на центр кожної бляшки культури петлею ді-

метром 2 мм наносять маленьку краплю специфічного сибіркового бактеріофагу. Облік результатів проводять через 5-6 год інкубації при 37 °С. Якщо культура належить до *B. anthracis*, у місці нанесення на неї фагу видно лізис у вигляді стерильної плямки. Жоден вид сапрофітних бацил нечутливий до дії специфічного фагу.

Швидко ідентифікувати виділену культуру можна також за допомогою діагностичної сибіркової сироватки, міченої флуоресцеїном (родаміном). Мазок із капсульної культури фіксують метанолом, потім протягом 20 хв обробляють люмінесцентною сироваткою, промивають буферним розчином, висушують і мікроскопують під люмінесцентним мікроскопом. У мазках навколо клітин із капсулою спостерігається специфічне світіння у вигляді яскраво-зелених обідків. Тепер частіше використовують непрямий варіант РІФ.

Відсутність рухливості виявляють методом надавленої (висячої) краплі або посівом уколом у пробірку з напіврідким агаром, а відсутність гемолізу встановлюють після посіву на кров'яний агар. Проби на лецитиназу і фосфатазу проводять за допомогою загальноприйнятих методик.

Отже, великі грампозитивні нерухливі палички з капсулами, що ростуть у вигляді характерних R-форм колоній, високопатогенні для експериментальних тварин, дають тест “перлинного намиста”, яскраво світяться при обробці сибірковою люмінесцентною сироваткою, ідентифікують як *B. anthracis*.

У тих випадках, коли виділити збудника з досліджуваного матеріалу дуже важко або взагалі неможливо (труп тварин, шкіра, хутро, шерсть, вовна), а також при контролі тваринної сировини на деяких виробництвах, широко використовують дуже чутливу й специфічну реакцію термокільцепреципітації Асколі. Вона дає змогу виявляти в матеріалі навіть незначну кількість антигена сибіркових бацил.

Термостабільний антиген із досліджуваних матеріалів екстрагують кип'ятінням або “холодним” способом. Спочатку матеріал подрібнюють, потім заливають 10-кратним об'ємом 0,85 % розчину хлориду натрію, кип'ятять 10-15 хв, фільтрують через азбестову вату. У деяких випадках матеріал заливають потрійним об'ємом 0,5 % розчину оцтової кислоти. При цьому проходить більш повноцінне екстрагування антигену.

“Холодний” метод частіше застосовують при масовому обстеженні шкір та іншої сировини. Проби матеріалу стерилізують у автоклаві, подрібнюють, заливають 10-кратним об'ємом ізотонічного розчину і залишають при температурі 6-16 °С на 20-24 год, фільтрують так само. У всіх випадках антиген має бути максимально прозорим.

Другий компонент реакції – преципітуючу сироватку – отримують шляхом гіперімунізації коней вакциною СТІ або вбитою культурою *B. anthracis*.

У преципітаційні пробірки вносять 0,2-0,3 мл преципітуючої сироватки, а потім обережно нашаровують 0,3 мл термоекстракту. На межі двох рідин утворюється через 2-5 хв тонке кільце преципітату білуватого кольору (помутніння рідини). Появу осаду через 10 хв вважають неспецифічною реакцією. Паралельно ставлять декілька контролів: преципітуюча сироватка + позитивний естракт; преципітуюча сироватка + естракт із несибіркового матеріалу; преципітуюча сиро-

ватка + ізотонічний розчин; нормальна сироватка + термоестракт та ін. Перший контроль має бути завжди позитивний, всі інші – негативними.

Серологічна діагностика сибірки проводиться рідко, переважно в таких випадках, коли збудника хвороби виділити не вдається. Для виявлення антитіл у сироватці крові хворих використовують такі високочутливі методи, як РНГА, ІФА, реакція коагулінації з протективним сибірковим антигеном.

Алергічний метод. Організм хворої і перехворілої на сибірку людини, а також після вакцинації реагує місцевою алергічною реакцією на внутрішньошкірне введення алергену. Стан сенсibiliзації виникає вже на 4-5 день хвороби і зберігається дуже довго. Алергеном для постановки проби служить антраксин – білково-полісахаридний комплекс, отриманий шляхом гідролізу вегетативних форм сибіркових бацил. Препарат вводять внутрішньошкірно на долонній поверхні передпліччя в об'ємі 0,1 мл. Результат враховують через 24 і 48 год. Пробу вважають позитивною при виникненні гіперемії та інфільтрату діаметром понад 15 мм.

Мікробіологічна діагностика анаеробних інфекцій

До першої групи патогенних анаеробних мікроорганізмів належать збудники правця, ботулізму, анаеробної газової інфекції, псевдомембранозного коліту та ін. Це великі грампозитивні паличкоподібні бацили, що утворюють термінальні або субтермінальні спори і виділяють сильні екзотоксини. Всі вони входять до роду *Clostridium* родини *Bacillaceae*. Захворювання, які вони викликають, називають тепер загальною назвою клостридіози.

Другу групу строгих анаеробів складають безспоріві бактерії родів *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Propionibacterium*, *Veillonella*, *Peptococcus* і *Peptostreptococcus*. Вони здатні викликати у людини гнійно-запальні і некротичні процеси різноманітної локалізації.

Ботулізм

Ботулізм – тяжка, часто фатальна токсикоінфекція, яка виникає внаслідок вживання продуктів, що містять токсини *Clostridium botulinum*, супроводжується специфічними ураженнями нервової системи, переважно ядер язиково-гортанних і окуломоторних нервів. Інколи хвороба розвивається після інфікування ран клостридіями ботулізму.

C. botulinum продукує 8 типів сильних токсинів: А, В, С₁, С₂, D, Е, F, G, які відрізняються антигенною специфічністю, що необхідно враховувати при проведенні лабораторної діагностики і лікуванні. Ботулізм у людей викликають типи А, В, Е і F, типи С і D – у ссавців і птахів. Патогенність типу G для людини і тварин не доведена.

Основним резервуаром і джерелом інфекції в природі є теплокровні траводісні тварини, в кишечнику яких клостридії розмножуються і з фекаліями у великій кількості потрапляють у ґрунт і воду. Тут вони перетворюються в спори і дуже

довго зберігаються. Захворювання виникає при споживанні в їжу м'ясних, рибних та інших, переважно консервованих продуктів, у яких нагромаджуються клостридії ботулізму та їх токсини. Небезпечними є консервовані продукти домашнього приготування, особливо гриби.

Лабораторна діагностика ботулізму спрямована на виявлення токсину в матеріалах, взятих у хворих, а також харчових продуктах, що спричинили отруєння. Токсин визначають шляхом постановки біопроби і встановлення його типу в реакції нейтралізації. Значно рідше виділяють чисту культуру збудника і проводять серологічні дослідження.

Взяття матеріалу. В усіх випадках захворювань із симптомами ботулізму у хворих обов'язково беруть промивні води шлунка, блювотні маси, кров, фекалії, сечу; від трупа – вміст шлунка і кишок, лімфатичні вузли, шматочки печінки, головного і спинного мозку. Необхідно досліджувати і залишки підозрілої їжі.

Кров у хворого в кількості 10 мл беруть до введення ботулінових лікувальних сироваток у пробірку з лимоннокислим натрієм у співвідношенні 3:1. Промивні води шлунка, блювотні маси (100-200 мл) та випорожнення (50-60 г) вміщують у скляні банки з гумовими корками. Консервуючі речовини добавляти не можна. При взятті секційного матеріалу 50-60 г кожного органу вміщують у окрему банку. Залишки їжі відбирають по 200-300 г.

Щільні матеріали спочатку розтирають у ступках, вносять подвійний об'єм ізотонічного або желатино-фосфатного розчину і залишають при кімнатній температурі на 2 год для екстрагування токсину. Екстракт центрифугують, рідину над осадом використовують для поставки біологічної проби. Кров вводять без будь-якої обробки.

Проби, що доставлені до лабораторії, досліджують одночасно у двох напрямках: 1) для виявлення ботулотоксинів; 2) з метою виділення *C. botulinum*. Одночасно в тих же пробах вияляють і *C. perfringens*.

Виявлення ботулінових токсинів. Наявність ботулінового токсину в досліджуваному матеріалі і визначення його типу проводять за допомогою реакції нейтралізації на білих мишах. Для цього відбирають 5 пар мишей вагою 16-18 г на кожну пробу. В реакції використовують діагностичні (не лікувальні!) антитоксичні ботулінові сироватки типів А, В, Е, F, які розводять 0,85 % розчином хлориду натрію до 100-200 МО/мл, що забезпечує нейтралізацію гомологічного токсину в досліджуваній пробі.

Центрифугат доставлених матеріалів або кров хворого розливають по 1,4 мл у 5 пробірок. У перші чотири з них вносять по 0,6 мл (200 МО/мл) антитоксичних протиботулінових сироваток відповідно типів А, В, Е і F. У останню пробірку добавляють 0,6 мл нормальної сироватки. Всі пробірки витримують 40 хв при кімнатній температурі для нейтралізації токсину. По 1-му мл суміші з кожної пробірки вводять п'яти парам мишей (центрифугат + сироватки – підшкірно, кров + сироватки – в черевну порожнину). За тваринами спостерігають протягом 3-4-х днів.

При наявності в досліджуваному матеріалі ботулінового токсину гинуть чотири пари мишей, окрім двох, яким була введена суміш матеріалу з тим типом сироват-

ки, що нейтралізувала дію гомологічного типу токсину. При загибелі всіх мишей пробу треба повторити з розведеним в 10, 20, 100 разів біологічним матеріалом.

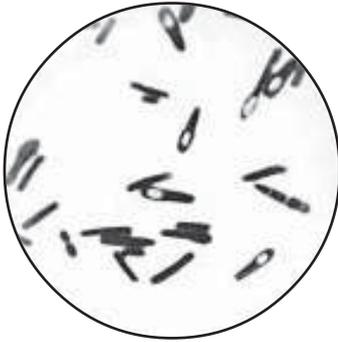
Постановка реакції нейтралізації з визначенням типу ботулотоксину має важливе значення при виборі відповідної сироватки для специфічного лікування ботулізму. Тому при видачі відповіді про виявлення ботулінового токсину лабораторія повинна обов'язково вказувати його тип.

Якщо бактеріологічна лабораторія має типові антитоксичні ботулінові еритроцитарні діагностикуми, серотип токсину краще визначати за допомогою реакції непрямой гемаглютинації. Вона високоспецифічна, чутлива, значно економічніша, швидше дає результат, ніж реакція нейтралізації *in vivo*. Для виявлення збудника ботулізму чи його токсину можна також застосовувати метод ІФА та імуноелектрофорезу.

Професор С.М. Мінервін і його співробітники у 1959 р. розробили прискорений метод діагностики ботулізму за допомогою визначення фагоцитарного показника. Він ґрунтується на тому, що ботулотоксини різко пригнічують фагоцитарну функцію лейкоцитів. Гомологічна антитоксична ботулінова сироватка нейтралізує лейкотоксичну дію екзотоксину, чого немає при дії гетерологічних сироваток.

Дослід ставлять із використанням мікродоз компонентів. У 5 маленьких пробірок вносять піпеткою Панченкова по одному об'єму лимоннокислого натрію ($1/4$ поділок піпетки до мітки 75) і по два об'єми крові хворого. Потім у пробірку № 1 додають один об'єм 0,85 % розчину хлориду натрію, а в пробірки № 2, 3, 4 і 5 – відповідні діагностичні ботулінові сироватки типів А, В, Е, F у тому ж об'ємі. Після перемішування всіх компонентів пробірки ставлять у термостат на 30 хв для нейтралізації можливого токсину в крові хворого гомологічною сироваткою і в усі пробірки вносять по одному об'єму 1 млрд зависі культури золотистого стафілокока і знову вміщують у термостат на 20 хв для завершення процесу фагоцитозу. Із вмісту кожної пробірки готують мазки, фарбують за Романовським-Гімзою і визначають фагоцитарний показник. Для цього підраховують кількість поглинених коків у 50 полінуклерах і ділять отримане число на 50. Якщо в крові хворого є токсин, то фагоцитарні показники в усіх пробах крові будуть низькі, за винятком показника в тій пробірці, де тип токсину і сироватки гомологічні. У тяжких випадках ботулізму фагоцитарний показник може падати до нуля. Гомологічна сироватка, нейтралізуючи токсин, відновлює цей показник до норми. Метод не можна використовувати для виявлення ботулотоксину в харчових продуктах і секційному матеріалі.

Виділення культури *C. botulinum*. До посіву досліджуваний матеріал емульгують у фарфорових ступках як вище вказано. По 10 мл матеріалу сіють у 4 флакони з 75-150 мл свіжореґенерованого рідкого середовища (Кітта-Тароцці, Хоттінгера, казеїново-грибного). Два флакони прогрівають: один при 60 °С протягом 15 хв (для селекції *C. botulinum* типу Е), другий – 20 хв при 80 °С. Два флакони інкубують при 28 °С (для типів Е і F) решту – при 35 °С в анаеростаті або під шаром вазелінового масла товщиною 0,5 см. На 2, 4, 6 і 10-й день із флаконів, де є ріст, виготовляють мазки, забарвлюють за Грамом і мікроскопують. Збудник боту-

Рис 72. *C. botulinum*.

лізму має вигляд крупних грампозитивних паличок із овальною субтермінальною спорою, що нагадують тенісні ракетки (рис. 72).

Щоб визначити тип ботулотоксину з флакона відбирають 10-15 мл культуральної рідини, центрифугують її і ставлять реакцію нейтралізації на білих мишах або РНГА з типовими ботуліновими сироватками, як вище описано.

Для отримання ізольованих колоній з метою виділення чистої культури краплю культуральної рідини з флакона вносять на поверхню анаеробного кров'яного або печінкового агару і втирають скляним шпателем в агар послідовно в трьох чашках. Посіви вирощують в анаеростатах. Через 48 год інкубації вивчають характер колоній. На кров'яному агарі колонії можуть бути неправильної форми з фестончастими краями, або гладенькі, круглі, із зонами гемолізу навколо них. Різні типи *C. botulinum* можуть утворювати неоднакові колонії. При посіві уколом у високий стовпчик цукрового агару колонії мають вигляд чечевичок або жмуточків вати.

Після мікроскопування типових колоній їх відсівають на середовище Кітта-Тарощі, отримують чисту культуру та ідентифікують її за морфологічними, культуральними, токсигенними та біохімічними властивостями шляхом посіву в середовища Гісса. Палички ботулізму ферментують глюкозу, галактозу, гліцерин, мальтозу, сахарозу, фруктозу до кислоти і газу, розріджують желатин, виділяють H_2S , не утворюють індол. Для диференціації *C. botulinum* від інших анаеробів використовують і інші тести (табл. 54).

Таблиця 54

Диференціальна характеристика анаеробних мікроорганізмів

Вид	Рухливість	Лецитіназа	Ліпаза	Ферментація			Індол
				Глюкоза	Лактоза	Маніт	
<i>C. botulinum</i>	+	-	+	+	-	-	-
<i>C. difficile</i>	±	-	-	+	-	+	-
<i>C. histolyticum</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>C. novyi</i>	+	+	+	+	-	-	-
<i>C. perfringens</i>	-	+	-	+	+	-	-
<i>C. septicum</i>	+	-	-	+	+	-	-
<i>C. sordellii</i>	+	+	-	+	-	-	+
<i>C. sporogens</i>	+	-	+	+	-	-	-
<i>C. tetani</i>	+	-	±	-	-	-	±

Визначення сероварів збудника ботулізму здійснюють за допомогою реакції нейтралізації токсину *in vivo*, методом ІФА або в РНГА.

Методика виділення *C. perfringens* при харчових отруєннях викладена в розділі анаеробної газової інфекції.

Правець

Правець (стовбняк) – гостра ранова інфекція людей і тварин, що розвивається в результаті ураження токсином нейромоторних клітин спинного і головного мозку, проявляється розвитком тонічних і тетанічних скорочень м'язів. Збудник – *Clostridium tetani* – тонкий, довгий, рухливий мікроб із термінальною круглою спорою, яка надає йому вигляд барабанної палички. Вона має O- і H-антигени, за характером яких збудник правця поділяють на 10 серотипів, але всі вони виділяють однаковий, тототжний токсин.

Джерелом правцевих клостридій є тварини (вівці, коні, кози, корови, свині), у кишечнику яких вони постійно знаходяться у складі нормальної мікрофлори. Із фекаліями тварин мікроби потрапляють у ґрунт, переходять у спорову форму і зберігаються роками. Хвороба розвивається лише тоді, коли збудник проникає в організм через ушкоджену шкіру, м'язи, слизову оболонку при пораненнях, ін'єкціях, опіках, обмороженнях, пролежнях тощо.

Мікробіологічні дослідження з метою діагностики правця проводять рідко. Клінічна картина хвороби настільки характерна, що необхідність вдаватися до бактеріологічної діагностики просто відпадає. Лише у випадках нетипового або летального її перебігу, при розвитку правця після підпільних абортів чи пологів у домашніх умовах, а також коли виникає правець новонароджених, такі дослідження необхідно рекомендувати. Значно частіше проводять виявлення *C. tetani* у шовних і перев'язувальних матеріалах, лікарських препаратах для парентерального введення, у пробах ґрунтів тих регіонів, де реєструється висока захворюваність на стовбняк.

Взяття матеріалу. Від хворих на дослідження беруть гній, рановий вміст, ексудат, шматочки некротизованих тканин, тампони з рани, сторонні тіла; від померлих – кров, рановий вміст, старі рубці, селезінку. У випадках виникнення правця після абортів і пологів досліджують виділення та біоптати з вагіни і матки; при захворюванні новонароджених – виділення з пупка. Всі матеріали негайно направляють до бактеріологічної лабораторії краще в спеціальних транспортних середовищах, захистивши їх від згубної дії кисню повітря.

Первинна бактеріоскопія. Із патологічного або секційного матеріалів виготовляють декілька мазків та препаратів-відбитків, забарвлюють за Грамом, Ожешко (для виявлення спор) і мікроскопують під імерсійною системою. Наявність у мазках довгих грампозитивних паличок з круглими термінальними спорами при відповідній клінічній картині дає змогу запідозрити присутність *C. tetani* (рис. 73).

Але на основі лише мікроскопічного дослідження не можна робити висновок, оскільки в матеріалі можуть бути подібні за морфологією непатогенні мікроорганізми (*C. pseudotetanicum*, *C. tetanomorphum*).

Бактеріологічне і біологічне дослідження. Отриманий в лабораторії матеріал розтирають у стерильних ступках із піском, добавляючи середовище для контролю стерильності до отримання 10 % суспензії. Рідку фазу матеріалу розділяють на дві рівні частини, одну з яких прогрівають при 80 °С протягом 20 хв. Це при-

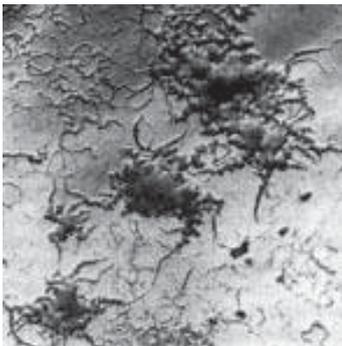
Рис. 73. *C. tetani*.

забрудненні проб сторонньою мікрофлорою до агару ще додають неоміцин, гентаміцин або налідиксову кислоту в кількості 40-50 мкг/мл.

Посіви інкубують в анаеробних умовах при температурі 37 °С протягом 48-72 год. Колонії *C. tetani* на кров'яному агарі плоскі, напівпрозорі, з нерівними краями, нерідко у вигляді переплетених ниток, що нагадують павучків. Навколо колоній виникає зона гемолізу (рис. 74). Якщо колонії відсутні, роблять висів із середовищ накопичення на кров'яний агар. При посіві уколом у високий стовпчик цукрового агару колонії *C. tetani* нагадують хмаринки або жмуточки вати.

Виділену чисту культуру ідентифікують за морфологічними, культуральними ознаками і обов'язково шляхом визначення токсигенності, яка є вирішальним тестом при діагностиці правця. Для виявлення токсичної дії культури або первинного досліджуваного матеріалу ставлять біологічну пробу нейтралізації токсину правцевою сироваткою на тваринах.

Правцевий токсин отримують шляхом вирощування культури в середовищі Кітта-Тароцці протягом 2-3 діб з наступною фільтрацією або центрифугуванням бульйону. Двом білим мишам внутрішньом'язево (біля кореня хвоста) вводять по 0,5 мл суміші фільтрату з правцевою антитоксичною сироваткою (200 МО). Суміш попередньо витримують у термостаті 40-60 хв. Спостереження за мишами проводять протягом 4-5 діб. Якщо у фільтраті містився правцевий екзотоксин, заражені миші гинуть при явищах висхідного правця. Контрольні тварини залишаються живими. Аналогічно біопробу ставлять і з досліджуваним матеріалом (розтерті в ізотонічному розчині шматочки тканин, гній, ексудат тощо). Виникає така ж сама клінічна картина правця, як і після введення токсину, а антисироватка нейтралізує присутній токсин.

Рис. 74. Колонії *C. tetani*.

зводить до загибелі вегетативних клітин бактерій і значно підвищує шанси на виділення *C. tetani*. Далі грітій і негрітій матеріал досліджують паралельно.

Для нагромадження анаеробних клостридій обидві порції висівають у дві пробірки з середовищем Кітта-Тароцці (або тіогліколевим бульйоном). Одночасно для отримання ізольованих колоній роблять посів на чашку з анаеробним кров'яним агаром такого складу: до еритрит-агару додають 10 % середовища 199, 10 мкг/мл метадіону, 10 мкг/мл геміну, 10 мг/мл цистину, 0,1 % твіну – 80 і 5 % дефібринованої крові барана або кролика. При сильному

Для виявлення правцевого токсину в середовищах накопичення, а також для ідентифікації виділеної чистої культури *C. tetani* використовують високоспецифічну й більш економічну реакцію непрямої гемаглютинації. У ряді лунок полістироло-

вої пластини роблять розведення культуральної рідини в буферному розчині з кроплячою інактивованою сироваткою від 1:10 до 1:1280. Потім у кожен лунку вносять по 0,1 мл правцевого еритроцитарного антигільного діагностичного (суспензія еритроцитів барана, сенсibiliзованих правцевою антитоксичною сироваткою). Пластини з лунками вміщують у термостат на 60 хв, потім залишають при кімнатній температурі. Попередній результат враховують через 3 год, остаточний – через 18 год. При наявності правцевого токсину в ряді лунок проявляється феномен гемоглютинації.

Для ідентифікації *C. tetani* в різних об'єктах можна використовувати люмінесцентно-серологічний метод, застосувавши протиправцеву антимікробну сироватку, мічену ізотіоціанатом флуоресцеїну, а також метод імуноферментного аналізу.

Спеціально для виділення чистої культури збудника правця Філдс запропонував оригінальний спосіб: кілька крапель прогрітого при 60 °С протягом 90 хв досліджуваного матеріалу або культури із рідкого середовища накопичення сіють у конденсаційну рідину на дні пробірки зі скошеним кров'яним чи сироватковим агаром. Посів вирощують 18-24 год в умовах строгого анаеробіозу. Збудник правця завдяки своєму повзучому росту, обумовленому джгутиками, росте у вигляді тоненької плівки по всій поверхні середовища. З верхньої частини плівки роблять 3-5 таких пересівів до отримання чистої культури.

Серологічний метод діагностики правця практично не використовується. Лише для контролю ефективності вакцинації правцевим анатоксином (визначення рівня антитоксину в крові) вибірково проводять постановку реакції нейтралізації, РНГА, ІФА.

Ранова анаеробна газова інфекція

Анаеробна газова інфекція (клостридіальний міозит, газова гангрена) – гостра, тяжка, поліетіологічна ранова інфекція, яку викликають бактерії роду *Clostridium* в асоціації між собою і умовно-патогенними мікроорганізмами. Основними збудниками захворювання є *Clostridium perfringens*, *C. novyi (oedematiens)*, *C. septicum* (див. вкл., рис. 17). Значно рідше зустрічаються *C. histolyticum*, *C. sordellii*, *C. fallax*. Із аеробних бактерій у рановому вмісті виявляють протей, стафілококи, кишкові палички та ін. *C. perfringens* може викликати харчові токсикоінфекції.

В якості досліджуваного матеріалу беруть шматочки уражених тканин, рановий вміст, ексудат, випіт при набряках; при харчових токсикоінфекціях – блювотні маси, промивні води шлунка, випорожнення, кров, залишки підозрілої їжі. В разі необхідності досліджують перев'язувальний та шовний матеріал (шовк, кетгут), одяг, ґрунт, секційний матеріал (шматочки некротизованих тканин, печінки, селезінки). З метою попередження шкідливої дії кисню повітря на анаеробну мікрофлору тверді матеріали для дослідження краще брати у короткі пробірки, що герметично закриваються. Рідкі досліджувані матеріали можна набирати у шприц, на голку насадити гумовий корок і в такому вигляді транспортувати до лабораторії.

Мікробіологічна діагностика газової гангрени зводиться до виділення чистих культур збудників, їх ідентифікації на основі морфологічних, культуральних і біохімічних властивостей та визначення типів токсинів.

Бактеріоскопія є необхідним етапом для орієнтації в характері ранової мікрофлори. Для цього готують мазки-відбитки з уражених тканин, ексудату чи випоту, забарвлюють за Грамом або метиленою синькою. Наявність у мазках великої кількості крупних грампозитивних паличок зі спорами чи капсулами (*C. perfringens*) або без них може служити ознакою можливого розвитку газової гангрени (рис. 75).



Рис. 75. *C. Perfringens*: 1 – вегетативні форми; 2 – капсули; 3 – спори.

З метою орієнтовної ідентифікації кластридій можна використати люмінесцентно-серологічний метод, коли мазки обробляють діагностичними флуоресцентними сироватками. За видом сироватки, яка викликає специфічне світіння навколо оболонки бактерій під люмінесцентним мікроскопом, визначають вид збудника.

Бактеріологічне дослідження. Рідкі досліджувані матеріали сіють у нативному вигляді. Шматочки уражених тканин та інші щільні матеріали спочатку гомогенізують у фарфорових ступках з піском, додаючи рівний об'єм ізотонічного розчину хлориду натрію. Будь-який матеріал розділяють на 2 частини; одну з них прогривають 20 хв при 80 °С, другу не піддають термічній обробці. Обидві проби паралельно висівають на спеціальні сердовища для культивування анаеробних мікроорганізмів.

Для первинного накопичення анаеробів широко використовують середовище Кітта-Тароцці. На ньому *C. perfringens* росте з інтенсивним помутнінням і бурхливим газоутворенням. Інші види утворюють помутніння і менше виділення газу або без нього (*C. histolyticum*). При посіві на стерильне знежирене лакмусове молоко *C. perfringens* вже через 4-5 год викликає його звуження з утворенням цегляного кольору губчастого згустка, який газ підіймає на поверхню пептонізованої рідини.

Класичним середовищем для отримання ізольованих колоній є кров'яний цукровий агар Цейслера (до МПА додають 1,5 % дефібринованої крові і 2 % глюкози). Чашки з посівами вирощують в анаеростаті. На цьому агарі колонії основних збудників мають гладеньку дископодібну форму сіруватого кольору з рівними або бахромчастими краями і піднятим центром, оточені зоною гемолізу (рис. 76).

На середовищі Вілліса-Хоббса (МПА з лактозою, індикатором нейтральним червоним, яєчним жовтком і знежиреним молоком) колонії *C. perfringens* червоного кольору і зоною опалесценції; колонії *C. novyi* безбарвні (не розкладають лактози), але із зоною опалесценції; колонії *C. septicum* червоні; навколо колоній *C. histolyticum* є зона провітлення.

Колонії *C. histolyticum*, *C. sordellii* безбарвні, а ореол опалесценції мають лише колонії *C. sordellii*. На кров'яному агарі з бензидином колонії *C. novyi* чорніють після перебування на повітрі.

При посіві матеріалу уколом у стовпчик агару Вільсона-Блера вже через 3-4 години в ділянках росту *C. perfringens* середовище чорніє. Характерні особливості росту на молоці і середовищі Вільсона-Блера використовують для експрес-діагностики газової гангрени, викликаної *C. perfringens*.

Колонії, що виростили на диференціально-діагностичних середовищах, мікроскопують, пересівають на середовище Кітта-Тароцці, отримують чисту культуру й ідентифікують її за морфологічними, культуральними і біохімічними властивостями. Важливе значення має визначення типів екзотоксинів.

При відсутності анаеростатів та інших приладів для створення анаеробних умов ізольовані колонії, а отже й чисті культури, можна отримати шляхом посіву різних розведень досліджуваного матеріалу у трубки Вільяль-Вейона за методом Вейнберга. Матеріал розводять 1:10, 1:100, 1:1000 у розтопленому і охолодженому до 45 °С цукровому агарі, розлитому в пробірки по 10 мл. Із кожного розведення агар натягують у трубки, а капілярний кінець запаюють на вогні. Після інкубації при 37 °С трубки розпилюють надфілем, стовпчик агару з характерними колоніями анаеробів виштовхують у стерильну чашку Петрі. Потім колонії петлею пересівають у середовище Кітта-Тароцці, вирощують чисті культури й ідентифікують їх.

У ряді розвинутих країн організовані спеціальні лабораторії, в яких використовують сучасні апарати і тест-системи для культивування й ідентифікації анаеробів, а також бокси, де всі посіви, пересіви та інші маніпуляції проводять при повній відсутності кисню повітря.

Однак у рутинних бактеріологічних лабораторіях виділення і повну ідентифікацію чистих культур проводять рідко, оскільки весь процес займає багато часу, вимагає складних і дорогих живильних середовищ та спеціальних приладів. У зв'язку з цим для більш швидкої діагностики анаеробної газової інфекції і вибору відповідних лікувальних антитоксичних сироваток проводять визначення типів екзотоксинів за допомогою реакції нейтралізації *in vivo*.

Біологічні дослідження. Для постановки тесту нейтралізації використовують видові діагностичні антитоксичні сироватки, центрифугати (фільтрати) бульйонних культур і білих мишей, масою 16-18 г. У 6 пробірок вносять по 0,9 мл

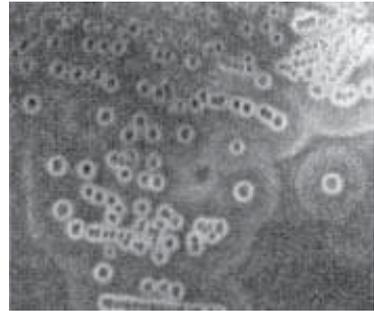


Рис. 76. Зони гемолізу навколо колоній *C. perfringens*.

центрифугату, потім у 5 з них додають по 0,6 мл антитоксичних сироваток до основних видів збудників (табл. 55). У 6-у пробірку вносять 0,6 мл ізотонічного розчину хлориду натрію (контроль). Суміші витримують у термостаті протягом 40 хв і кожну з них в об'ємі 0,5 мл вводять внутрішньовенно двом мишам. Видову належність культури (токсину) визначають за мишами, що вижили, при загибелі тварин контрольної та інших дослідних груп.

У лабораторіях, де є можливість працювати з культурами тканин, реакцію нейтралізації ставлять на трипсинізованих клітинах 10-12 денних курячих ембріонів.

Токсигенність можна визначити ще на етапі росту ізольованих колоній. Для цього колонію емульгують на склі у краплі акридинового оранжевого, накривають покривним скельцем і досліджують під люмінесцентним мікроскопом. Наявність тільки зелених паличок свідчить про їх токсигенність. Червоні або зелені з червоними фрагментами бактерії виявляють при слабкій продукції токсинів або при повній їх відсутності.

Можна встановити вид і тип токсину в реакції преципітації на склі у агаровому гелі з фільтратом та відповідними антисироватками в реакції гальмування *in vitro* специфічними антитілами лецитиназної чи лейкоцитоксичної активності фільтратів або ранових ексудатів.

Ще швидше і точніше встановлюють види збудників газової гангрені за допомогою газової хроматографії, яка дозволяє визначати їх за якісним і кількісним вмістом насичених і ненасичених жирних кислот.

Діагностику харчових токсикоінфекцій, викликаних *C. perfringens* типів А і С, проводять за допомогою бактеріологічного дослідження з метою виділення збудника, визначення масивності контамінації ним харчових продуктів і типу токсинів.

Виділення чистих культур проводять так само, як і при анаеробній газовій інфекції (висів матеріалу на середовища Цейслера, Вілліса-Хобса або в трубки Віньяль-Вейона, отримання ізольованих колоній, чистих культур, ідентифікація).

Таблиця 55

Схема постановки реакцій нейтралізації на білих мишах

№ пробірок	Центрифугат культури, мл	Антитоксичні сироватки					0,85% розчин NaCl
		<i>C.perfringens</i>	<i>C.novyi</i>	<i>C.septicum</i>	<i>C.sordellii</i>	<i>C.histolyticum</i>	
1	0,9	0,6 мл 50МО					
2	0,9		0,6 мл 50МО				
3	0,9			0,6 мл 100МО			
4	0,9				0,6 мл 100МО		
5	0,9					0,6 мл 100МО	
6	0,9						0,6 мл

При цьому обов'язково сіють 10 мл крові хворого в 150-200 мл середовища Кітта-Тароцці з метою виділення *C. perfringens*. Із фільтратом культури важливо поставити реакцію нейтралізації на мишах для визначення типу екзотоксину.

Важливо провести і кількісний мікробіологічний аналіз. Для цього досліджуваний матеріал розводять у пептонній воді від 10^{-1} до 10^{-10} і по 1 мл кожного розведення засівають у розтоплене і охолоджене до 45 °С середовище Вільсона-Блера. Через 6-8 год інкубації при температурі 45-46 °С (або 20 год при 37 °С) відбирають ті проби, в яких виросло 10-30 колоній, і обчислюють кількість бактерій в 1 мл посівного матеріалу, враховуючи ступінь розведення і посівну дозу.

Для швидкого виявлення *C. perfringens* досліджуваний матеріал сіють у пробірку з лакмусовим молоком. Через 4-5 год відбувається характерне утворення губчастого згустка і просвітлення сироватки.

Діагноз харчової токсикоінфекції встановлюють тоді, коли виявляють значне обмінення (10^6 і більше в 1 г) тих продуктів, що спричинили захворювання, виділяють *C. perfringens* типів А і С і відповідні екзотоксини, або ж висівають з крові хворого *C. perfringens* будь-якого серотипу (А, В, С, D, Е, F).

Діагностика псевдомембранозного коліту. *C. difficile* є частим нозокоміальним патогеном, який у 90-100 % випадків викликає це захворювання на фоні нераціональної терапії антибіотиками (ампіцилін, кліндаміцин, цефалоспорины). Вказані препарати викликають глибокий дисбаланс мікрофлори кишечника і колонізацію слизової *C. difficile*. Бактерії продукують 2 види токсинів – ентеротоксин (токсин А) і цитотоксин (токсин В).

Лабораторний діагноз псевдомембранозного коліту потребує взяття псевдомембран при колоноскопії і виділення збудника з біопатів слизової оболонки сліпої кишки або випорожнень. *C. difficile* висівається майже від усіх хворих за допомогою тих же методів, що і при інших анаеробних інфекціях. “Золотим стандартом” є цитотоксичний тест: фільтрат фекалій або культури вносять у флакон з моношаром культури клітин, в результаті цього виникає цитопатична дія, що нейтралізується специфічною антисироваткою. На жаль, він досить громіздкий і забирає багато часу.

Швидка латекс-аглютинація застосовується часто, але вона не є високо-специфічною і часто дає хибно-позитивні і хибно-негативні результати. Більш точним і високоспецифічним є імуноферментний аналіз, який дає змогу надійно виявляти цитотоксин і ентеротоксин *C. difficile*.

Бактеріодози

Анаеробні інфекції можуть викликати не лише кластридії, а й грамнегативні поліморфні аспорогенні бактерії з родини *Bacteroidaceae*. Найчастіше гнійно-септичні процеси спричиняють представники родів: *Bacteroides* (*B. fragilis*); *Prevotella* (*P. melaninogenicus* та ін.); *Fusobacterium* (*F. nucleatum*, *F. necrophorum*); *Veillonella* (*V. atypica*, *V. parvula*). Захворювання, що вони викликають, дістали назву бактеріодозів, фузобактеріозів, вейлонельозів. Це можуть бути септицемії, апендици-

ти, перитоніти, менінгіти, абсцеси, гангрени органів, виразки шкіри, ураження дихальних і сечостатевої шляхів тощо. Часто вони виникають як ускладнення після оперативних втручань на товстому кишечнику, сечових шляхах, матці, в ротовій порожнині.

Діагностика бактеріодозів. Єдиним ефективним методом розпізнавання захворювань, викликаних бактеріодами, є бактеріологічний. Принцип взяття і транспортування досліджуваних матеріалів (кров, ліквор, гній, харкотиння, сеча, кал, шматочки уражених тканин та ін.) такі самі, як і при анаеробній газовій інфекції. Слід уникати контакту проб з атмосферним повітрям. Найбільш оптимальним є взяття аспіратів і доставка їх у шприцах з видаленим повітрям.

Після первинної мікроскопії матеріалу його сіють на спеціальні живильні середовища (кров'яний, сироватковий, тіогліколевий агар з додаванням екстрактів з мозкової тканини, геміну, вітаміну К). Культивують у строгих анаеробних умовах в атмосфері 10 % CO₂ при 37 °С.

У мазках, забарвлених за Грамом, *B. fragilis* мають вигляд прямих або трохи зігнутих грамнегативних паличок, без спор і капсул, розташованих поодинокі, парами або короткими ланцюжками з 3-4 клітин (див. вкл., рис. 18). При забарвленні метиленовим синім часто фарбуються біполярно.

Бактеріоди ростуть повільно (5-7 днів). Колонії *B. fragilis* дрібні (до 1 мм), трохи вгнуті, сірувато-білі, без зон гемолізу. *B. melaninogenicus* на кров'яних середовищах утворює гладенькі або шорсткі колонії діаметром 1-3 мм чорного кольору, інколи із зоною гемолізу навколо них.

Виділені чисті культури ідентифікують за морфологічними, культуральними і біохімічними властивостями. Штами *B. fragilis* розкладають глюкозу, лактозу, сахарозу, не ферментують рамнозу, не утворюють індолу, але виділяють сірководень. Ключові ознаки для ідентифікації виду – ріст на середовищі з 20 % жовчних солей, резистентність до канаміцину (100 мкг), ванкоміцину (5 мкг) і колістину (10 мкг), яку визначають методом дисків.

Культури *B. melaninogenicus* розкладають глюкозу, лактозу і сахарозу, не ферментують маніт, гідролізують крохмаль і глікоген. Ключовими ознаками виду є утворення пігменту, відсутність росту на жовчних середовищах, чутливість до колістину, стійкість до ванкоміцину і канаміцину.

Слід пам'ятати, що бактеріодози є класичними поліінфекціями. У зв'язку з цим монокультури виділяються рідко, а частіше у вигляді асоціацій із кластридіями, фузобактеріями, вейлонелами. Це значною мірою ускладнює проведення мікробіологічної діагностики. Монокультури бактеріодів легко виділити при поєднанні крові та спинномозкової рідини.

При септицеміях, тяжких запальних і гангренозних процесах у крові хворих швидко і в значних кількостях виробляються антитіла. Це дає можливість провести серологічні дослідження. Високі титри антитіл визначають за допомогою реакцій аглютинації, преципітації в гелі і непрямой гемаглютинації.

Діагностика фузобактеріозів. Гнійні і гангренозні процеси, особливо в ротовій порожнині, в верхніх дихальних шляхах і сечостатевої органах можуть спри-

чинити і фузобактерії. Лабораторну діагностику захворювань проводять за тими ж методами, що і при інших анаеробних інфекціях. Використовують мікроскопічний, бактеріологічний і біологічний методи.

Бактеріоскопічні дослідження проводять при діагностиці уражень шкіри і слизових оболонок. Матеріал для виготовлення мазків беруть на межі здорової і ураженої тканини. Для забарвлення використовують метод Грама або Лефлера. При мікроскопії *F. nucleatum* і *F. necrophorum* виглядають як довгі грамнегативні бактерії веретеноподібної форми із загостреними кінцями, інколи з гранулами в середині клітин. Вони не мають ні спор, ні капсул.

Для бактеріологічного дослідження беруть гній із виразок або порожнин при ураженні внутрішніх органів. Посіви роблять на сироватковій і кров'яній середовища. Асцитична рідина, цистеїн, екстракт із дріжджів і вуглекислий газ стимулюють ріст фузобактерій. Вони ростуть у присутності генціанового фіолетового та інших барвників, що використовують для виготовлення селективних середовищ. На печінковому або серцево-мозковому бульйоні з глюкозою під вазеліновим маслом фузобактерії утворюють гранулярний і слизовий осад та помутніння з характерним запахом сиру. На сироватковому агарі в строго анаеробних умовах вони ростуть у вигляді маленьких (1-2 мм), круглих, опуклих, непрозорих колоній із жовтуватим центром. На кров'яному агарі навколо них виникають зони гемолізу.

В разі отримання чистих культур їх ідентифікують за морфологічними, культуральними і біохімічними ознаками. Ріст фузобактерій пригнічують жовчні кислоти, колістин і канаміцин, але не ванкоміцин. Вони утворюють велику кількість масляної кислоти.

Практичне значення має виявлення симбіозу *Fusobacterium necrophorum* і *Treponema vincentii* при ерозивно-некротичній ангіні Симановського-Плаута-Венсана, а також при ерозивно-некротичних ураженнях чоловічих і рідше жіночих статевих органів.

Мікробіологічна діагностика цих захворювань часто обмежується мікроскопічним дослідженням патологічного матеріалу (рис. 77).

Біологічний метод частіше використовують при роботі з сильно забрудненим сторонньою мікрофлорою матеріалом, який вводять білим мишам підшкірно біля кореня хвоста. Після загибелі тварин у місці некрозу на межі здорової і ураженої тканини легко виявляють збудника мікроскопічно або виділяють його чисту культуру при некротичній ангіні.

Діагностика вейлонельозу. Дрібні, грамнегативні аспорогенні анаеробні коки (вейлонели) постійно знаходяться в ротовій порожнині, дихальних шляхах і кишечнику як представники фонових мікробіоценозів. Самостійно вони рідко спричиняють розвиток патологічних процесів. Частіше в асоціації з іншими патогенними анаероба-



Рис. 77. *F. necrophorum* (1) і *T. vincentii* (2).

ми і аеробами здатні викликати абсцеси м'яких тканин, ранові інфекції і навіть септичні стани.

При лабораторній діагностиці вейлонельозу патологічний матеріал досліджують мікроскопічно і бактеріологічно. У мазках, забарвлених за Грамом, *V. atipica* і *V. parvula* мають вигляд кокоподібних бактерій діаметром 0,3-0,5 мкм, що розташовуються парами, короткими ланцюжками або хаотичними скупченнями.

На молочному агарі в анаеробних умовах основні види вейлонел утворюють непрозорі, ромбо- або зіркоподібні колонії розміром 1-3 мм. Вони не виділяють каталазу, не розкладають вуглеводів, не розріджують желатин, не утворюють індол, стійкі до ванкоміцину (500 мкг). Виділено декілька сероварів кожного виду, але серологічна ідентифікація вейлонел у звичайних бактеріологічних лабораторіях не проводиться.

Пептококові і пептострептококові анаеробні інфекції. В окремих випадках гнійні і гнійно-септичні захворювання (плеврит, тонзиліт, пієліт, цистит, апендицит, післяпологовий сепсис, нагноєння ран та ін.) викликають грампозитивні коки родини *Peptococcaceae*. Ці умовно-патогенні мікроорганізми належать до двох родів: *Peptococcus* (основні види – *P. niger*; *P. activus*) і *Peptostreptococcus* (*P. anaerobius*, *P. productus*, *P. prevotii*). Вони належать до фонові мікрофлори слизових оболонок і порожнин здорових людей. Від хворих виділяються переважно в асоціаціях з іншими бактеріями і дуже рідко як монозбудники.

Матеріалом для дослідження служить гній, слиз, кров, сеча, випорожнення, рановий вміст тощо. Лабораторна діагностика включає мікроскопію клінічного матеріалу і посіви з метою виділення чистих культур чи їх асоціацій.

У мазках, забарвлених за Грамом, пептококи дуже нагадують стафілококів. Вони розташовуються групами, парами, тетрадами. Пептострептококи мають кулясту або овоїдну форми, розташовуються у вигляді ланцюжків, рідше парами.

Для посівів найчастіше використовують кров'яний агар (краще з додаванням геміну, вітаміну К, неоміцину), рідше – агар на основі настою серця бика і тканини мозку, середовище для вирощування бруцел, тіогліколевий бульйон. На кров'яних середовищах в анаеробних умовах через 48 год колонії пептококів і пептострептококів дрібні, круглі, опуклі, як правило, прозорі. Колонії *Peptostreptococcus anaerobius* дещо більші за розміром, каламутні, мають характерний солодкуватий запах. Штами *Peptococcus niger* утворюють чорні колонії. Культури анаеробних коків не чутливі до дії неоміцину, який пригнічує ріст грамнегативних бактерій, особливо протею, що полегшує виділення культур із матеріалів, густо контамінованих супутньою мікрофлорою. *Peptostreptococcus anaerobius* дуже чутливий до атенолсульфату натрію, що використовують для диференціальної діагностики методом дисків.

Виділені культури анаеробних коків ідентифікують за морфологічними, культуральними і біохімічними ознаками. Пептококи не розкладають вуглеводів, не розріджують желатин, але виділяють сірководень. *Peptostreptococcus anaerobius* ферментує лише глюкозу, а *Peptostreptococcus productus* – глюкозу, лактозу, мальтозу, маніт і ксилозу, звурджує молоко.

Серологічні методи діагностики поки що тільки розробляються.

Дифтерія

Дифтерія – гостра, переважно дитяча інфекційна хвороба, яка проявляється характерним фібринозним запаленням у місці локалізації збудника та сильною інтоксикацією організму дифтерійним екзотоксином. Збудником її є *Corynebacterium diphtheriae*, що належить до роду коринебактерій. До цього роду входить ще біля 20 видів бактерій, патогенних для людей, тварин і рослин. З них найбільше значення для практичної медицини мають наступні:

1. *C. ulcerans* – може викликати фарингіти, ураження шкіри; її виявляють і в здорових людей, у молочних продуктах і тарі для їх перевезення; деякі штами токсигенні.

2. *C. jeikeium* (раніше коринебактерії JK) – спричиняє пневмонію, ендокардит, перитоніт, інфікує рани, шкіру.

3. *C. cistitidis* (раніше коринебактерії групи D2) – ініціює утворення камінців у сечовивідних шляхах та пневмонію.

4. *C. minutissimum* – викликає еритразми, абсцеси легень, ендокардити.

5. *C. haemolyticum* – може викликати тонзиліти, целюліти, абсцеси мозку, остеомієліти, хронічні дерматити.

6. *C. xerosis* – раніше вважали збудником ксерозу (хронічного кон'юнктивіту), тепер її відносять до сапрофітів.

7. *C. pseudodiphtheriticum* – сапрофіт, проживає на слизовій оболонці носоглотки людини.

Взяття і доставка матеріалу до лабораторії. Матеріалом для дослідження є плівка з мигдаликів, дужок, піднебіння, язичка, слиз із зіва та носа, рідше виділення з ока, вуха, рани, піхви, ураженої ділянки шкіри. На вимогу епідеміолога досліджують змиви з іграшок та інших предметів, деякі харчові продукти (молоко, морозиво тощо). Матеріал потрібно брати до початку етіотропного лікування натще або через 2 год після прийому їжі.

Для взяття матеріалу використовують тампони, сухі або попередньо змочені 5 % розчином гліцерину, вміщені в пробірку й простерилізовані разом з нею. Досліджуваний матеріал із ротоглотки і носа беруть двома окремими тампонами, намагаючись взяти його на межі здорової й ураженої ділянки обертальними рухами, не торкаючись тампоном слизової щік, зубів та язика, який притискають шпателем. При ларингоскопії плівку або слиз беруть безпосередньо з гортані. Плівки та слиз із рота і носа беруть обов'язково в усіх випадках, навіть при дифтерії рідких локалізацій (шкіра, рана, око, вухо, вульва).

Якщо необхідно провести первинну бактеріоскопію на вимогу лікаря, матеріал беруть окремим (додатковим) тампоном або направляють частину знятої плівки, ретельно розтертої між двома предметними скельцями.

Тампони після забору матеріалу вміщують у ті ж самі пробірки, на яких надписують номер, дату і час відбору, прізвище лікаря. Вони повинні бути доставлені до лабораторії не пізніше 3-х год після взяття матеріалу. Якщо схема забору передбачає посів біля ліжка хворого, то пробірки і чашки з посівами негайно направля-

ють до лабораторії або інкубують при 37 °С і доставляють через 20-23 год, в холодну пору в сумках із грілками.

Бактеріоскопічне дослідження матеріалу від хворого проводять лише на вимогу лікаря і тільки для того, щоб розпізнати некротичну ангіну Симановського-Плаута-Венсана (виявлення веретеноподібних паличок і спірохет Венсана, які при звичайних методах культивування не ростуть).

Впродовж багатьох років мікроскопічне дослідження і виявлення зерен волютину, забарвлених за методами Леффлера і Нейссера, було основою лабораторної діагностики дифтерії та виявлення бактеріоносійства. Тепер, у зв'язку з мінливістю дифтерійних бактерій під впливом антибіотиків, первинна мікроскопія досліджуваного матеріалу не рекомендується.

Бактеріоскопічне дослідження проводиться з метою ідентифікації нетипових колоній на кров'яно-телуритових середовищах та при перевірці чистоти виділених культур. Мазки забарвлюють за Грамом, Леффлером і Нейссером. Можна також фарбувати їх оцтовокислим метиловим фіолетовим, толуїдиновим синім або бенгіазоловим і тіазиновим барвниками.

Дифтерійні палички в мазках розташовуються під кутом, у вигляді латинських літер V, X, Y, або утворюють скупчення, що нагадують купку розкиданих сірників. Волютинові зерна розташовуються, як правило, на полюсах мікробних клітин. (див. вкл., рис. 17 і 18). Псевдодифтерійні бактерії та дифтероїди розміщуються паралельно (у вигляді "частоколу") і, звичайно, не мають зерен волютину. Зерна Бабеша-Ернста можна також виявити за допомогою люмінесцентної мікроскопії при забарвленні мазків корифосфіном. Зерна набувають оранжево-червоного кольору на фоні жовто-зелених тіл бактерійних клітин.

Бактеріологічне дослідження. Клінічний матеріал засівають на кров'яний агар і кров'яно-телуритовий агар (або середовище Клауберга II), розлиті у чашки Петрі. Посів на кров'яний агар необхідний для виявлення й іншої мікрофлори. Крім того, деякі штами *C. diphtheriae* чутливі до дії телуриту калію, тому їх ріст на телуритових середовищах може пригнічуватись. Для виявлення дифтерійного бактеріоносійства посіви роблять тільки на кров'яно-телуритовий агар, оскільки в посівному матеріалі може міститись невелика кількість дифтерійних паличок, ріст яких на неселективних середовищах буде пригнічуватись іншою мікрофлорою. При цьому допускається використання і транспортного середовища.

Кров'яно-телуриновий агар. До 100 мл 2 % розплавленого й охолодженого до 50 °С живильного агару рН 7,6 додавають 10-15 мл дефібрированої крові та 2 мл 2 % розчину телуриту калію. Суміш ретельно перемішують і розливають у стерильні чашки Петрі шаром, товщиною 3-4 мм.

Середовище Клауберга II. До 100 мл 3 % живильного агару рН 7,6, розплавленого й охолодженого до 50 °С, додають 3 мл 2 % розчину телуриту калію, 10 мл гліциринової суміші та 50 мл гемолізованої крові. Гліциринову суміш готують шляхом додавання 20 мл стерильного гліцерину до 40 мл дефібрированої крові. Суміш можна зберігати в холодильнику протягом 4-х місяців. Для приготування гемолізованої ("лакової") крові до 34 мл стерильної дистильованої води додають 16 мл дефібрированої крові.

Транспортне напіврідке середовище. До 100 мл перевару Хоттінгера або м'ясо-пептонного бульйону додають 1 г будь-якого комерційного агару, встановлюють рН 7,6, стерилізують в автоклаві при 112 °С 30 хв, асептично додають 10 мл сироватки та 1 мл 2 % телуристу калію. Середовище розливають у пробірки по 5 мл. При можливості використовують і більш складне транспортне середовище ЕМЕС (AMIES), модифіковане Стюартом.

Посів від одного хворого роблять на одну чашку, використовуючи при цьому одну половину середовища для посіву із ротоглотки (мигдаликів, дужок, язичка), а другу – для посіву іншим тампоном із носа. Якщо є досліджуваний матеріал із шкіри, ока, вуха та інших локалізацій – додають ще одну чашку. Не можна засівати матеріал від кількох хворих на одну чашку. Середовища перед посівом зігрівають у термостаті 15-20 хв.

При посіві досліджуваного матеріалу його втирають тампоном спочатку в окрему ділянку кров'яного агару площею 2×1 см, потім аналогічно на кров'яно-телуритовому агарі (або середовищі Клауберга II), при цьому тампон весь час повертають, щоб засіяти з нього весь матеріал. Потім тим же тампоном штрихами засівають решту поверхні середовища (половину чашки). Така техніка посіву дозволяє отримати ізольовані колонії (чисту культуру), які використовують безпосередньо з чашки для визначення токсигенності та подальшої їх ідентифікації. Засіяні чашки або пробірки з транспортним середовищем інкубують у термостаті при 37 °С протягом 20-24 год.

На другий день за допомогою стереоскопічного мікроскопа досліджують характер колоній. Якщо ріст відсутній на обох середовищах, роблять повторний забір матеріалу.

Чашки з типовими і підозрілими на *C.diphtheriae* колоніями відбирають для подальшої ідентифікації культури за всіма тестами. Мікроскопію підозрілих колоній можна і не проводити.

Колонії дифтерійних паличок на кров'яному агарі білуватого або жовтуватого кольору, непрозорі, круглої, злегка опуклої форми, діаметром 1-2 мм. Звичайно вони мають маслянисту консистенцію, хоч деякі можуть утворювати крихкі шорсткі R-колонії.

На кров'яно-телуритових середовищах колонії *C.diphtheriae* через 24 год росту мають сірий колір, опуклі, з рівним краєм, в'язкі. Через 48 год вони набувають темно-сірого або чорного кольору з металевим блиском, рівними або злегка фестончастими краями, гладенькою або з радіально посмуговою поверхнею (R-форми), в'язкі чи крихкі при дотику петлею.

За структурою 48-годинних колоній на телуритових середовищах і деякими ферментативними ознаками збудника дифтерії поділяють на чотири культурально-біохімічних варіанти (біовари) – *gravis*, *mitis*, *belfanti*, *intermedius*.

Біовар *gravis* звичайно утворює сірі або чорні матові сухі колонії, крихкі, плоскі, гладенькі, діаметром 1,5-2 мм, із радіально посмуговою поверхнею; він високотоксичний, не викликає гемолізу, розкладає крохмаль і глікоген.

Біовари *mitis* та *belfanti* ростуть у вигляді сірих або чорних, круглих гладеньких опуклих колоній з рівними краями, діаметром 1-1,5 мм; ці варіанти менш токсичні, викликають гемоліз, але не розкладають крохмаль і глікоген.

Біовар *intermedius* утворює дрібні, сірі, прозорі колонії, діаметром 0,5-1 мм, із плоскою гладенькою поверхнею; він слаботоксичний, не розщеплює крохмалю і глікогену (див. вкл., рис. 19 і 20).

Якщо типовий ріст відсутній, з інших, сумнівних колоній готують мазки. При виявленні в них спорових паличок, коків, дріжджів та ін., дослідження на дифтерію припиняють і дають негативну відповідь. Проте, важливо пам'ятати, що дифтерійні бактерії, які утворили нетипові колонії на середовищах з інгібіторами росту (телурит калію), можуть бути вкорочені, потовщені, але зберігають поліморфізм та характерне розташування.

При рості типових колоній відразу ж приступають до вивчення їх токсигенності та ідентифікації. Токсигенні властивості досліджують не менше як у 2-х ізольованих колоній шляхом посіву однієї половини кожної колонії на середовище для визначення токсигенності і непропаленою петлею на середовище Пізу, а другої половини – на скошений сироватковий агар для виділення чистої культури та збереження її до закінчення лабораторної діагностики. В разі, якщо на чашці виростають одночасно токсигенні та нетоксигенні різновиди *C. diphtheriae*, необхідно при множинному рості підозрілих колоній дослідити токсигенні властивості біля 20 колоній, засіваючи в одну бляшку матеріал із 5-6 колоній. При рості лише однієї колонії, її засівають на середовище для визначення токсигенності і, не прожарюючи петлю, – у пробірку із середовищем Пізу.

Якщо застосовували транспортне середовище, висів із нього роблять на щільні кров'яно-телуритові середовища.

На третій день, при появі специфічних ліній преципітації в агаровому гелі й позитивній пробі на цистиназу, виділену культуру визначають як токсигенну *C. diphtheriae*. Якщо лінії преципітації через 24 год відсутні, чашки інкубують ще протягом доби. В разі негативної проби Пізу культуру ідентифікують як інший вид коринебактерій.

Чисту культуру на скошеному сироватковому агарі висівають на вуглеводневі середовища з глюкозою, сахарозою, розчинним крохмалем, ставлять проби на виявлення уреазу, піразинамідази та нітратредуктази.

На четвертий день роблять облік результатів усіх посівів і видають аргументований бактеріологічний висновок про виділену культуру.

Використовують такі методи ідентифікації коринебактерій.

Визначення токсигенності *in vitro*. В його основі лежить взаємодія токсину з антитоксином в агаровому гелі. В місцях оптимального кількісного співвідношення токсину й антитоксину в товщі агару випадає преципітат у вигляді тонких нижніх білих ліній (“стріли”, “вусики”). Цей тест в багатьох країнах за кордоном називають Елек-тестом.

Пробу на токсигенність, як правило, проводять із чистими культурами. Можна визначити її і з культурами, забрудненими сторонньою мікрофлорою, що на добу прискорює лабораторну діагностику дифтерії. Але при негативній пробі її повторюють з виділеною чистою культурою.

Для постановки цієї проби мікробіологічна промисловість випускає спеціальне сухе стандартне середовище для визначення токсигенності дифтерійних

мікробів (ВТДМ) і стандартні паперові диски, просочені антитоксичною протидифтерійною сироваткою і висушені.

На поверхню свіжовиготовленого середовища ВТДМ накладають паперові диски з антитоксином (не більше чотирьох на одну чашку). На відстані 0,5 см від диска навколо нього засівають культури у вигляді “бляшок” діаметром 7-8 мм, чередуючи “бляшки” досліджуваної культури і контрольного штаму.

Результати враховують через 18-24 і 48 год. Критерієм специфічності преципітатів є злиття ліній преципітації досліджуваної культури з лініями токсигенного штаму (рис. 78). В такому разі виділену культуру вважають токсигенною.

При відсутності стандартних паперових дисків можна використати смужки фільтрувального паперу, просочені дифтерійним антитоксином. Їх виготовляють безпосередньо в лабораторії. Нарізані за вказаними розмірами і простерилізовані в автоклаві при 121°C протягом 30 хв паперові смужки змочують 0,25 мл очищеного дифтерійного антитоксину, який містить 500 МО в 1 мл. В такому разі на чашку з відповідним середовищем накладають змочену антитоксином смужку паперу, підсушують, відкривши чашку на 15-20 хв у термостаті й перевернувши її догори дном. Після цього з обох боків смужки засівають культури “бляшками”, чередуючи досліджувані і контрольні штами.

Для визначення токсигенності збудника дифтерії можна використати також і інші середовища (АГВ, мартенівський агар тощо), рецепти виготовлення яких наведені в “Інструкції з бактеріологічної діагностики дифтерії”, Київ (1999).

Впродовж багатьох років токсигенність дифтерійних бактерій визначали підшкірним або внутрішньошкірним введенням культури двом гвінейським свинкам, одній з яких напередодні вводять 100-1000 МО антитоксичної протидифтерійної сироватки. Тепер цей метод бактеріологічні лабораторії практично майже не використовують через дорожнечу та значну затримку відповіді.

Останнім часом розроблено дуже чутливий і високоспецифічний метод визначення гена дифтерійного токсину шляхом полімеризації ланцюгової реакції. Він базується на визначенні ділянки ДНК *C. diphtheriae*, де локалізований ген дифтерійного токсину, за допомогою специфічних праймерів. Метод має переваги перед традиційним визначенням токсигенності: високу чутливість, швидкість отримання результатів (4-6 год), не потребує виділення чистої культури. Але для його проведення необхідні спеціальна апаратура, дорогі реактиви й відповідне приміщення, а тому може бути проведений лише в спеціалізованій лабораторії. Всі нетоксигенні штами дифтерійних бактерій, які виділені від хворих та бактеріоносіїв, необхідно направляти до Українського центру держсанепіднагляду (де є така лабораторія) для остаточного визначення токсигенних властивостей *C. diphtheriae*.

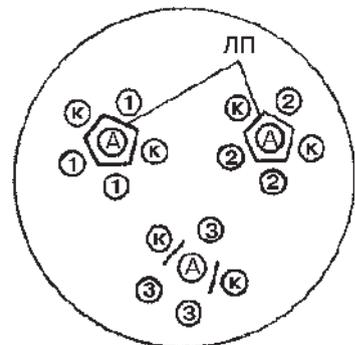


Рис. 78. Визначення токсигенності *C. diphtheriae*:

А – диски з антитоксином;

К – контрольні штами;

1, 2, 3 – досліджувані культури;

ЛП – лінії преципітації.

Визначення цистинази (проба Пізу). *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* виділяють фермент цистиназу, псевдодифтерійні бактерії та інші дифтероїди його не продукують.

Виділену культуру засівають уколом в середовище з цистином, розлите стопчиком у вузькі пробірки. Цистиназопозитивні бактерії розщеплюють цистин із виділенням сірководню, який із оцтовокислим свинцем, що входить до середовища, утворює сірчаноокислий свинець, в результаті чого середовище забарвлюється в темно-коричневий колір. *C. diphtheriae* викликає не лише потемніння середовища за ходом вколівання, а й утворює навколо нього “хмаринку” темно-коричневого кольору на відстані 1 см від поверхні. Результати враховують через 20-24 год інкубування в термостаті.

Визначення уреазу (проба Заксе). Дифтерійні бактерії цього ферменту не утворюють. Позитивну пробу на уреазу дають лише деякі інші види коринебактерій (табл. 56). Для постановки проби виділену культуру сіють на бульйон із сечовиною. Уреаза розкладає сечовину, змінює рН середовища, що супроводжується його почервонінням. Якщо фермент не виділяється, зміни забарвлення бульйону не відбувається.

Визначення піразинамідази проводять шляхом гідролізу піразинаміду до піразиної кислоти та амонію. Для цього в стерильну пробірку вливають 0,25 мл стерильної дистильованої води, в якій готують густу завесь виділеної культури, потім вносять одну діагностичну таблетку Rosko 598-21. Інкують протягом 4-х год при 37 °С, після чого додають одну краплю щойно приготовленого 5 % водного розчину сульфату амонійного заліза. При наявності ферменту суспензія набуває червоного або оранжевого кольору. Патогенні коринебактерії не виділяють піразинамідазу, а отже, й не змінюють колір суспензії.

Цукролітичні ферменти визначають шляхом посіву повної петлі виділеної культури в кожен пробірку вкороченого строкатого ряду Гісса (глюкоза, сахароза, розчинний крохмаль). Результати враховують через 24 год інкубування в термостаті. Розщеплення крохмалю може затримуватись до 48 год. Диференціація різних видів коринебактерій за основними біохімічними властивостями подана в таблиці 56.

Визначення нітратредуктази є додатковим тестом для ідентифікації *C. belfanti* і *C. ulcerans*, які не утворюють цього ферменту. У пробірку з бульйоном, до якого додають 0,1 % KNO_3 , засівають досліджувану культуру, інкують в термостаті протягом доби. Обов'язково ставлять контроль з незасіяним середовищем. В разі наявності нітратредуктази при додаванні до засіяного бульйону 3-х крапель реактиву Касаткіна виникає червоне забарвлення. Середовище в контрольній пробірці кольору не змінює.

Для ідентифікації коринебактерій останнім часом використовують паперові індикаторні диски з глюкозою, сахарозою, сечовиною та крохмалем із набору “Б” для ідентифікації ентеробактерій (фірма “ІмБіо”, м. Нижній Новгород). У 4-х пробірках готують густу завесь досліджуваної культури і в кожен з них занурюють диск із відповідним вуглеводом чи іншим реактивом. Після інкубування в термо-

Таблиця 56

Біохімічні ознаки коринебактерій

Вид	Токсигенність	Розщеплення					Нітрат-редуктаза
		сахарози	крохмалю	цистину	піразинаміду	сечовини	
<i>C.diphtheriae v.gravis</i>	±	–	+	+	–	–	+
<i>C.diphtheriae v.mitis</i>	±	–	–	+	–	–	+
<i>C.diphtheriae v.belfanti</i>	±	–	–	+	–	–	–
<i>C.diphtheriae v.interm</i>	±	–	–	+	–	–	+
<i>C.ulcerans</i>	±	–	+	+	–	+	–
<i>C.jejkeium</i>	–	–	–	–	–	–	–
<i>C.cistitidis</i>	–	–	+	–	+	+	–
<i>C.minutissimum</i>	–	+	–	–	+	–	–
<i>C.haemolyticum</i>	–	+	–	–	–	–	–
<i>C.bovis</i>	–	–	–	–	+	–	–
<i>C.pseudotuberculosis</i>	±	±	–	+	–	+	±
<i>C.pseudodiphtheriticum</i>	–	–	–	–	+	+	+
<i>C.xerosis</i>	–	+	–	–	+	–	+

статі облік виділення уреазі проводять через 40-120 хв, а визначення цукролітичної активності – через 5-24 год. При наявності уреазі білий диск із сечовиною стає рожево-малиновим, при відсутності – залишається білим. Диски з глюкозою та сахарозою при наявності відповідних ферментів вже через 5-6 год змінюють колір з червоного на жовтий. При визначенні амілази в пробірку з відповідним субстратом додають індикаторний диск з йодом. Якщо ферменту немає – з'являється темно-синє забарвлення, якщо є – колір розчину залишається без змін.

Коклюш і паракклюш

Коклюш (кашлюк) – гостра, переважно дитяча інфекційна хвороба, яка викликається *Bordetella pertussis*, характеризується повітряно-краплинним механізмом передачі, катаральним запаленням дихальних шляхів і нападами спазматичного кашлю з репризами. *Bordetella parapertussis* і *Bordetella bronchiseptica* спричиняють подібні до коклюшу, але з легшим перебігом захворювання. Всі три види бордетел подібні між собою і належать до одного роду. Це дрібні грамнегативні овоїдні палички, які часто забарвлюються біполярно.

Збудники виділяються зі слизом і харкотинням переважно в катаральний і рідше в спазматичний періоди. У зв'язку з наявністю стертих і атипичних форм, схожістю симптомів вирішальне значення для їх діагностики мають лабораторні методи дослідження. Мікробіологічний аналіз проводять одночасно на виділення всіх трьох збудників.

Взяття досліджуваного матеріалу. Слиз із задньої стінки глотки беруть стерильним задньоглотковим ватним тампоном бажано під час нападу кашлю з обов'язковим використанням шпателя. При використанні тампонів на тонкій (напр. ніхромовій) дротинці забирати матеріал можна і через нижні носові ходи.

При негайному посіві використовують сухий тампон. Якщо це неможливо – тампон попередньо змочують розчином алгінату кальцію або ізотонічним розчином хлориду натрію, оскільки вата пригнічує ріст *Bordetella pertussis*. Взятий матеріал потрібно доставити до лабораторії протягом 2-4-ох год, оберігати його від переохолодження.

Ще краще взяти матеріал від хворого за допомогою “кашльових пластинок”. Для цього під час кашлю відкривають чашку Петрі з живильним середовищем і тримають її на відстані 4-8 см перед ротом і носом хворого протягом 6-8 кашльових поштовхів.

Для дослідження також можна брати харкотиння (слиз), відсмоктуючи його шприцом з гумовою трубкою з надгортанної зони.

Основними методами лабораторної діагностики коклюшу є бактеріологічний і серологічний. Для експрес-діагностики, особливо в ранній період хвороби, використовують реакцію імунофлуоресценції. Для цього мазки з досліджуваного матеріалу обробляють спеціальними флуоресцентними сироватками і досліджують під люмінесцентним мікроскопом. Розглядають 50 полів зору. Позитивним результат вважають тоді, коли в полі зору виявляють 2-3 бактеріальні клітини, що світяться.

Бактеріологічне дослідження. Для виділення збудника використовують такі традиційні середовища: картопляно-гліцериновий агар з кров’ю кролика (Борде-Жангу), комерційний селективно-вугільний агар (КВА) або молочно-кров’яний агар. Для пригнічення росту грампозитивної мікрофлори дихальних шляхів до середовищ рекомендують додавати пеніцилін. При посіві методом “кашльових пластинок” антибіотик наносять на поверхню агару в об’ємі 0,1 мл (10 ОД) і рівномірно втирають шпателем. При посіві тампоном роблять спочатку штрих у вигляді центральної доріжки, а потім через неї перпендикулярними штрихами петлею. Для збільшення частоти виділення збудника посіви проводять одночасно на 2 чашки (одна без пеніциліну). Вирощування проводять при 37 °С протягом трьох-п’яти діб.

Колонії на середовищі досліджують під стереоскопічним мікроскопом або за допомогою лупи. Вони дрібні, опуклі, блискучі, сіруватого кольору, нагадують краплини ртуті або перламутр. На середовищі Борде-Жангу навколо колоній виникає невелика зона гемолізу. Колонії *Bordetella parapertussis* трохи більших розмірів коричневого кольору. З типових колоній виготовляють мазки, забарвлюють за Грамом і мікроскопують. Одночасно ставлять реакцію аглютинації на склі з коклюшними і паракоклюшними сироватками в розведенні 1:10. При позитивному результаті виділяють чисту культуру бордетел і проводять її ідентифікацію за рядом ознак (табл. 57).

Бордетели не ферментують вуглеводів, не утворюють індолу, нітрати відновлює лише *Bordetella bronchiseptica*. Основне значення при ідентифікації мають особливості росту і реакції аглютинації з видовими неадсорбованими і, при можливості, з адсорбованими монорецепторними сироватками до антигенів 1, 12, 14. З метою ідентифікації виділених культур (навіть на етапі утворення колоній) можна застосувати реакцію непрямой гемаглютинації з еритроцитарним антигільним діагностиком.

Таблиця 57

Диференціація патогенних бордетел

Ознаки	<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Bordetella parapertussis</i>	<i>Bordetella bronchiseptica</i>
Швидкість росту колонії (дні)	3-4	2-3	1-2
Ріст на простому МПА	-	+	+
Рухливість	-	-	+
Коричневий пігмент	-	+	-
Уреаза	-	+	+
Оксидаза	+	-	+
Наявність специфічних антигенів	1,2,3	14	12

Серологічне дослідження проводять в основному для ретроспективної діагностики або в тих випадках, коли культура бордетел не виділена. Антитіла до збудників утворюються на третьому тижні хвороби й пізніше. Для їх виявлення використовують реакції аглютинації, зв'язування комплементу і особливо непрямой гемаглютинації. У зв'язку з масовими щепленнями дітей проти коклюшу, всі серологічні реакції необхідно ставити методом парних сироваток. Діагноз підтверджують лише при 4-кратному наростанні титру антитіл в динаміці. У дітей перших двох років життя серологічні реакції часто бувають негативними.

Алергічні проби шляхом введення внутрішньошкірно 0,1мл аглютиногена (10 ОД) проводять найчастіше при масових епідеміологічних обстеженнях.

Псевдомонадні інфекції

Псевдомонадні (синьогнійні) інфекції – гнійно-септичні захворювання, що викликаються *Pseudomonas aeruginosa*. Цю поліморфну рухливу грамнегативну бактерію протягом довгого часу відносили до групи умовно-патогенних мікроорганізмів. Але в останні 15-20 років на фоні широкого використання антибіотиків синьогнійна паличка стала значно частіше викликати різноманітні запальні процеси, включаючи і генералізовані форми: менінгіт, пневмонію, плеврит, остеомієліт, септицемію, уросепсис, отит, кератит, гнійні ускладнення травматичних, операційних і, особливо, опікових ран. Переважна більшість їх – типові внутрішньолікарняні інфекції. У багатьох стаціонарах сформувались госпітальні ековари псевдомонад, що мають виражений поліморфізм, множинну резистентність до лікарських препаратів, підвищену вірулентність.

Матеріал для лабораторного аналізу може бути дуже різноманітний, але найчастіше – це гній, рановий вміст, ексудат, сеча, жовч, ліквор, кров, випорожнення, лікарські препарати, виготовлені в лікарнях, різні об'єкти довкілля.

Найефективнішим і по суті єдиним методом лабораторної діагностики псевдомонадних інфекцій є бактеріологічний. Для успішного виділення чистих культур синьогнійних паличок важливе значення має спосіб взяття матеріалу. Його необхідно забирати до початку антибактеріальної терапії, а якщо її вже розпочали – то лише після виведення препарату з організму.

Псевдомонади добре ростуть на простих і диференціально-діагностичних середовищах (МПБ, МПА, пептонна вода, Ендо, Плоскирева та ін.) в аеробних умовах при 30-37 °С, також при 42 °С, що можна використовувати як диференціально-діагностичну ознаку. Середовищем вибору слід вважати МПА з фурагіном і 0,1 % центрамідом. Для визначення пігменту матеріал сіють у МПБ.

Характерною культуральною особливістю цих бактерій є утворення слизу, що надає характерної в'язкості бульйонним культурам і колоніям мукоїдних штамів. У зв'язку з цим на рідких середовищах утворюється особлива сірувато-срібляста плівка. При старінні культур виникає каламуть з наступним випаданням слизового осаду. Переважна більшість штамів синьогнійних паличок продукує пігмент піоціанін, що має синій колір у лужному і нейтральному середовищі і червоний – у кислому. Для визначення пігменту в підлужену до рН 8 бульйонну культуру вносять декілька крапель хлороформу і струшують. Синє забарвлення хлороформу свідчить про наявність піоціаніну. Псевдомонади інших видів (*P.putida*, *P.fluorescens*) можуть утворювати пігменти інших кольорів: червоний (піорубін) і коричнево-чорний (піомеланін).

На МПА через 24 години виростають досить крупні напівпрозорі слизуваті колонії синьо-зеленого кольору з перламутровим відтінком. Через день-два забарвлюється і само середовище. Культури часто мають специфічний запах фіалок або жасмину.

Дуже важливо знати, що при посіві на щільні середовища більшість культур *P.aeruginosa* дають феномен райдужного лізису під впливом спонтанного бактеріофагу. У відбитому світлі колонії нагадують різнобарвні плівки окисів на поверхні кольорових металів, напр., міді. Цей феномен утворюють лише синьогнійні палички, отже, його можна розглядати як таксономічну ознаку.

На агарі Плоскирева спочатку виростають колонії інтенсивного жовтого кольору, які через 48 год стають коричневими, в'язкими, важко знімаються петлею. Середовище Олькеницького чи Ресселя при рості псевдомонад не зазнає ніяких змін.

Ідентифікують виділені культури за вище вказаними морфологічними і культуральними властивостями, а також за їх біохімічною активністю. Синьогнійні палички мають слабку цукролітичну активність. Вони розкладають до кислоти лише глюкозу. Значно вища їх протеолітична дія: вони розріджують желатин і згорнуту сироватку крові, гідролізують казеїн, звурджують молоко і розріджують його згусток. Відновлюють нітрати до нітритів, виділяють оксидазу, не утворюють індол і сірководень, дають негативну реакцію Фогеса-Проскауера. Важливими диференціальними ознаками *P.aeruginosa* є визначення флуоресцюючого пігменту піоціаніну, хороший ріст при 42 °С, феномен спонтанного райдужного лізису, гемоліз на кров'яному агарі.

Серологічну ідентифікацію культур і визначення серовару можна провести (при наявності відповідних типів сироваток) в реакції аглютинації з визначенням групспецифічного О-антигену і моноспецифічних Н-антигенів. Однак схема ідентифікації псевдомонад ще потребує подальшого вдосконалення.

Інфекції, викликані гемофільними бактеріями

Часто збудником менінгіту, септицемії, пневмонії, бронхіту, отиту, ендокардиту, гострих респіраторних та вторинних інфекцій може бути *Haemophilus influenzae*. Найбільш чутливими до гемофільних бактерій є діти від 3-ох місяців до 6 років. За структурою капсульних антигенів *H. influenzae* поділяють на 6 сероварів (a, b, c, d, e, f). Тяжкі форми захворювань, особливо менінгіту, як правило, викликає серовар b. Другим патогенним представником роду гемофілів є *H. ducreyi* – збудник м'якого шанкеру. Решта 14 видів для людини не патогенні.

Матеріалом для дослідження при менінгіті служить ліквор, при септицемії – кров, при пневмонії – харкотиння, при інших процесах – гній і слиз з носоглотки, які забирають від хворих за допомогою ватних тампонів.

Мікроскопічні дослідження. Виготовлені й зафіксовані мазки забарвлюють за Грамом або водним фуksiном протягом 5 хв. При мікроскопії видно дрібні паличкоподібні грамнегативні бактерії, які не утворюють спор, але мають капсули, розташовуються поодиночці, рідше у вигляді ланцюжків. При великій кількості збудника в досліджуваному матеріалі (спинномозкова рідина, гній, слиз, харкотиння) його легко й швидко можна виявити за допомогою феномену набухання капсул або реакції імунофлуоресценції, якщо використати відповідні діагностичні сироватки.

Бактеріологічні дослідження. Чисті культури гемофільних бактерій виділяють шляхом негайного посіву досліджуваного матеріалу на спеціальні живильні середовища (кров'яний, шоколадний або серцево-мозковий агарі, середовища Левінтала чи Файлдса). Для пригнічення кокової флори до середовищ додають 15–25 ОД/мл пеніциліну. На простих середовищах гемофільні бактерії не ростуть.

Спинномозкову рідину і серозні випоти спочатку центрифугують і осад сіють петлею на одне з щільних середовищ. При септицемії сіють 10 мл крові в 100 мл рідкого середовища Файлдса. Через 24 години роблять висів на агар, де через добу виростають маленькі опуклі прозорі колонії. На шоколадному агарі колонії появляються через 36-48 год, вони трохи більші за розмірами і напівпрозорі. На кров'яному агарі з додаванням серцево-мозкового екстракту через добу виростають дрібні опуклі колонії з райдужними переливами. Колонії безкапсульних варіантів гемофіл не мають такого райдужного розцвіту. З типових колоній готують мазки й забарвлюють за Грамом. При виявленні маленьких грамнегативних паличок повідомляють лікареві попередні результати. *H. influenzae* у перших генераціях може бути в капсульній і безкапсульній формі.

Для остаточної ідентифікації виділених культур проводять реакцію набухання капсул, досліджують потреби для росту X- і Y-факторів, каталазу, оксидазу, уреазу, в-галактозидазу і гемолітичну активність, ферментацію вуглеводів, виділення індолу і сірководню.

H. influenzae продукує каталазу, уреазу, в-галактозидазу, нітратредуктазу, виділяє індол, постійно ферментує глюкозу й сахарозу. Інші з перелічених біохімічних тестів негативні. Основне значення для ідентифікації мають феномен набухання капсул і дослідження потреби для росту X- і Y-факторів. Для виявлення такої

потреби досліджуваній матеріал засівають на середовище, на поверхню якого потім кладуть стандартні смужки паперу, просочені X- і Y-факторами. Інтенсивний ріст бактерій навколо смужок (а не в інших ділянках агару) підтверджує наявність *H.influenzae*.

Серологічну ідентифікацію культур, ще на етапі отримання ізольованих колоній, можна провести за допомогою реакції аглютинації на склі з капсульним антигеном (a, b, c, d, e, f) з відповідними полі- і монорецепторними діагностичними сироватками. Виділені культури необхідно диференціювати від збудників коклюшу і паракоклюшу.

Для діагностики менінгіту, викликаного гемофільними бактеріями, використовують також метод зустрічного імуноелектрофорезу. Утворення ліній преципітації виявляє полісахаридні антигени гемофіл, що доводить етіологічну роль *H.influenzae* у виникненні захворювання.

М'який шанкер (шанкроїд) – венерична хвороба, яку викликає *Haemophilus ducreyi*, характеризується утворенням на статевих органах болючої виразки з м'яким дном, підритими краями і жовтуватим сальним вмістом. У ряді випадків утворюються декілька виразок, які зливаються між собою. Часто розвивається і регіональний лімфаденіт. Останнім часом кількість захворювань на м'який шанкер зростає.

Лабораторна діагностика не викликає будь-яких труднощів. Вона включає декілька етапів: 1) бактеріоскопію мазків із глибоких шарів виразки або з пунктів лімфатичних вузлів; 2) виділення чистих культур на тих же середовищах, на яких культивують *H.influenzae* (кров'яний, шоколадний агар, середовище Левінтала та ін.); 3) постановку алергічної проби.

Мікроскопія мазків. Для виготовлення препаратів – мазків матеріал беруть ложечкою Фолькмана з-під навислих країв виразки після її ретельного очищення ватним тампоном, змоченим ізотонічним розчином хлориду натрію. Під час забору намагаються схопити шматочки (клапті) тканин. Саме в такому матеріалі збудника виявляють найчастіше. Одночасно проводять мікроскопічне дослідження на виявлення збудника сифілісу в темному полі зору. Мазки фіксують у суміші Никифорова й забарвлюють за Грамом, фуксином Циля або метиленовим синім. Під мікроскопом *H.ducreyi* має вигляд овоїдних паличок, розташованих паралельними ланцюжками (“залізничні колії”) або парами чи групами. Вони не мають спор і капсул, часто інтенсивніше фарбуються на полюсах.

Бактеріологічне дослідження проводять рідше. Патологічний матеріал обробляють ванкоміцином (3 мкг/мл), що значно підвищує частоту виділення збудника. Посіви вирощують при 35 °С в атмосфері 8-10 % CO₂.

На щільних кров'яних середовищах через 24-48 год палички Дюкрея виростають у вигляді дрібних (1-2 мм) кулястих блискучих колоній, які нагадують ріст стрептококів. У типових випадках колонії забарвлені в жовтувато-сірий колір, оточені невеликою зоною гемолізу, яка краще виявляється пізніше.

У рідких середовищах палички Дюкрея ростуть у вигляді пухких пластівців або зерен на стінках пробірок, чи вільно плаваючих у бульйоні. В мазках із чистих

культур або окремих колоній бактерії розташовані хаотично, без утворення довгих ланцюжків. Виділені культури ідентифікують за біохімічними й антигенними властивостями. Палички Дюкрея ферментують глюкозу, лактозу, маніт, сахарозу, не мають протеолітичних властивостей. Надійнішою є серологічна ідентифікація в реакції аглютинації на склі з відповідною діагностичною сироваткою. При визначенні потреб X- і Y-факторів для росту культур важливо пам'ятати, що *H. ducreyi* потребує лише фактора X (а не Y). Цей тест використовують для диференціації збудника м'якого шанкеру від *H. influenzae*.

У зв'язку з відсутністю імунітету після перенесення хвороби, серологічні реакції для діагностики м'якого шанкеру не використовують, хоч в організмі pojawiaються комплементзв'язуючі антитіла, але в малих титрах і не у всіх хворих.

Алергічну пробу з антигеном із бактерій м'якого шанкеру проводять, починаючи з 8-го дня. Внутрішньошкірно вводять 0,1 мл алергену або вакцини *H. ducreyi*. Облік результатів проводять через 24-48 год. Вона виявляється позитивною в 90-98 % випадків.

Легіонельози

Легіонельози – групові або спорадичні захворювання людей, що спричиняються легіонелами – грамнегативними паличками родини *Legionellaceae*, яка нараховує біля 30 видів. Найчастіше хворобу викликає *Legionella pneumophila*. Розрізняють 12 серогруп цього виду, домінує серед них 1 серогрупа.

Збудники знаходяться у воді систем кондиціонування повітря, душових установок, ванн для бальнеопроцедур та відкритих водоймищ. Механізм передачі хвороби – аспіраційний.

Відомі три клінічні форми: хвороба легіонерів (тяжка пневмонія), гарячка Понтіак (респіраторне захворювання без пневмонії), гарячка Форт-Брагг (гостре захворювання з екзантемою). На гарячку Понтіак припадає 90-95 % всіх форм хвороби. Легіонельози зареєстровані у багатьох країнах світу. Спорадичні випадки виявлені і в Україні.

Матеріалом для специфічної діагностики є кров, харкотиння, плевральна рідина, легенева тканина, сеча, біоптати внутрішніх органів тощо. Використовують бактеріологічний і серологічний методи.

Бактеріологічне дослідження. Виділення чистих культур легіонел поки що доступне лише для спеціалізованих лабораторій. Збудника практично неможливо виділити з крові та харкотиння; більше шансів отримати культуру при посівах біопсійних матеріалів.

Досліджуваний матеріал не можна вміщувати в транспортні середовища або буферні розчини. Посіви на спеціальні середовища необхідно робити не пізніше години після його взяття. Найоптимальнішим середовищем для культивування легіонел є вугільно-дріжджовий агар. На ньому вже через 3 доби виростають сірі склоподібні колонії. Для виділення чистої культури із дуже забруднених матеріалів до агару додають поліміксин В і ванкоміцин. Можна виділити збудника і шля-

хом зараження гвінейських свинюк з наступним введенням гомогенатів печінки і селезінки в курячий ембріон.

Виділені чисті культури досліджують за морфологічними, культуральними, біохімічними і антигенними властивостями. Легіонели, як правило, виділяють каталазу, утилізують крохмаль, розріджують желатин, не продукують уреазу і нітратредуктазу, не ферментують вуглеводи. Важливе значення має використання флуоресцентних сироваток, особливо 1-ої серогрупи.

Для експрес-діагностики легіонельозу використовують мікроскопію імпрегнованих сріблом мазків, виготовлених з харкотиння або біоптатів. Збудник має вигляд тонких паличок довжиною 2-3 мкм і шириною 0,5-0,7 мкм. Люмінесцентна мікроскопія мазків, оброблених міченими флуоресцеїном сироватками, дає позитивні результати лише у 50% випадків. Крайці наслідки дає імуноферментний метод виявлення антигенів легіонел у сечі хворих.

Серологічний метод діагностики використовують частіше, він дає надійніші і стабільніші результати. Широко застосовують реакцію непрямой імунофлуоресценції. Діагностичним вважають титр 1:128 і вище при використанні однієї сироватки. При постановці реакції методом парних сироваток діагноз хвороби вважають серологічно підтвердженим в разі наростання титру антитіл принаймні у 4 рази. Використовують також реакції непрямой гемаглютинації, зв'язування комплекменту та імуноферментний метод.

Лістеріоз

Лістеріоз – гостра або хронічна септична хвороба людей і тварин з переважно аліментарним і контактним шляхами зараження, що характеризується ураженням полінуклеарних фагоцитів, центральної нервової системи, печінки, селезінки та інших органів. Найчастіше проявляється у вигляді ангіни, кон'юнктивіту, сепсису, менінгоенцефаліту.

Збудник – *Listeria monocytogenes* з родини *Corynebacteriaceae*, дрібна, поліморфна, грампозитивна паличка, має 8 сероварів. Найчастіше зустрічається 1-й і 4-й серовари. Джерелом інфекції є миші-полівки, хатні миші, водяні щури, рідше зайці, лисиці, білки, свійські тварини і птахи.

Матеріалом для мікробіологічного дослідження найчастіше служить слиз із носоглотки і кон'юнктиви, кров, ліквор, пунктати лімфатичних вузлів, секційний матеріал. Окрім того, досліджують м'ясо, молоко й інші харчові продукти, а при підозрі також трупи домашніх і диких тварин. Взяття матеріалу необхідно проводити дуже обережно, оскільки людина надзвичайно чутлива до лістерій.

Основу лабораторної діагностики лістеріозу складає бактеріологічне і серологічне дослідження, постановка біологічної та алергічної проб. Бактеріоскопія проводиться рідко, в основному, при дослідженні органів загиблих тварин, а також меконія новонароджених, що загинули від лістеріозного сепсису.

Бактеріологічне дослідження. У перші 7-10 днів захворювання кров (10 мл) і ліквор (3-5 мл) засівають у 100-200 мл глюкозного, глюкозно-печінкового або

глюкозно-гліцеринового бульйону. Матеріал щільної консистенції емульгують в ізотонічному розчині хлориду натрію і сіють на гліцериновий чи кров'яний агар з телуритом калію або поліміксином (1-5 мкг/мл). Якщо досліджуваний матеріал дуже забруднений сторонньою мікрофлорою, краще спочатку ввести його білим мишам або гвінейським свинкам і після їх загибелі з печінки і селезінки зробити мазки-відбитки та посіви. Засіяні середовища інкубують при 37 °С протягом 7 діб, щоденно контролюючи наявність росту шляхом бактеріоскопії.

У рідких середовищах через добу настає помутніння і утворюється складчаста плівка. На триптозному або гліцериновому агарі при дослідженні в косому освітленні колонії 24-годинного віку мають голубувато-зелений колір. У мазках із бульйонних і агарових культур лістерії виглядають як короткі, товстуваті кокобактерії, які не мають ні спор, ні капсул, розташовуються поодиночці або невеликими групами. Серовари виділених штамів визначають за допомогою реакції аглютинації з антилістеріозними сироватками, в першу чергу 1-го та 4-го сероварів. Позитивним вважають результат, якщо аглютинація відбулася в розведенні не менше 1/4 титру.

Ідентифікацію виділених культур здійснюють за морфологічними, тінкторіальними, культуральними, біохімічними і антигенними властивостями. Лістерії слаборухливі, каталазопозитивні, ферментують до кислоти глюкозу, мальтозу, салицину, не розкладають маніт і гліцерин. Свіжі культури дають позитивну кон'юнктивальну пробу у гвінейських свинок. Через 2 години після внесення краплі бульйонної культури лістерій у кон'юнктивальний мішок розвивається гнійне запалення кон'юнктиви.

Серологічне дослідження. Починаючи з другого тижня захворювання використовують реакцію аглютинації (титр 1:320-1:5000). При низькому титрі антитілу цю реакцію слід повторити. Більш достовірною і специфічною є реакція непрямой гемаглютинації (титр 1:80 і вище). Вона дає позитивні результати у 85-90 % хворих на лістеріоз після 10-13-го дня захворювання. Її застосовують і для виявлення хронічного лістеріозу. Реакція зв'язування комплементу стає позитивною у більш віддалені строки, її діагностичний титр 1:10 і вище. З діагностичною метою використовують реакцію імунофлуоресценції і рідко – реакцію преципітації.

Біологічна проба. Досліджуваний матеріал, особливо при забрудненні його супутньою мікрофлорою, вводять підшкірно білим мишам. Через три тижні при позитивному результаті у тварин виникають паралічі задніх кінцівок і порушення координації рухів. Із печінки та селезінки тварин, що загинули, роблять мазки-відбитки та посіви на живильні середовища.

Алергічну пробу із стандартним корпускулярним антигеном, або антигеном, отриманим шляхом кислотного гідролізу культури лістерій, ставлять на 6-9-й день захворювання. Його вводять внутрішньошкірно в об'ємі 0,1 мл. Результат враховують через 24-48 год. Пробу вважають позитивною, якщо виникає гіперемія шкіри та інфільтрат діаметром 1-2 см.

Туберкульоз

Туберкульоз – первинно-хронічна інфекційна хвороба людей і тварин, яку викликають патогенні мікобактерії. Залежно від локалізації уражень виділяють туберкульоз легень, шкіри, лімфатичних вузлів, мозкових оболонки, кісток і суглобів, органів сечостатевої системи і черевної порожнини. Для сучасного періоду характерне збільшення захворюваності, тяжкий перебіг, підвищення смертності і поява значної кількості штамів, резистентних до багатьох протитуберкульозних препаратів.

В Україні туберкульоз у людини найчастіше викликають *Mycobacterium tuberculosis* і *M. bovis*. Дуже рідко це захворювання спричиняє *M. avium*. В країнах Африки, Америки та інших континентів подібні до туберкульозу захворювання викликають *M. africanum*, *M. asiaticum*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. ulcerans* та ін. Ці хвороби називають мікобактеріозами. Ще один представник із роду мікобактерій – *M. leprae* – є збудником прокази. Всього нараховують понад 40 видів мікобактерій, 24 з них є патогенними і потенційно патогенними.

Лабораторна діагностика туберкульозу і мікобактеріозів включає проведення мікроскопічних, бактеріологічних, біологічних, серологічних досліджень і постановки алергічних проб. Основним методом є виділення чистої культури збудника, його ідентифікації та визначення чутливості до протимікробних препаратів.

Взяття матеріалу для дослідження. Патологічним матеріалом служать харкотиння, слиз із задньої стінки глотки, плевральний ексудат, гній, спинномозкова рідина, промивні води бронхів і шлунка, сеча, випорожнення, пунктати, рідше кров та ін. Хворий збирає харкотиння в баночку або кишенькову плювальницю. Кращі результати отримують при дослідженні харкотиння, зібраного протягом 12-24 год. Інші матеріали збирають у стерильні банки або пробірки. На них наклеюють етикетку з прізвиськом та ініціалами хворого, групу диспансерного обліку, мету дослідження і направляють до лабораторії. Зібраний клінічний матеріал вважають потенційно патогенним.

Бактеріоскопічний метод. Безпосередньо з харкотиння або осаду, який отримують після центрифугування гомогенізованого матеріалу, виготовляють мазки. Харкотиння переносять у чашку Петрі, розташовану на темному фоні. За допомогою пінцета вибирають слизово-гнійні жмуточки, переносять їх на середину предметного скла, накривають другим предметним склом і розтирають матеріал між скельцями. Так само готують мазки з гною та пунктатів. Спинномозкову рідину відстоюють протягом 18-20 год у холодильнику і утворену ніжну сіточку фібрину обережно розправляють на предметному склі. Сечу центрифугують і мазки виготовляють з осаду. Саме ці мазки знебарвлюють не лише кислотою, а й спиртом для диференціації туберкульозних бактерій від *M. smegmatis*, яка може знаходитися у сечі здорових людей.

Висушені мазки фіксують сухим жаром, забарвлюють за методом Ціля-Нільсена або аурамін-родаміном чи іншим флуорохромом. У препаратах, зафарбованих за Цілем-Нільсеном, збудник туберкульозу має вигляд тонких суцільних паличок

рубіново-червоного кольору, що розташовані поодинокі або групами переважно поза клітинами (див. вкл., рис. 2).

Аурамін-родаміном мазки фарбують протягом 15 хв із підігріванням, потім промивають водою, на 30 с занурюють у солянокислий спирт і знову ретельно промивають водою. Якщо при мікроскопії фон мазка має сильну флуоресценцію, потрібно дещо погасити її 0,25 % водним розчином метиленового синього, промити водою, висушити і досліджувати під люмінесцентним мікроскопом. Туберкульозні палички світяться золотавим світлом на темно-зеленому фоні. Як флуорохроми використовують також аурамін, акридиновий оранжевий та ін. Для виявлення L-форм мікобактерій застосовують переважно фазово-контрастну мікроскопію.

Позитивну відповідь дають при виявленні туберкульозних паличок у мазку після перегляду не менше 100 полів зору, обов'язково вказуючи кількість бактерій у кожному полі зору. Негативний результат мікроскопії не дає права виключити діагноз туберкульозу.

Суттєвим недоліком бактеріоскопічного методу є невисока чутливість: мікобактерії можна виявити в мазку лише при наявності 50-100 тис. мікробних тіл в 1 мл патологічного матеріалу. Окрім того, за цим методом неможливо відрізнити збудника туберкульозу від інших мікобактерій та визначити його чутливість до хіміопрепаратів. Для підвищення частоти знаходження мікобактерій туберкульозу в досліджуваному матеріалі (особливо в харкотинні) застосовують методи збагачення – гомогенізації та флотації.

Метод гомогенізації. Добову порцію харкотиння вносять у флакон, додають рівний об'єм 1 % розчину NaOH, щільно закривають гумовою пробкою і струшують у шюттель-апараті 10-15 хв до повного розрідження. Гомогенізовану рідину центрифугують, декантат зливають у розчин хлораміну, осад нейтралізують 2-3 краплями 10 % розчину соляної або 30 % оцтової кислоти. З осаду готують мазки, забарвлюють за Цілем-Нільсенем і мікроскопують.

Метод флотації. Порцію харкотиння (10-15 мл) гомогенізують, як вище описано. Колбочку або флакон із розрідженим матеріалом ставлять на водяну баню при 55 °С на 30 хв, потім додають 0,5-1 мл ксилолу (бензолу, бензину, толуолу), струшують 10 хв і відстоюють півгодини. Ксилол разом з адсорбованими мікобактеріями спливає на поверхню і утворює вершкоподібний шар. Доливають дистильовану воду, щоб цей шар піднявся у горлечко колбочки чи флакона. Стерильною пастерівською піпеткою частину ксилолового шару переносять на предметне скло, яке нагрівають на скляній пластинці, що лежить на водяній бані при температурі 60 °С. Висушений мазок покривають новою порцією з вершкоподібного матеріалу, знову висушують і так повторюють до тих пір, поки весь флотаційний шар перенесуть на мазок. Препарат промивають ефіром, висушують, фіксують сухим жаром, фарбують за Цілем-Нільсенем і мікроскопують. Методи гомогенізації та флотації на 10 % підвищують знаходження мікобактерій туберкульозу в досліджуваному матеріалі. При цьому їх вдається виявити, якщо в 1 мл харкотиння знаходиться більше тисячі мікробних тіл.

Промивні води бронхів і шлунка також можна досліджувати за допомогою гомогенізації або флотації.

Бактеріологічний метод діагностики значно ефективніший, ніж бактеріоскопічний. Він дає змогу виявити в 1 мл досліджуваного матеріалу 20-100 і більше мікобактерій. Його використовують не лише для постановки діагнозу хвороби, а й для контролю ефективності хіміотерапії, визначення вірулентності і стійкості мікобактерій до антибіотиків та інших протитуберкульозних препаратів, виявлення змінених варіантів, особливо L-форм.

Майже всі досліджувані матеріали від хворих на туберкульоз (окрім крові, спинномозкової рідини) містять супутню мікрофлору. Тому виділити чисту культуру мікобактерій без попередньої їх обробки неможливо. Для знищення сторонніх мікроорганізмів харкотиння, гній, промивні води та інші матеріали обробляють 20 хв при кімнатній температурі подвійним об'ємом 6 % розчину сірчаної кислоти або 10 % розчином тринатрійфосфату при 37 °С протягом 18-20 год. Потім оброблений матеріал центрифугують, рідку частину зливають, а осад нейтралізують, додаючи 1-2 краплі 3 % розчину NaOH, або трикратно відмивають від кислоти ізотонічним розчином хлориду натрію.

Після нейтралізації матеріал засівають у 3-6 пробірок із щільним середовищем Левенштейна-Йенсена (картопляний крохмаль з гліцерином, солями, яєчною суспензією і малахітовим зеленим) та Фінна-2, яке має такий же склад, як і попереднє, але в ньому аспарагін замінено на глютамінат натрію. Ці середовища рекомендовані ВООЗ як стандартні в усіх країнах світу для первинного вирощування мікобактерій туберкульозу та визначення їх стійкості до хіміопрепаратів. Для інших потреб можна також використовувати гліцериновий бульйон, середовище Петраньяні, Павловського, Сотона.

Спинномозкову рідину, ексудат, кров, пунктат вносять піпеткою на живильне середовище без попередньої їх обробки. Всі ватні пробки зрізають на рівні вінця пробірки, проштовхують всередину на 1-1,5 см і заливають розтопленим парафіном для попередження висихання середовища.

Засіяні пробірки інкубують у термостаті при 37 °С протягом 3-4 тижнів. Ті пробірки з середовищами, на які матеріали сіяли петлею і втирали в поверхню агару, розміщують вертикально. Якщо посіви робили пастерівською піпеткою, пробірки вміщують у термостаті в похилому положенні на 2-3 доби, потім вертикально. Посіви проглядають кожні 5-7 днів. Всі пробірки з раннім ростом сторонньої мікрофлори вилучають. У випадках раннього росту характерних колоній (до 5-го дня) роблять висновок про наявність швидкоростущих мікобактерій, тобто негативну відповідь щодо туберкульозу.

Ріст туберкульозних бактерій частіше всього появляється через 3 тижні, але бувають випадки й через 2-3 місяці. На щільних середовищах виростають грубі, шорсткі, сухі, безпігментні колонії, що мають зморщену поверхню, потовщений центр і тонкі, нерівні краї. За зовнішнім виглядом вони нагадують дольки цвітної капусти або бородавки.

Це типові R-форми колоній, властиві патогенним штамам. S-форма колоній жовтого або оранжевого кольору, як правило, характерна для інших видів мікобактерій. Але під впливом антибактеріальних препаратів *M. tuberculosis* також

може утворювати м'які, вологі, пігментовані S-форми колоній. Необхідно відмічати швидкість і рясність росту.

Значно рідше досліджуваний матеріал сіють на гліцериновий бульйон, рідкі середовища з плазмою крові, бичачою сироваткою або синтетичне середовище Сотона. На них мікобактерії туберкульозу ростуть дещо швидше, мають вигляд ніжної плівки, яка з часом потовщується, грубішає, стає крихкою і випадає в осад. Із рідких середовищ роблять висів у пробірки із щільним середовищем, що збільшує число позитивних результатів, але дослідження триває довше.

Щоб підвищити частоту висівання збудника туберкульозу, досліджуваний матеріал обробляють детергентами, які мають бактерицидну дію на іншу мікрофлору (лауросепт, лаурисульфат натрію, родолан, теапол, цетавлон тощо). При цьому покращується гомогенізація матеріалу, виключається центрифугування, швидше виростають колонії.

Прискорені методи культивування. Щоб значно швидше отримати ріст мікобактерій туберкульозу, запропоновані методи мікрокультур Прайса і Школьнікової. Метод Прайса полягає в тому, що харкотиння, гній, осад сечі, промивні води та інший матеріал наносять товстим шаром на декілька вузьких предметних скелець (звичайні скельця розрізають навпіл по довжині). Висушені мазки беруть стерильним пінцетом і занурюють на 15-20 хв у пробірки з 2 % розчином сірчаної кислоти, а потім тричі промивають стерильним розчином хлориду натрію для видалення кислоти. Після цього препарат вміщують у пробірки або флакони з рідким середовищем Сотона або цитратною кров'ю. Мазок повинен повністю покриватись живильним середовищем. Для пригнічення сторонньої мікрофлори, яка може інколи залишатись після обробки мазків кислотою, в середовище додають 10 ОД/мл пеніциліну. Посіви вирощують у термостаті при 37-38 °С. Через 3-4 доби скельця з мазками виймають, фіксують сухим жаром, забарвлюють за Цілем-Нільсеном або родаміном і мікроскопують. Вірулентні мікрокультури в препаратах утворюють джгути або "коси", що формуються під впливом корд-фактора. Максимальний ріст мікрокультур відмічається на 7-10 день (див. вкл., рис. 21).

Глибинне культивування мікобактерій у гемолізованій крові за методом Школьнікової отримують шляхом посіву матеріалу, обробленого, як звичайно, сірчаною кислотою і промитого 0,85 % розчином хлориду натрію. Через 6-8 днів вирощування культуру центрифугують, з осаду виготовляють мазки, забарвлюють за методом Ціля-Нільсена або флуорохромом і мікроскопують. У препаратах виявляють типові мікрокультури з характерним розташуванням у вигляді кіс і джгутів.

Щоб виявити L-форми мікобактерій туберкульозу, посів матеріалу після відповідної обробки кислотою проводять у спеціальне напіврідке середовище, розлите в пробірки у вигляді стовпчика. Вирощують при 37 °С протягом 1-2 міс. Ріст L-форм нагадує хмаринку з дуже дрібними включеннями, що подібні до манної крупи. Виготовлені мазки досліджують під фазово-контрастним мікроскопом, за допомогою якого найкраще виявляють різноманітні за морфологією L-форми. Їх можна виявити і шляхом послідовних пасажів на гвінейських свинках або за допомогою імунофлуоресцентного методу з використанням сироваток, що містять мічені антитіла проти антигенів L-форм.

Для ідентифікації виділених культур збудників туберкульозу і диференціації їх від інших видів мікобактерій використовують багато ознак. Основними з них є вірулентність, швидкість росту, форма колоній, утворення пігменту, каталази, уреаз, нікотинамідази, нітратредуктази (табл. 58).

Таблиця 58

Властивості мікобактерій, що використовуються для їх ідентифікації

Вид	Час росту, дні	Каталаза, 68 °С	Уреаза	Нікотинамідаза	Ніациназа	Нітратредуктаза	Пігмент
<i>M. tuberculosis</i>	12-25	-	±	+	+	+	-
<i>M. bovis</i>	24-40	-	+	-	-	-	-
<i>M. africanum</i>	31-42	-	+	+	-	-	-
<i>M. kansasii</i>	10-20	+	+	+	-	+	+
<i>M. avium</i>	10-12	+	-	+	-	+	-
<i>M. smegmatis</i>	3-5	±	+	+	-	+	-

Найважливіша ознака *M. tuberculosis* – ніациновий тест – здатність синтезувати значну кількість нікотинової кислоти (ніацину). Каталазна активність відносно слабка і втрачається при 68 °С. Для швидкої диференціації збудників туберкульозу людини рекомендують посів на середовище Левенштейна-Йенсена з 500 мкг/мл і 1000 мкг/мл саліцилового натрію. Мікобактерії туберкульозу за таких умов на цьому середовищі не ростуть.

Питання про вірулентність мікобактерій вирішується на основі біологічних проб і виявленні корд-фактора. Останній визначають методом мікрокультур Прайса, а також на основі міцного зв'язування таких барвників, як нейтральний червоний або нільський голубий. При нанесенні на мазок розчину NaOH туберкульозні палички зберігають колір барвника, в той час як невірулентні мікобактерії змінюють відповідне забарвлення.

Для надійної ідентифікації видів мікобактерій у сучасних умовах розроблені прогресивні, швидкі й дуже точні методи визначення у таких досліджуваних матеріалах, як харкотиння, плевральна рідина, ліквор, гній, сироватка крові, вміст шлунка, тканини тощо. Ці об'єкти, незаражені нагріванням, зберігаються необмежений час і в будь-який момент можуть бути досліджені. Серед них найбільшої уваги заслуговує молекулярно-генетичний метод полімеразної ланцюгової реакції. Він ґрунтується на виявленні в біологічному матеріалі ДНК мікобактерій. Навіть якщо в матеріалі знаходиться всього 5-10 мікробних клітин, за допомогою олігонуклеотидів-праймерів запускають синтез специфічних фрагментів ДНК у циклотермостаті, які потім можна ідентифікувати методом гелелектрофорезу. Результати досліджень отримують через 3-4 години.

Специфічні антигени в тих же матеріалах можна також швидко виявити і за допомогою імуноферментного аналізу, якщо мати відповідні антитіла, адсорбовані на твердій фазі у полістиролових планшетах.

Визначення стійкості мікобактерій до хіміопрепаратів. Лікарську стійкість збудників туберкульозу визначають способом серійних розведень перед

початком лікування, через 3 місяці і надалі при продовженні виділення туберкульозних паличок через кожні 6 місяців. Це роблять шляхом вирощування культур на середовищах із різною концентрацією туберкулостатиків.

Є два способи визначення резистентності мікобактерій: прямий і непрямий. При прямому способі безпосередньо сіють відповідно оброблений матеріал на середовища з різними концентраціями антибіотиків чи інших хіміопрепаратів. Він ефективніший, але ним можна користуватися лише тоді, коли в матеріалі виявляють не менше 5 мікобактерій в кожному полі зору. При непрямому способі на середовище з протитуберкульозними препаратами сіють попередньо виділені культури мікобактерій. В обох випадках обов'язковий контроль – посів на таке саме середовище без туберкулостатиків.

У сучасних умовах найбільш поширені такі методи визначення лікарської стійкості мікобактерій:

- 1) культивування на щільному середовищі Левенштейна-Йенсена;
- 2) мікрокультивування на скельцях за Прайсом;
- 3) глибинні посіви в напівсинтетичні середовища.

У пробірки, які містять різну концентрацію препаратів, і в одну контрольну (без туберкулостатика) засівають завись виділеної культури (500 млн мікробних тіл в 1 мл). Культуру вважають чутливою, якщо в пробірці з препаратом виросло менше 20 колоній при рясному рості в контролі. Якщо виросло більше 20 колоній, культуру вважають стійкою. Резистентність даного штаму виражають тією максимальною концентрацією антибактерійного препарату, при якій ще відбувається ріст, наближений до росту в контролі (табл. 59)

Таблиця 59

Шкала оцінки резистентності мікобактерій до лікарських засобів

Препарат	Стійкі при рості на середовищах, що містять препарат, мгк/мл	
	щільних	рідких
Стрептоміцин	5	5
Тубазид	1	1
ПАСК	5	10
Циклосерин	50	50
Канаміцин	25	10
Етіонамід	30	5
Біоміцин	30	10

Біологічний метод діагностики туберкульозу – зараження гвінейських свинок – є найчутливішим. Інфікуюча доза збудника для цих тварин складає всього декілька бактерійних клітин. Досліджуваний матеріал обробляють 2 % розчином сірчаної кислоти протягом 20 хв, включаючи центрифугування. Потім осад тричі відмивають 0,85 % розчином хлориду натрію і емульгують його в 1-2 мл ізотонічного розчину. Емульгований осад вводять підшкірно в пахвинній ділянці двом гвінейським свинкам масою 250-300 г з негативною пробою Манту. При малій кількості матеріалу його вводять у черевну порожнину або паранхіму яєчка. Такий спосіб зараження підвищує чутливість біопроби, особливо в тих випадках,

коли в матеріалі містяться маловірулентні палички туберкульозу, стійкі до ізоніазиду та інших хіміопрепаратів.

Через 2-3 тижні заражених тварин зважують, визначають розміри збільшених лімфатичних вузлів і ставлять пробу Манту, яку повторюють через 6 тижнів. Місцеві патологічні зміни, зменшення маси тіла дають підставу для розтину гвінейських свинок і дослідження їх внутрішніх органів. При негативних результатах тварин умертвляють через 3-4 міс, гістологічно досліджують паренхіматозні органи і роблять посіви на елективні середовища.

Гвінейських свинок використовують і для виявлення L-форм мікобактерій туберкульозу. В таких випадках потрібно зробити декілька послідовних заражень, оскільки L-форми мають меншу вірулентність і викликають у тварин доброякісний перебіг туберкульозу, який при реверсії L-форм може перейти в генералізований процес.

Останнім часом все ширше використовують біопробу на білих мишах, заражаючи їх інтрацеребрально. Постановка біологічних проб на лабораторних тваринах – це своєрідний “золотий стандарт” при діагностиці туберкульозу.

Серологічна діагностика. Для виявлення протитуберкульозних антитіл спочатку були запропоновані реакції аглютинації, преципітації та зв’язування комплекменту. Тепер їх використовують рідко. Натомість стали широко практикувати реакцію непрямой гемаглютинації. Як антиген у ній використовують сенсibiliзовані еритроцити барана або людини O-групи. Їх навантажують екстрактом із туберкульозних бактерій або очищеним туберкуліном. До 1 мл осаду еритроцитів додають 20 мл екстракту мікобактерій, витримують при 37 °C протягом 2-ох год і відмивають центрифугуванням для видалення надлишку антигену. Перед постановкою РНГА сироватку хворого виснажують еритроцитарною масою для усунення неспецифічного реагування. Потім сироватку розводять від 1:2 до 1:272. Діагностичним титром вважають розведення 1:8. При туберкульозі РНГА буває позитивною у 70-90 % випадків.

Хороші результати дає також імуноферментний аналіз, імуноблотинг і реакція агрегат-гемаглютинації для визначення циркулюючих імунних комплексів. Ще точнішим є радіоімунний метод, але через високу вартість діагностиків і відсутність радіометричної апаратури він рідко використовується в лікувальних закладах.

Для вдосконалення серологічної діагностики туберкульозу важливо налагодити випуск моноклональних антитіл до різних антигенів мікобактерій. З їх допомогою можна було б виявляти специфічні епітопи бактерій, а також відповідні їм антитіла. Виявлення таких антитіл буде мати важливе діагностичне значення.

Алергічний метод. Туберкулінова внутрішньошкірна проба Манту є специфічним діагностичним тестом. Його використовують для визначення інфікованості населення туберкульозом, масового обстеження на туберкульоз дітей і підлітків, відбору осіб, яким потрібно проводити ревакцинацію, перевіряти її ефективність, а також із метою діагностики туберкульозу та визначення активності процесу. Для постановки проби використовують туберкулін. У 1890 р. Роберт Кох запропонував перший препарат, так званий старий туберкулін Коха (*Alttuberkulin Koch* або

АТК). Його виготовляють із суміші культур мікобактерій людського й бичачого типів, вирощених у гліцериновому бульйоні протягом 5-6 тижнів. Культуру стерилізують текучою парою 30 хв, випарюють при 70 °С до 1/10 первинного об'єму, фільтрують через бактерійний фільтр і розливають в ампули. Туберкулін Коха містить ряд баластних речовин і важко піддається стандартизації. Починаючи з 1934 р., для постановки алергічних проб Зейберт запропонував високоочищений препарат туберкуліну, який назвали PPD-S (*Purified protein derivative – Seibert*). Через 5 років М.А. Ліннікова виготовила очищений туберкулін під назвою ППД-Л. Його дозують у туберкулінових одиницях (ТО). 1 ТО вміщує 0,00006 мг сухого препарату. Випускають ППД-Л у двох формах: сухий очищений туберкулін по 50000 ТО в ампулі і ППД-Л у стандартному розведенні в ампулах по 3 мл. У 0,1 мл розчину міститься одна доза (2 ТО).

Препарат вводять внутрішньошкірно однограмовим туберкуліновим шприцом в об'ємі 0,1 мл у середній третині передпліччя. Перед ін'єкцією шкіру протирають 70 % етиловим спиртом. Тонку голку зрізом вверх вводять у поверхневий шар шкіри під кутом 15° до її поверхні.

Результати алергічної проби оцінюють через 72 год за такою схемою: негативна проба – повна відсутність папули; сумнівна – папула розміром 2-4 мм або лише гіперемія будь-якого розміру; позитивна – папула діаметром 5 мм і більше; гіперергічна – у дітей і підлітків папула діаметром 17 мм і більше, у дорослих – 21 мм і більше.

Лепра (проказа)

Лепра – первинно-хронічна генералізована інфекційна хвороба людини, яка характеризується специфічними ураженнями шкіри, слизових оболонок, периферичних нервів і внутрішніх органів. Збудник захворювання – *Mycobacterium leprae*. Окрім того, у щурів лепру викликає *M. lepraemurium*, морфологічно і тинкторіально дуже подібна до палички прокази людини.

Розрізняють дві основні клінічні форми хвороби: туберкулоїдну і лепроматозну. Остання має більш тяжкий прогресуючий перебіг. Прокажений виділяє збудника при кашлі, чханні і розмові, оскільки він у великій кількості знаходиться у слизовій оболонці носоглотки. Зараження людей відбувається частіше повітряно-краплинним шляхом при тісному контакті з хворими на проказу.

При лабораторній діагностиці лепри використовують переважно бактеріоскопічний метод дослідження, значно рідше біопробу на мишах і броненосцях-армадилах та алергічну пробу з лепроміном.

Матеріалом для дослідження служать зскрібки слизової оболонки носа, скарифікати з уражених ділянок шкіри, особливо з надбрівних дуг, мочок вušних раковин, підборіддя, а також біоптати лепром і ліфматичних вузлів.

Зіскоб слизової оболонки з обох боків носової перегородки проводять металевою ложечкою до появи краплі крові. Для взяття скарифікату шкіру в місці ураження затискають двома пальцями в складку, здовж якої скальпелем роблять невеликий

розріз глибиною 1-2 мм. Зскріб зі стінок надрізу переносять на предметне скло. Виготовлені мазки забарвлюють за Цілем-Нільсеном або за методом Семеновича-Марциновського. При проведенні гістологічних досліджень біоптатів частину зрізів також фарбують одним із вказаних методів для виявлення мікобактерій.

У мазках лепрозні бактерії мають вигляд рубіново-червоних прямих або ледь зігнутих паличок з округленими кінцями. При мікроскопії гістологічних зрізів видно їх скупчення всередині клітин, де палички розташовуються паралельно, нагадуючи пачки сигар. Це дає змогу диференціювати їх від мікобактерій туберкульозу, які за своїми морфологічними і тинкторіальними властивостями подібні до збудника лепри (див. вкл., рис. 22).

При посівах лепрозних матеріалів на елективні для мікобактерій середовища ріст відсутній. Гвінейські свинки не чутливі до *M. leprae*.

Біологічну пробу ставлять на мишах (особливо чутлива японська танцююча миша). Гомогенат досліджуваного матеріалу вводять у подушечку задньої лапки тварин, імунологічну реактивність яких понижують введенням Т-імунодепресантів. У позитивних випадках на місці інокуляції матеріалу через декілька місяців виникає інфільтрат, що містить гранулеми із розташованими всередині клітин мікобактеріями. При зараженні броненосців (армадил) у них розвиваються типові множинні вузли (лепроми) в тканинах і органах, де мікроскопічно виявляють багато лепрозних бактерій.

Алергічну пробу з лепроміном використовують, в основному, для диференціації лепроматозної від туберкулоїдної форм прокази. Алерген готують із простерилізованих в автоклаві гомогенатів уражених тканин, що містять величезну кількість мікобактерій. Лепромін вводять внутрішньошкірно в середній третині передпліччя в об'ємі 0,1 мл.

Через 48 год у позитивних випадках розвивається пляма гіперемії або папула (реакція Фернадеса). Значно пізніше (1-2 міс.) може утворитися горбик, часто з некрозом (реакція Міцуди). У хворих на лепроматозну форму алергічна проба буде негативна, а у хворих на туберкулоїдну форму та у здорових людей – позитивна. Отже лепромінова проба діагностичного значення не має, її використовують лише для визначення клінічної форми хвороби і прогнозу.

Мікобактеріози

У навколишньому середовищі існує багато атипових потенційно патогенних мікобактерій. Частина з них виділяється від людей і тварин при різноманітних захворюваннях легень, шкіри, лімфатичних вузлів, інших тканин і органів. Вони отримали загальну назву мікобактеріози. Роль умовно-патогенних мікобактерій в інфекційній патології людини зростає з кожним роком. У цю групу захворювань не входять туберкульоз і проказа, хоч деякі з них мають подібний перебіг. Існуючі методи лікування туберкульозу і мікобактеріозів різні, у зв'язку з чим мікробіологічна ідентифікація збудників набуває особливого значення.

За класифікацією Раньйона атипові мікобактерії поділяються на 4 групи: фотохромогенні, скотохромогенні, нефотохромогенні та швидкоростучі.

До фотохромогенних мікобактерій належать *Mycobacterium kansasii*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. simiae*, *M. szulgai*. Всі вони кислотостійкі, утворюють жовто-оранжевий пігмент на світлі, викликають туберкульозоподібні захворювання легень, лімфаденіти, ураження шкіри і підшкірної клітковини. *M. ulcerans*, наприклад, спричиняє виразку Бурулі.

Скотохромогенні мікобактерії (*M. scrofulaceum*, *M. aquae*, *M. flavescens* та ін.) утворюють жовто-оранжевий пігмент у темноті, викликають шийні лімфаденіти у дітей, рідше патологічні процеси в легенях.

Нефотохромогенні види – *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. xenopi* – мають дуже слабку пігментацію колоній, або вони зовсім не забарвлені, викликають туберкульозоподібні захворювання легень, шкіри, нирок, кісток і суглобів, небезпечні для хворих з імунодефіцитами, особливо при ВІЛ-інфекції. Вони викликають туберкульоз у птахів і рідко у людини (*M. avium*).

До групи швидкоростучих мікобактерій віднесені *M. fortuitum*, *M. friedmanii*, *M. malmoense*, *M. smegmatis*, *M. phlei*. Вони причетні до виникнення абсцесів після ін'єкцій у наркоманів, запалення навколо імплантованих об'єктів (наприклад, протезів серцевих клапанів). Ураження легень і лімфаденіти у дітей викликає *M. malmoense*. Практичне значення в плані диференціації різних видів мікобактерій має *M. smegmatis*, особливо при лабораторній діагностиці захворювань сечостатевої системи.

Мікробіологічна діагностика. Матеріалом для дослідження служить харкотиння, вміст виразок та інших уражень шкіри, пункгати лімфатичних вузлів, промивні води бронхів, сеча та ін. Лабораторні дослідження проводять за тими ж принципами і методами, що й при туберкульозі.

Після первинної мікроскопії матеріал сіють на середовища Левенштейна-Йенсена, Фінна і обов'язково на середовище з саліцилатом натрію. Перед посівом патологічний матеріал обробляють 15-20 хв 2-5 % розчином сірчаної кислоти або 10 % розчином фосфату натрію протягом 18-20 год при 37 °С. Атипові мікобактерії більш чутливі до такої обробки, ніж палички туберкульозу. Якщо обробляти харкотиння малахітовим зеленим або генціановим фіолетовим – виділення збудників мікобактеріозів збільшується в 3-4 рази.

Для ідентифікації атипових мікобактерій запропоновано багато тестів. Однак у бактеріологічних лабораторіях практичних медичних установ використати їх просто неможливо. Найчастіше для встановлення виду збудника враховують колір колоній, швидкість росту субкультур, ріст при різних температурах і особливо на середовищі з саліцилатом натрію, визначення каталази, синтезу ніацину та ін. Практично всі види атипових мікобактерій дають ріст на середовищі з саліцилатом натрію, в той час як збудники туберкульозу на ньому не ростуть. Ніацин синтезує лише *M. tuberculosis*, а збудники мікобактеріозів не утворюють нікотинової кислоти.

Розроблені методи ідентифікації атипових мікобактерій в реакціях преципітації і фаголізу. Серологічні реакції для діагностики мікобактеріозів, особливо

такі як РЗК, РІФ, РНГА, можна буде використовувати при умові виготовлення специфічних тест-систем. Великі можливості для визначення збудників цих захворювань відкриває впровадження полімеразної ланцюгової реакції.

Актиномікоз

Актиномікоз – хронічне гранулематозне гнійне захворювання різних тканин і органів, що викликається актиномицетами. Воно супроводжується інфільтрацією тканин, абсцесами, норицями, утворенням щільних зерен (друз). Основні збудники – *Actinomyces israelii* і *A. bovis*.

Матеріалом для лабораторної діагностики служить гній, харкотиння, сеча, випорожнення, спинномозкова рідина, пунктати і біоптати уражених тканин. Найкращі результати дають мікроскопічні й бактеріологічні методи дослідження.

Бактеріоскопію проводять для виявлення друз. Для цього у тонкому шарі рідкого або розрідженого матеріалу в чашці Петрі відбирають під лупою гнійні шматочки або зерна, переносять їх на предметне скло в краплю 10-20 % розчину NaOH, трохи підігрівають, накривають покривним скельцем і досліджують під мікроскопом ($\times 40$). Друзи виглядають як повстяноподібні скупчення міцелію, від яких на периферію радіально (подібно до променів сонця) відходять гіфи з потовщенням на кінцях (рис. 79).

Мікроскопічно досліджують і забарвлені препарати друз. З цією метою зерна або гнійні шматочки промивають водою, вміщують на предметне скло, покривають другим склом, обережно натискають, рознімають, отримуючи два рівномірних мазки. Забарвлюють їх за Грамом і Цілем-Нільсеном. При імерсійній мікроскопії виявляють клітини міцелію (рис. 79, 1), паличкоподібні та кокоподібні утвори, а також спори. За Грамом спори фарбуються у темно-фіолетовий, а друзи – у рожевий колір. При забарвленні за Цілем-Нільсеном міцелій має синій, а спори рожевий колір. Якщо друзи не виявляють, із досліджуваного матеріалу готують звичайні мазки і забарвлюють їх за Грамом. При цьому під мікроскопом виявляють пучки міцелію або окремі нитки фіолетового кольору. Виявлення друз або тонкого несептованого міцелію та спор підтверджує діагноз актиномікозу.

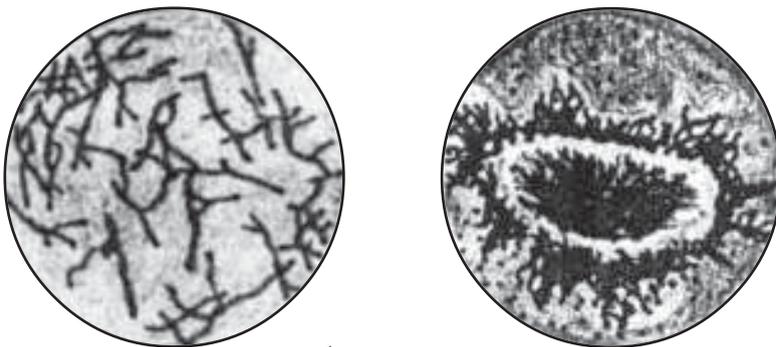


Рис. 79. *Actinomyces israelii*: 1 – міцелій; 2 – друзи.

Бактеріологічне дослідження. Патологічний матеріал від хворих, як правило, забруднений сторонньою мікрофлорою. Для позбавлення від неї матеріал центрифугують у розчині пеніциліну і стрептоміцину, потім відмивають від антибіотиків 0,85 % розчином NaCl. Для звільнення від супутньої флори можна також внести у пробірку 50 % розчин гліцерину і витримати 2-3 доби при 37 °С.

Оброблений таким способом матеріал висівають на середовище Сабуро, кров'яний або сироватковий агар. Посіви інкубують при 37 °С протягом 3-5 днів.

A. israelii на сироватковому агарі утворює безбарвні пастоподібні бугристі колонії. Повітряний міцелій утворюється слабо. У мазках із колоній видно палички, кулясті і колбоподібні елементи. Старі колонії стають пухнастими, ніби припорошені борошном.

A. bovis росте в анаеробних умовах, утворюючи безбарвні пастоподібні колонії, які рано покриваються білим повітряним міцелієм. Колонії міцно спаюються з агаром і не знімаються петлею. У мазках із колоній видно несептований міцелій, що розпадається на паличкоподібні й кокоподібні утворення.

Ідентифікацію виділених культур проводять за рядом ознак (табл. 60) Обидва види не звужують молоко, не розріджують желатин, не відновлюють нітрати.

Таблиця 60

Диференціація основних видів актиноміцетів

Вид	Ферментація				Чутливість до хлорамфеніколу
	рибози	ксилози	рафінози	крохмалю	
<i>Actinomyces israelii</i>	+	+	+	+	+
<i>Actinomyces bovis</i>	–	±	–	+	–

Серологічна діагностика проводиться рідко. Використовують реакції зв'язування комплементу і непрямой геммаглютинації. Антигеном служить актинолізат. Але обидві реакції можуть давати позитивні результати й при інших захворюваннях (рак легень, тяжкі гнійні процеси).

Деякі більше діагностичне значення мають імунологічні тести: реакція гальмування міграції лейкоцитів та алергічна проба з актинолізатом, а також кількісне визначення імунокомпетентних клітин. Внутрішньошкірна проба при вісцеральному актиномікозі часто буває негативна.

Нокардіоз

Нетиповий актиномікоз або нокардіоз – хронічне захворювання внутрішніх органів, в основному, легень, рідко шкіри і слизових оболонок; можливий розвиток міцетоми стопи. Найчастішими збудниками є *Nocardia asteroides* і *Nocardia brasiliensis* із родини *Nocardiaceae*. Мікробіологічна діагностика проводиться так само, як і при актиномікозах. Матеріал для дослідження – харкотиння, гній із абсцесів і нориць, біоптати тканин.

Бактеріоскопія. Препарати-мазки забарвлюють за методом Грама і Ціля-Нільсена. При мікроскопії виявляють бацилярні і кокоподібні структури або скупчення паличок, що галузяться, забарвлюються за Грамом у фіолетовий колір (рис. 80).

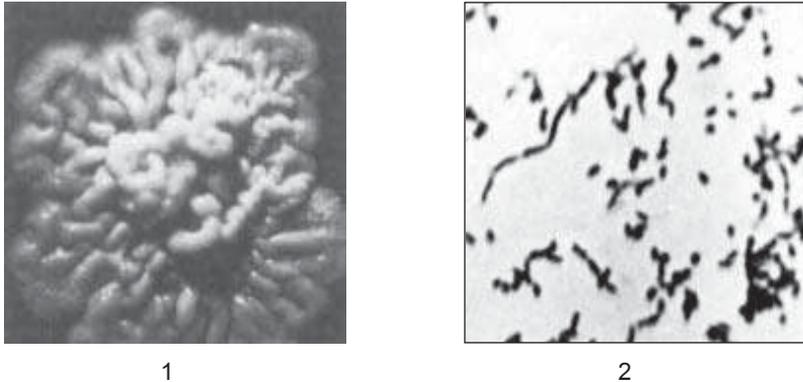


Рис. 80. *N.asteroides*: колонії (1), ланцюжки і конідії в мазку (2).

При гістологічному дослідженні уражених тканин друз не знаходять. Для експрес-діагностики можна використати реакцію імунофлуоресценції.

Бактеріологічне дослідження. Нокардії вирощують в аеробних умовах. Клінічний матеріал сіють на середовище Сабуро, кров'яний і звичайний МПА. На 2-3 добу виростають дрібні воскоподібні колонії. Чисті культури ідентифікують за морфологічними особливостями, характером росту і біохімічними ознаками.

Можна поставити біологічну пробу на мишах і гвінейських свинках здебільшого при інтрацеребральному і внутрішньовенному способах зараження.

При необхідності провести серологічні дослідження ставлять реакції аглютинації, преципітації в гелі, зв'язування комплементу. Для діагностики міцетоми стопи використовують і реакцію імуоелектрофорезу.

Сифіліс та інші трепонематози

Сифіліс – хронічна інфекційна венерична хвороба людини, що має циклічний прогресуючий перебіг, уражає шкіру, слизові оболонки, внутрішні органи і нервову систему. Збудником захворювання є *Treponema pallidum*.

Розрізняють три основні періоди розвитку сифілісу, методи лабораторної діагностики яких мають свої особливості. У ранній період хвороби матеріалом для лабораторної діагностики служить виділення з твердого шанкеру, пунктат із лімфатичних вузлів, зскрібки з розеол, сифілід тощо. При вторинному і третинному періодах досліджують сироватку крові і ліквор.

У зв'язку з тим, що виділення чистих культур трепонем у звичайних бактеріологічних лабораторіях неможливе, під час первинного періоду хвороби (рідко пізніше) проводять бактеріоскопічний метод діагностики. Починаючи з вторинного періоду, використовують, в основному, серологічні методи.

Бактеріоскопічне дослідження. Перед взяттям патологічного матеріалу спочатку сифілітичну виразку протирають ватним тампоном, для видалення сального нальоту і контамінуючої мікрофлори. Потім дно твердого шанкеру подразнюють скальпелем чи металеву лопаточкою або енергійно стискають виразку з боків пальцями в гумовій рукавичці до виділення ранового ексудату. При невеликій

кількості прозорої рідини її можна внести у краплю 0,85 % розчину хлориду натрію. При неможливості взяти матеріал із дна шанкеру (фімоз, рубцювання виразки тощо) проводять пункцію регіонарних лімфатичних вузлів.

Краплю рідини з виразки або пунктату наносять на тонке предметне скло (1,1-1,2 мм), накривають покривним скельцем і досліджують у темному полі зору (краще!), або за допомогою фазово-контрастного чи аноптального мікроскопа.

Бліда трепонема у темному полі зору має вигляд злегка блискучої тонкої ніжної спіралі з крутими рівномірними округлими первинними завитками (рис. 81). Рухи її плавні, часом вона згинається під кутом. Та особливо характерні для неї маятникоподібні коливання.

Збудник сифілісу необхідно відрізнити від *Treponema refringens* (що колонізує зовнішні статеві органи), яка товстіша, грубіша, з нерівномірними крупнішими завитками і має активні безладні рухи, але не згинається. Трепонемі фузоспирохетозного симбіозу відрізняються тонким рисунком, пологими завитками і безладним рухом.

При діагностиці ротового сифілісу бліду трепонему слід диференціювати і від зубних трепонем, особливо *T. dentium*, а також від *T. buccalis*. Першу з них взагалі важко відрізнити від сифілітичної. Вона, правда, коротша, має 4-8 гострих завитків, маятникоподібний рух відсутній. *T. buccalis* товстіша, має грубі первинні завитки і безладний рух.

При будь-яких сумнівах потрібно враховувати, що всі сапрофітні трепонемі, на відміну від блідої, добре фарбуються аніліновими барвниками. Вони не проникають у лімфатичні вузли, тому дослідження пунктатів має більшу діагностичну цінність. Виявлення у пунктаті лімфатичних вузлів типових трепонем беззаперечно підтверджує діагноз сифілісу.

Отже, темнопольне дослідження надавленої краплі є найкращим методом виявлення збудника сифілісу. Його переваги полягають у тому, що матеріал досліджують швидко, а морфологія трепонем у живому стані найбільш характерна. Тушові мазки за методом Буррі тепер не використовують.

В разі неможливості провести дослідження в темному полі зору можна використати різні методи фарбування. Бліда трепонема погано сприймає анілінові барвники. Із багатьох запропонованих способів забарвлення кращі результати отримують при використанні фарбування за Романовським-Гімзою. Виготовлені мазки фіксують метиловим спиртом або в суміші Никифорова. Чіткіші результати отримують тоді, коли фарбу Романовського-Гімзи наливають під препарат. Для цього в чашку Петрі кладуть уламки сірників, на них вміщують предметне скло мазком донизу і наливають барвник до тих пір, поки він змочить мазок. Час забарвлення при цьому подвоюють. При мікроскопії бліді трепонемі мають ніжно-рожевий колір, а інші види трепонем забарвлюються в синій або синьо-фіолетовий колір.



Рис. 81. *T. pallidum*
у темному полі зору.

Можна використовувати і метод сріблення за Морозовим. Трепонем повністю зберігають свої морфологічні особливості і виглядають під мікроскопом коричневими або майже чорними. Але посріблені препарати довго не зберігаються. Останнім часом методи фарбування трепонем застосовують рідко.

Якщо розпочато лікування сифілісу хіміопрепаратами, виявити збудник у патологічних матеріалах навіть за допомогою темного поля зору практично не вдається. При отриманні негативного аналізу його необхідно повторити.

Серологічна діагностика сифілісу. При проведенні серологічних реакцій тепер використовують такі уніфіковані в Україні методи досліджень: реакції зв'язування комплементу (РЗК), імунофлуоресценції (РІФ), іммобілізації трепонем (РІТ), мікрореакцію преципітації (МПР) та імуноферментний аналіз (ІФА).

Впродовж багатьох років основною й найбільш поширеною реакцією вважалась реакція зв'язування комплементу або **реакція Вассермана (РВ, RW)**. Для її постановки використовують сироватку крові хворого на сифіліс і спинномозкову рідину при ураженні нервової системи.

Методика постановки реакції Вассермана не відрізняється від техніки проведення РЗК. Різниця лише в тім, що для РВ використовують не лише специфічний трепонемний, а й неспецифічний кардіоліпіновий антиген.

Взяття 5-10 мл крові з ліктьової вени проводять натщесерце або не раніше 6 год після прийому їжі. Не можна брати кров у хворих з підвищеною температурою, після вживання алкоголю і жирної їжі, у вагітних жінок за 10 днів до пологів і породіль. Добуту з крові сироватку прогривають при температурі 56 °С протягом 30 хв для інактивації власного комплементу. РВ обов'язково ставлять із двома антигенами: специфічним і неспецифічним.

Специфічний ультразвучений трепонемний антиген готують із культур блідих трепонем (штам Рейтера), вирощених у пробірках і підданих дії ультразвуку. Його випускають у вигляді ліофільно висушеного порошку. Неспецифічний кардіоліпіновий антиген готують шляхом спиртового екстрагування ліпідів із бичачого серця і очищення від баластових сумішей, розфасовують в ампули по 2 мл. Для введення антигену в РВ його титрують згідно з даною інструкцією. Безпосередньо перед постановкою РВ проводять титрування комплементу і гемолітичної сироватки за такою ж схемою, як і в РЗК. Реакцію Вассермана ставлять як якісним, так і кількісним методом. Якісну реакцію проводять у трьох пробірках із двома антигенами за звичайною схемою (табл. 61).

Результати реакції оцінюють за 4 плюсовою системою: позитивна реакція – коли є повна або значна затримка гемолізу (4+, 3+); слабопозитивна реакція – часткова затримка гемолізу (2+); сумнівна реакція – незначна затримка гемолізу (1+). В разі виникнення повного гемолізу РВ вважають негативною (див. вкл., рис.23).

Кожну сироватку, що дала позитивну якісну реакцію, необхідно дослідити і кількісним методом з послідовним її розведенням від 1:10 до 1:640 (табл. 62).

Титром досліджуваної сироватки (титр реактивів) вважають те максимальне її розведення, при якому настає повна (4+) або значна (3+) затримка гемолізу. Кількісний метод постановки РВ має важливе значення для оцінки ефективності

Таблиця 61

Схема постановки якісної реакції Вассермана

Компоненти, мл	Номер пробірки		
	1	2	3 (контр.)
Інактивована сироватка хворого 1:5	0,25	0,25	0,25
Антиген трепонемний в робочій дозі	0,25	-	-
Антиген кардіоліпіновий в робочій дозі	-	0,25	-
Ізотонічний розчин хлориду натрію	-	-	0,25
Комплемент у робочому титрі	0,25	0,25	0,25
Струсити, поставити на 45 хв у термостат при 37 °С			
Гемолітична система	0,5	0,5	0,5
Струсити, поставити на 45-60 хв у термостат при 37 °С			

Таблиця 62

Схема кількісного методу реакції Вассермана

Компоненти, мл	Номер пробірки							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Ізотонічний розчин хлориду натрію	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Сироватка хворого, 1:5, інактивована	0,25 →	→	→	→	→	→	↓	-
Розведення сироватки	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	-
Кардіоліпіновий антиген у робочій дозі	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Комплемент у робочому титрі	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Експозиція в термостаті 45 хв при 37 °С								
Гемолітична система	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Експозиція в термостаті 60 хв при 37 °С								
Можливий результат	4+	4+	4+	3+	-	-	-	-
У даному випадку титр сироватки 1:80								

лікування сифілісу. Швидке зниження титру реактивів вказує на успішну терапію. Якщо ж титр сироватки довго не знижується, це свідчить про відсутність ефективності застосованих препаратів і необхідність змінити тактику лікування.

При підозрі на серонегативний первинний сифіліс або прихований, третинний чи вроджений, рекомендують ставити реакцію Вассермана на холоді за тією ж схемою. В разі підозріння на нейросифіліс РВ проводять із спинномозковою рідиною, яку не інактивують, оскільки вона не містить власного комплекменту. В реакцію вводять нерозведений ліквор і в розведеннях 1:2 і 1:5.

Реакція Вассермана стає позитивною через 2-3 тижні після появи твердого шанкру. При вторинному сифілісі вона випадає позитивною в 100 % випадків, у третинному – в 75 %.

Окрім того, в комплексі серологічних реакцій (КСР) як скринінг-тест використовують мікрореакцію преципітації з плазмою крові або інактивованою сироваткою.

Мікрореакцію преципітації ставлять із кардіоліпіновим антигеном. Принцип реакції полягає в тому, що при додаванні до плазми або сироватки крові хворого на сифіліс емульсії кардіоліпінового антигену утворюється преципітат (комплекс антиген-антитіло), який осідає у вигляді пластівців білого кольору. Користуються такою методикою: у лунку пластини вносять піпеткою три краплі плазми (або інактивованої сироватки), потім додають одну краплю емульсії стандартного кардіоліпінового антигену. Компоненти реакції змішують струшуванням пластини протягом 5 хв, після чого додають три краплі 0,9 % розчину хлориду натрію і залишають при кімнатній температурі ще на 5 хв. Обов'язково ставлять контроль із слабопозитивною сироваткою крові. Результати оцінюють неозброєним оком над штучним джерелом освітлення. При появі в лунці великих пластівців реакцію вважають позитивною (4+, 3+), середніх і дрібних – як слабопозитивну (2+, 1+). При негативному результаті преципітат не утворюється.

Мікрореакцію преципітації можна проводити і кількісним методом для встановлення титру преципітуючих антитіл і оцінки на цій основі ефективності лікування. Більш високі титри МРП отримують з плазмою, ніж із сироваткою. За кордоном аналогом МРП із сироваткою хворого є VDRL (Venereal disease research laboratory), а з плазмою – RPR (Rapid plasma reagin).

Реакція імунофлуоресценції (РІФ). До групи специфічних реакцій, які широко вживаються для серологічної діагностики сифілісу, відноситься непряма реакція імунофлуоресценції. Як антиген, в ній використовують завись патогенних блідих трепонем штаму Нікольса із паренхіми яєчок кролика на 7-ий день після зараження. Реакцію ставлять у двох модифікаціях: РІФ-АБС і РІФ-200. У першому варіанті використовують сорбент антитіл (сонікат) – ультразвуковий трепонемний антиген для РЗК. Його випускає Каунаське підприємство з виробництва бактерійних препаратів (Литва). При варіанті РІФ-200 сироватку хворого розводять у 200 разів з метою зняти вплив групових протитрепонемних антитіл.

Постановку РІФ-АБС проводять на тонких, добре знежирених предметних скельцях. На зворотному боці скелець склорізом позначено 10 кружечків, діаметром 0,7 см. У межах кружка на скло наносять антиген – завись блідих трепонем – у такій кількості, щоб у полі зору їх було 50-60. Мазки висушують на повітрі, фіксують над полум'ям і 10 хв в ацетоні. В окрему пробірку вносять 0,2 мл сорбенту (сонікату) і 0,5 мл сироватки крові хворого, добре перемішують. Суміш наносять на мазок (антиген) так, щоб рівномірно його покрити, витримують 30 хв у вологій камері при 37 °С (I фаза реакції). Після цього мазок промивають фосфатним буфером, висушують і наносять на нього антиглобулінову флуоресцюючу сироватку на 30 хв, ставлять у вологу камеру при 37 °С (II фаза). Препарат знову промивають фосфатним буфером, висушують і досліджують під люмінесцентним мікроскопом.

При позитивній реакції бліді трепонеми випромінюють золотаво-зелене сяйво, при негативній – не світяться.

Техніка постановки РІФ-200 така сама, як і РІФ-АБС, тільки сироватку крові хворого попередньо розводять у 200 разів фосфатним буфером. При проведенні

реакції імуофлуоресценції з спинномозковою рідиною хворого на сифіліс нервової системи використовують РІФ-ц і РІФ-10, тобто ліквор вводять у реакцію неінактивованим і нерозведеним, або розведеним 1:10.

Реакція іммобілізації блідих трепонем (РІТ) ґрунтується на феномені втрати їх рухливості у присутності іммобілізуючих протитрепонемних антитіл сироватки хворого і комплементу в умовах анаеробіозу. Як антиген в реакції використовують завись блідих трепонем із тестикулярної тканини кролика, зараженого лабораторним штамом Нікольса. Завись розводять стерильним 0,85 % розчином хлориду натрію так, щоб у полі зору було 10-15 спірохет.

Для проведення реакції в стерильній пробірці змішують 0,05 мл сироватки крові хворого, 0,35 мл антигену і 0,15 мл комплементу. Дослід супроводжують контролями сироватки, антигену і комплементу (табл. 63). Пробірки вміщують в анаеростат, створюють анаробні умови і витримують у термостаті 18-20 год при температурі 35 °С. Потім із кожної пробірки готують препарат надавленої краплі, підраховують не менше 25 трепонем і відмічають, скільки з них рухливих і скільки нерухливих. Відсоток специфічної іммобілізації блідих трепонем підраховують за такою формулою:

$$X = \frac{A - B}{B} \cdot 100,$$

де X – відсоток іммобілізації, А – число рухливих трепонем в контрольній пробірці, В – число рухливих трепонем у дослідній пробірці. Реакція вважається позитивною, коли відсоток іммобілізації становить 50 і більше, слабопозитивною – від 30 до 50, сумнівною – від 20 до 30 і негативною – від 0 до 20.

Приклад позитивної РІТ:

Таблиця 63

Постановка реакції іммобілізації трепонем (мікроанаеростатна методика)

Компоненти, мл	Номер пробірки						
	дослід		контроль компонентів				
	1 (дослідна)	2 (контрольна)	1	2	3	4	5
Досліджувана сироватка	0,05	0,05	-	-	-	-	-
Комплемент активний	0,15	-	0,15	0,15	0,15	-	-
Комплемент інактивованій	-	0,15	-	-	-	0,15	-
Антиген	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35
Позитивна сироватка	-	-	0,05	0,05	-	-	-
Негативна сироватка	-	-	-	-	0,05	0,05	-

У практичних лабораторіях використовують більш простий меланжерний метод РІТ за М.М. Овчинниковим. Анаеробні умови дослідження створюються вміщенням реагуючої суміші (сироватки, антиген, комплемент) у меланжер, обидва кінці якого закривають гумовим кільцем. Меланжерна методика дозволяє обходитись без складного обладнання та апаратури для створення анаеробіозу, але дає такі результати, які не поступаються класичній мікроанаеростатній методиці.

Реакції іммобілізації трепонем та імунофлуоресценції вважають найбільш специфічними в серологічній діагностиці сифілісу. І все ж таки, РІТ, незважаючи на її специфічність, не рекомендують для використання в широкій практиці через трудомісткість постановки.

Імуноферментний аналіз (ІФА) проводять як із кадріоліпіновим антигеном (неспецифічна, відбіркова реакція), так і з трепонемним (специфічна реакція), яка підтверджує діагноз сифілісу.

Принцип непрямого методу ІФА полягає в тому, що до антигена, адсорбованого на твердій фазі в лунках планшети, вносять досліджувану сироватку. Якщо вона містить антитіла проти трепонем, утворюється комплекс антиген-антитіло (I фаза). Після відмивання незв'язаних неспецифічних антитіл у лунки вносять антиглобулінову сироватку, кон'юговану з ферментом (частіше всього з пероксидазою хрину). Кон'югат міцно приєднується до комплексу антиген-антитіло (II фаза).

Після відмивання незв'язаного кон'югату в лунки додають забарвлюючий субстрат ОФД – ортофенілєндіамін (III фаза). Пероксидазну реакцію зупиняють, додаючи сірчану кислоту. Для контролю ставлять такі ж проби з позитивною та завідомо негативною сироватками.

Облік результатів аналізу проводять за допомогою фотометра, який визначає оптичну густину в двохвильовому режимі (492 нм і 620 нм). Для постановки реакції ензимічених антитіл, окрім фотометра, потрібні одно- та восьмиканальні автоматичні піпетки з поліпропіленовим наконечником і відповідні набори діагностичних тест-систем.

Метод ІФА знаходить широке використання в серологічній діагностиці сифілісу. Він однаково ефективний для виявлення хвороби в інкубаційному періоді (через 1-2 тижні після інфікування), при клінічних проявах хвороби і прихованих її формах. Дуже часто ІФА використовують при скринінгових обстеженнях населення, особливо на станціях переливання крові.

У лабораторній практиці інколи застосовують також реакцію імуного прилипання (РІП) та реакцію непрямої гемаглютинації (РНГА). Перша з них ґрунтується на тому, що патогенні тестикулярні трепонеми штаму Нікольса при змішуванні з сироваткою хворого в присутності комплементу і еритроцитів людини прилипають до поверхні червоних кров'яних тілець. РНГА досить широко використовується для діагностики сифілісу завдяки своїй методичній простоті. Вона стає позитивною вже через три тижні після зараження. Позитивний результат реакції залишається впродовж років після видужання. Аналогом цієї реакції за кордоном є ТРНА (*Treponema pallidum haemoagglutination*).

Ендемічні побутові трепонематози

В ряді країн Африки, Південної Америки, Азії зустрічаються хронічні трепонематози – фрамбезія, пінта, беджель, які передаються переважно побутовим шляхом.

Фрамбезія (тропічна гранулема) – захворювання, що має хронічний рецидивуючий характер, характеризується ураженням шкіри, слизових оболонок, кісток

і суглобів, частіше зустрічається у дітей і підлітків, що проживають у країнах із вологим тропічним кліматом. Збудником хвороби є *Treponema pertenue*, яка за своїми морфологічними, тинкторіальними і культуральними властивостями подібна до блідої трепонеми.

Матеріалом для лабораторної діагностики фрамбезії служать виділення або біоптати з папул і папілом (фрамбезидів), а також пунктати лімфатичних вузлів, які досліджують методом надавленої краплі в темному полі зору. У свіжих папулах за цим методом трепонеми фрамбезії виявляють у 80-100 % випадків. Однак відрізнити їх від блідої трепонеми в темному полі зору, а також за допомогою сріблення чи інших методів забарвлення практично неможливо. На відміну від *T.pallidum* збудник фрамбезії зникає з регіонарних лімфатичних вузлів зразу ж після загоювання фрамбезидом.

Серологічна діагностика захворювання базується на виявленні антитіл у сироватці крові за допомогою реакції Вассермана, мікропреципітації, іммобілізації трепонем, РІФ, РНГА, ІФА.

Пінта (карате, плямиста хвороба) – первинно-хронічний генералізований трепонематоз, що характеризується появою на шкірі поодиноких, а пізніше множинних плям червоного або синьо-фіолетового кольору і гіперкератозу. На уражених ділянках настає депігментація типу вітіліго. Пізніше виникає поліаденіт, ураження кісток, внутрішніх органів і нервової системи. Частіше хворіють темношкірі люди всіх вікових категорій. Збудник – *Treponema carateum*. У морфологічному, культуральному і антигенному відношенні вона подібна до блідої та інших видів трепонем. При експериментальному зараженні кроликів, гвінейських свинків і хом'ячків у них не виникає специфічних уражень шкіри.

Для лабораторної діагностики карате від хворих беруть зскрібки або біоптати уражених ділянок шкіри і сироватку крові.

Бактеріоскопічна діагностика ґрунтується на виявленні трепонем у досліджуваному матеріалі за допомогою темнопольного мікроскопа, а також при забарвленні мазків за Романовським-Гімзою.

Для серологічної діагностики пінти цілком придатні всі методи виявлення антитіл у сироватці крові, які використовують при розпізнаванні сифілісу. Особливо це стосується таких реакцій як РЗК, РІФ, РІТ, РНГА, ІФА та ін. Оскільки *T. carateum* дуже подібна до збудників сифілісу і фрамбезії, діагностична цінність серологічних реакцій невелика і використання їх для диференціації вказаних захворювань важливого значення не має.

Беджель (ендемичний сифіліс) – хронічний генералізований трепонематоз, широко розповсюджений в Африці, Турції, Індії, Пакистані, Австралії і на Балканах. Захворювання характеризується висипанням на шкірі й слизових оболонках, які нагадують ураження при вторинному сифілісі. Через 1-3 роки появляються ураження підшкірної клітковини, кісток і суглобів, подібні до гумозного сифілісу. Але уражень внутрішніх органів, серцево-судинної й нервової системи не спостерігається. Основний спосіб передачі хвороби – контактний, через шкірні покриви.

Збудником беджелю є *Treponema endemicum* (*T. bejel*). За морфологічними і біологічними властивостями вона не відрізняється від блідої трепонеми. Ряд авторів розглядають її як різновид *T. pallidum*, а захворювання – як окрему форму сифілісу. Але при беджелі ніколи не розвивається первинна сифілома (твердий шанкр).

Матеріал для лабораторного дослідження – зскрібки з елементів висипу, пунктати лімфатичних вузлів, біоптати гумових уражень, сироватка крові.

Методика бактеріоскопічної діагностики (виготовлення надавленої краплі і дослідження її в темному полі зору, забарвлення мазків за Романовським-Гімзою, сріблення за Левадіті чи Морозовим) така сама, як і при сифілісі.

Для проведення серологічних досліджень у хворих на беджелю придатні всі ті реакції, що використовуються при сифілісі, але антитіла виявляють у значно нижчих титрах. Тому діагностику захворювання в більшості випадків проводять на основі клінічних симптомів.

Лептоспіроз

Лептоспіроз (водна гарячка) – гостра зоонозна природно-вогнищева інфекційна хвороба, що викликається лептоспірами і супроводжується гарячкою, ураженнями нирок, печінки, серцево-судинної і нервової систем, у тяжких випадках жовтяницею і геморагіями.

Всі патогенні лептоспіри об'єднані в один вид *Leptospira interrogans*, а сапрофітні – в *L. biflexa*. Тепер відомо понад 200 сероварів лептоспір, які складають 38 серогруп. На території України виділяють 13 сероварів, з яких захворювання найчастіше викликають *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *L. grippityphosa*, *L. hebdomadis*, *L. canicova*, *L. pomona*.

Резервуаром і джерелом збудника в природі є дикі гризуни (миші, полівки, ондатри) та домашні тварини (свині, корови, кози, коні, собаки). Зараження людей відбувається через воду, контаміновану сечею хворих тварин та носіїв, або при догляді за хворою худобою.

Для лабораторної діагностики лептоспірозу використовують мікроскопічний, бактеріологічний, біологічний і серологічний методи дослідження.

Взяття і доставка досліджуваного матеріалу. Від хворого беруть кров, сечу, бронхоальвеолярні змиви, спинномозкову рідину (при наявності менингеальних симптомів); від трупів – кров, ліквор, гомогенати внутрішніх органів. За епідеміологічними показаннями досліджують воду, харчові продукти, гризунів на лептоспіроносійство, сечу домашніх тварин.

У перші дні захворювання, коли є гарячковий період, для посіву, постановки біопроби і первинної бактеріоскопії беруть кров; на 10-16-ий день хвороби – сечу і ліквор; на 5-15-ий день – досліджують сироватку крові на виявлення протилептоспірознних антитіл. Виділення чистих культур і зараження тварин проводять у режимних лабораторіях, куди матеріали доставляють із великими пересторогами спеціальним нарочним. У звичайних мікробіологічних лабораторіях проводять лише бактеріоскопічні й серологічні дослідження.

Мікроскопічний метод. Лептоспіри погано забарвлюються аніліновими фарбами, тому досліджують живі мікроорганізми в препаратах “надавленої краплі” за допомогою темнопольного мікроскопа з використанням сухого об’єктива (40×). Венозну кров в об’ємі 2 мл змішують із 2-ма мл 2 % розчину цитрату натрію. Отриману плазму центрифугують 30 хв при 3000 об/хв. Сечу, спинномозкову рідину і завесь паренхіматозних органів центрифугують протягом 2-х год при 4000 об/хв. Пастерівською піпеткою або бактеріологічною петлею наносять краплю осаду на тонке предметне скло (1-1,1 мм), накривають покрівним скельцем. На верхню лінзу темнопольного конденсора наносять краплю дистильованої води, на яку кладуть препарат “надавленої краплі”.

При мікроскопії виявляють тонкі рухливі лептоспіри з багатьма дрібними завитками і характерними заворотами на кінцях, що надає їм вигляду літери S (рис. 82). Щоб запобігти діагностичним помилкам, необхідно пам’ятати, що деякі артефакти (нитки фібрину, оболонки еритроцитів), які нагадують лептоспіри, не мають самостійного руху. Виявити збудників лептоспірозу за допомогою мікроскопії можна лише у свіжому досліджуваному матеріалі.

Чутливість бактеріоскопічного методу – 10^6 клітин/мл. Кількість мікроорганізмів у крові хворих під час лептоспіремії не перевищує 10^4 - 10^6 клітин/мл, тому діагностична цінність цього методу недостатня для виявлення збудників на ранніх стадіях хвороби. Надійніші результати дає метод імунофлуоресценції з використанням специфічних люмінесцентних сироваток.

Якщо неможливо застосувати метод прямої мікроскопії нативних матеріалів, можна вдаватися до забарвлення фіксованих мазків за Романовським-Гімзою або негативного контрастування конго червоним. Однак після такої обробки морфологія лептоспір змінюється, що може призвести до помилкових оцінок.

Бактеріологічний метод. Класичний метод виділення чистих культур лептоспір потребує складних живильних середовищ і багато часу – до 1-2-х місяців. Використовують рідкі середовища Фервольта-Вольфа, Уленгута, Терських, основним компонентом яких є інактивована кроляча сироватка.

Кров, сечу, спинномозкову рідину сіють по 10-20 крапель у 3-5 пробірок із середовищем. Посіви інкубують при температурі 28-30 °С. Лептоспіри розмножуються дуже повільно і не викликають помутніння середовища. Тому для виявлення їх росту через 7-10 днів інкубації з кожної пробірки виготовляють препарат “надавленої краплі” і мікроскопують у темному полі. Якщо ріст лептоспір не виявляють, посіви продовжують вирощувати в термостаті й мікроскопують через кожні 7-10 днів. При відсутності росту протягом 3-х місяців видають негативний результат.

При виявленні лептоспір у будь-якій пробірці необхідно зробити пересів на свіже середовище для збереження культури з метою її ідентифікації.



Рис. 82. Лептоспіри в темному полі зору.

Встановлення виду і серовару лептоспир проводять за допомогою реакції аглютинації і лізису з типовими діагностичними сироватками. Частота виділення культур коливається від 29 до 48 %.

Сучасна методика полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), яка ґрунтується на високій специфічності множення *in vitro* послідовності селективної ДНК, виявляє лептоспир у перші дні хвороби, навіть якщо їх кількість незначна (1-10 клітин/мл). Постановка ПЛР із застосуванням довільних праймерів дозволяє диференціювати збудників на внутрішньовидовому і субсероварному рівнях. Для ідентифікації лептоспир за цією методикою потрібно всього 10-12 год. Особливо показана реакція для виявлення збудників в сечі. ПЛР виявилась позитивною в 94,4 % випадків.

Лептоспіри в досліджуваному матеріалі можна виявити за допомогою методу прямого імуоферментного аналізу. Тепер для ІФА розроблено і впроваджено в практику високоефективний родоспецифічний діагностикум – пероксидазний анти – *Patos* 1-кон'югат. Чутливість методу – $1,5 \cdot 10^4$ клітин/мл. Результат видають через 24 год від початку дослідження.

Біологічний метод. У випадках забруднення досліджуваного матеріалу сторонньою мікрофлорою (сеча, вода, ґрунт, харчові продукти тощо) проводять зараження гвінейських свинок і золотистих хом'ячків. Матеріал вводять внутрішньо-очеревинно або в скарифіковану шкіру подушечок задніх лапок. До *L. icterohaemorrhagiae* особливо чутливі гвінейські свинки. Через 5-7 днів після зараження у них виникає гарячка, жовтяничне забарвлення склер і слизових оболонок, крововиливи в органи і тканини. Лептоспіри виявляють у нирках, печінці, легенях методом темнопольної мікроскопії.

Для зараження іншими сероварами лептоспир найбільш придатні золотисті хом'ячки, яким матеріал вводять підшкірно, внутрішньошкірно, в черевну порожнину або у вену. Після загибелі тварин від них виділяють чисту культуру та ідентифікують її за допомогою реакції аглютинації і лізису.

При відсутності золотистих хом'ячків заражають молодих цуценят, у яких розвивається хронічний процес, що триває декілька місяців. Лептоспіри легко виявити в сечі тварин.

Серологічні дослідження. У практичних лабораторіях найчастіше застосовують реакцію мікроаглютинації і лізису лептоспир (РМАЛ). Для її постановки використовують живі культури лептоспир 5-12-денного вирощування зі щільністю 50-100 клітин у полі зору. Лептоспіри повинні рухатись без спонтанної аглютинації. Для постановки РМАЛ рекомендовані ВООЗ стандартні культури 13 серогруп, окрім того, беруть і діагностичні штами українського походження. Реакцію ставлять в аглютинаційних пробірках або в лунках планшет за стандартною методикою (табл. 64).

Облік реакції аглютинації проводять шляхом виготовлення з кожної пробірки препарату “надавленої краплі” й дослідженні її під мікроскопом у темному полі зору. При цьому слід розрізняти феномени лізису і аглютинації, які настають одночасно. Лізис характеризується набряком, зернистістю лептоспир і втратою рухливості. Зернисті лептоспіри склеюються по 3-8 особин, які тут же розпадаються

Таблиця 64

Схема постановки реакції аглютинації і лізису лептоспир

Компоненти, мл	Номер пробірки						
	1	2	3	4	5	6	7 (контр.)
Ізотонічний розчин хлориду натрію	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Сироватка хворого 1:25	0,2 →	→	→	→	→	↓	-
Розведення сироватки	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	-
Культура живих лептоспир	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Експозиція 60 хв при 37 °С або при 25 °С							

на окремі зерна, які пізніше лізуються повністю. Лізис відбувається в перших пробірках із меншими розведеннями сироватки. Феномен аглютинації виглядає в полі зору як утворення клубків ("павучків"), тобто склеювання лептоспир між собою. Він спостерігається в наступних пробірках із більшими розведеннями сироватки. Діагностичний титр реакції становить 1:100 і більше для лізису, 1:400-1:1600 і більше для аглютинації. Реакцію необхідно ставити повторно методом парних сироваток для визначення наростання титру антитіл.

Для визначення специфічних антитіл використовують також хімічно стабільні мікрокапсули з адсорбованими на еритроцитах барана антигенами лептоспир. Показники мікрокапсульного аглютинаційного тесту у 5-8 разів вищі, ніж в РМАЛ. Антитіла за допомогою цього високоспецифічного тесту можна виявити на 1-3-й дні хвороби.

Почали широко використовувати і реакцію непрямой гемаглютинації з відповідними родоспецифічними і серогрупоспецифічними еритроцитарними діагностикумами.

Останнім часом запропоновано реакцію латекс-аглютинації з ліпополісахаридним стандартним латексним *Pomona*-діагностикумом.

Більш чутливий метод непрямой імуноферментного аналізу. За його допомогою протилептоспірознi антитіла в діагностичному титрі виявляються на 5-й день хвороби. Виготовлені діагностичні тест-системи для визначення антитіл, де як фермент використані пеніциліназа або каталаза, які мають перевагу порівняно з пероксидазою хрому.

Можна використати як скринінг на антитіла до багатьох сероварів лептоспир метод зустрічного імуноелектрофорезу.

Для визначення протилептоспірозних антитіл застосовують і РЗК. Вона високоспецифічна, чутлива, антитіла в ній виявляються раніше, ніж в реакції мікроаглютинації і лізису. Антигеном є метанолові екстракти з *L. interrogans*, сероварів *icterohaemorrhagiae*, *canicola* та *L. biflexa*.

Бореліози

До бореліозів відноситься ряд самостійних нозологічних форм захворювання, що викликаються спірохетами роду *Borrelia*: поворотний тиф, кліщова поворотна гарячка і хвороба Лайма.

Епідемічний поворотний тиф

Поворотний тиф (епідемічний, вошивий) – гостра трансмісивна рецидивуюча інфекційна хвороба, яку викликає *Borrelia recurrentis*, характеризується загальною інтоксикацією, поворотною гарячкою, ураженнями печінки, селезінки, мозкових оболонки та інших органів. При високій вошивості серед населення може мати епідемічне розповсюдження. Переносником хвороби є воші: *Pediculus vestimenti*, *P. capitis*.

Основний метод лабораторної діагностики поворотного тифу – мікроскопічне дослідження крові хворого в препараті товстої краплі і звичайному мазку. Для диференціації вошивого і кліщового поворотних тифів використовують біологічну пробу на гвінейських свинках.

Бактеріоскопічне дослідження. У хворого беруть кров із пальця під час нападу гарячки до початку або в перерві антибіотикотерапії, виготовляють препарат товстої краплі й мазок. У період ремісії можна брати для дослідження кістковий мозок. Висушену товсту краплю не фіксують, а безпосередньо забарвлюють за методом Романовського-Гімзи. Можна також фарбувати метиленовим синім або фуксином. На товсту краплю наносять барвник Романовського спочатку на 5 хв для того, щоб пройшов гемоліз, потім його замінюють на свіжий і витримують ще 40 хв. Препарат обережно промивають водою, висушують і мікроскопують під імерсійним об'єктивом. Борелії поворотного тифу забарвлюються в синьо-фіолетовий колір і мають вигляд тонких довгих ниток із 3-5-ма нерівномірними завитками і загостреними кінцями, які розташовані позаклітинно. Величина їх у кілька разів перевищує діаметр лейкоцитів (рис. 83; див. вкл., рис. 24).

Якщо в товстій краплі знаходяться великі скупчення борелій, їх важко відрізнити від ниток фібрину. В таких випадках забарвлюють звичайний мазок крові, який перед цим обов'язково фіксують етанолом або сумішшю Никифорова.

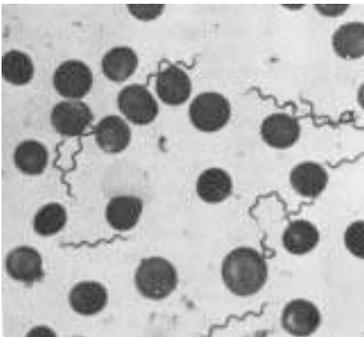


Рис. 83. Борелії в мазку крові.

При мікроскопії мазка досить чітко видно борелії з їх характерними нерівномірними вторинними завитками. Якщо в товстій краплі борелії не виявлено, мазок не досліджують.

Збудник поворотного тифу легко виявляють за допомогою методу висячої краплі в темному полі зору, де борелії розпізнають за їх безладним рухом. Можна виготовляти з крові і тушеві препарати за Буррі, при мікроскопуванні яких борелії виглядають як сріблясті нитки на темному полі.

У період апірексії за допомогою мікроскопічних методів виявити борелії не вдається. В таких випадках вживають метод збагачення. У хворого беруть 8-10 мл крові, отримують сироватку, яку центрифугують протягом 60 хв при 3-4-х тис. об/хв. Із осаду виготовляють надавлену краплю, яку досліджують у темному полі. З осаду можна виготовляти мазки, які забарвлюють за Романовським-Гімзою або фуксином Пфейфера.

Бактеріологічне дослідження. Культури борелій можна виділити від хворого шляхом посіву досліджуваного матеріалу на рідкі живильні середовища з кров'ю, сироваткою, шматочками тканин і вирощування в анаеробних умовах при температурі 28-30 °С. Ще краще вдається виростити їх на хоріоналантаїсній оболонці курячих ембріонів або шляхом зараження платяних вошей. Однак виділення культур борелій на живильних середовищах малоефективне. Практичні лабораторії цими методами не користуються.

Біологічний метод. Як додатковий метод діагностики епідемічного поворотного тифу застосовують зараження кров'ю хворих молодих білих щурів або білих мишей. Останнім вводять 0,5 мл крові внутрішньоочеревинно, а білим щурам – 3-5 мл. Через 2-4 дні у заражених тварин досліджують кров із хвостових вен, де борелії виявляють мікроскопічним методом. Гвінейські свинки нечутливі до *B. recurrentis*, але чутливі до збудників кліщових борелій.

Серологічне дослідження. Поворотний епідемічний бореліоз супроводжується наростанням антитіл у високих титрах, але у зв'язку з постійною зміною специфічності поверхневих антигенів із кожним наступним гарячковим приступом серологічні реакції не набули широкого застосування.

Інколи використовували імунологічну реакцію Рікенберга-Брусіна. Це реакція навантаження борелій тромбоцитами. Сироватку крові хворого змішували з цитратною плазмою крові гвінейських свинок в однакових об'ємах. До цієї суміші додавали культуру борелій, ретельно перемішували, інкубували 15 хв у термостаті, а потім виготовляли препарат “надавленої краплі” й досліджували в темному полі зору з імерсійним об'єктивом. У присутності специфічних антитіл тромбоцити гвінейської свинки обліплювали тіла борелій і останні переставали рухатись.

Отже, виявлення борелій методом товстої краплі та звичайних мазків крові в період нападу гарячки є швидким і вирішальним методом лабораторної діагностики епідемічного поворотного тифу.

Ендемічний поворотний тиф

Поворотна кліщова гарячка – трансмісивна рецидивуюча інфекційна хвороба, яка викликається бореліями і передається кліщами. Залежно від резервуару, географічного регіону і переносника розрізняють біля 20 самостійних нозологічних форм ендемічного поворотного тифу, кожна з яких має свого збудника. Найчастіше ці захворювання викликають *Borrelia caucasica*, *B. persica*, *B. duttoni*, *B. hispanica*, *B. hermsii*, *B. latyschewii* та ін. Вони є своєрідними ековарами збудника хвороби. За своєю морфологією всі вони схожі на борелії епідемічного поворотного тифу. Клінічна картина цих захворювань теж подібна. Люди заражаються при укусі кліщів. Останні паразитують на хворих гризунах і тваринах-носіях, заражаються від них бореліями і самі стають джерелом збудника в природі.

Матеріалом для мікробіологічної діагностики ендемічного поворотного тифу служить кров хворих. Для виявлення борелій проводять бактеріоскопію товстої краплі і звичайних тонких мазків крові, забарвлених за Романовським-Гімзою,

метиленовим синім чи фуксином. Необхідно пам'ятати, що при цьому захворюванні спірохетемія досить помірна або навіть слабка (1-2 борелії в декількох краплях), але вона має місце і між нападами. Суттєва морфологічна особливість борелій ендемічного поворотного тифу та, що при дослідженні їх у темному полі зору вони мають два контури, а *B. recurrentis* – один.

Досить суттєву допомогу при розпізнаванні ендемічного поворотного тифу може надати зараження гвінейських свинок. Кров хворого в кількості 3-5 мл вводять у черевну порожнину, або 1-2 краплі – у кон'юнктиву ока чи слизову оболонку носа. Через 3-5 діб у крові і паренхіматозних органах тварин мікроскопічно виявляють велику кількість борелій. Біологічна проба одночасно дозволяє диференціювати вошивий і кліщовий поворотні тифи. *B. recurrentis* для гвінейських свинок непатогенна.

Бореліоз Лайма

Хвороба Лайма (хронічна мігруюча еритема, лаймобореліоз) – хронічна або рецидивуюча трансмісивна природно-вогнищева інфекція, що вражає нервову, серцево-судинну системи, шкіру й суглоби, супроводжується гарячкою, ознобом, головним болем. У половини захворілих спостерігаються вторинні висипи. Хвороба передається через укуси іксодових кліщів, що паразитують на диких і домашніх тваринах.

Серед борелій, що викликають хворобу Лайма, на основі аналізу їх ДНК останнім часом ідентифіковані три самостійні види: *Borrelia burgdorferi*, *B. garinii*, *B. afzelii*. Всі вони можуть довгий час персистувати в організмі людини.

Мікробіологічна діагностика. Борелії, що викликають хворобу Лайма, дуже вибагливі до живильних середовищ та умов культивування. Лише останнім часом створене середовище BSK-II, придатне для їх вирощування та виділення в чистій культурі.

Матеріалом для лабораторного дослідження служить ексудат із уражень шкіри, спинномозкова рідина, кров. У зв'язку з відсутністю борелій у периферичній крові виділити гемокультуру практично не вдається. Але вже є спроби виділити та ідентифікувати чисті культури збудників з уражень шкіри і ліквору. Частіше виявляють борелій у цих же матеріалах мікроскопічним методом за допомогою темного поля або в забарвлених азур-еозином мазках. *B. burgdorferi* є однією з найкрупніших борелій.

Для виявлення борелій в тканинах і рідинах організму використовують полімеразну ланцюгову реакцію. Вже розроблені і впроваджені в практику специфічні тест-системи для цієї реакції.

І все ж основу лабораторної діагностики лаймобореліозу складають серологічні реакції. Зокрема досить широко використовують реакцію непрямой імунофлуоресценції та імуноферментний аналіз із специфічним антигеном, адсорбованим на лунках полістиролових планшет. Великі перспективи має широке впровадження методу вестерн блоту, за допомогою якого можна виявити антитіла до унікального білка *B. burgdorferi*.

Рикетсіози

Група гострих трансмісивних інфекційних хвороб, що викликаються рикетсіями, отримала загальну назву рикетсіози. Ці захворювання характеризуються гарячкою, генералізованим васкулітом, висипанням на шкірі, ураженням центральної нервової системи. Розрізняють антропонозні й зоонозні рикетсіози.

Патогенні рикетсії належать до родини *Rickettsiaceae* і поділені на три роди: *Rickettsia*, *Coxiella*, *Rochalima*. Залежно від біологічних властивостей збудників, клінічної картини хвороб та їх епідеміологічних особливостей виділяють 5 груп рикетсіозів: група висипного тифу, гарячка цуцугамуші, група кліщових плямистих гарячок, пневморикетсіоз (Ку-гарячка) і пароксизмальний рикетсіоз (волинська п'ятиденна гарячка). Всі види рикетсій адаптовані до існування в організмі вошей, бліх і кліщів, які є переносниками захворювань.

Епідемічний висипний тиф

Збудником висипного тифу є *Rickettsia prowazekii*. Захворювання характеризується раптовим початком, високою температурою, сильною інтоксикацією, ураженням прекапілярних розгалужень артерій і розеолезно-петехіальним висипом.

Будь-які маніпуляції з рикетсіями Провачека дуже небезпечні. Тому виділення збудника з крові хворих або іншого досліджуваного матеріалу, а також зараження тварин, курячих ембріонів і культур клітин проводять лише при наукових дослідженнях у спеціальних режимних лабораторіях.

Широкі можливості для виявлення рикетсій в досліджуваному матеріалі відкриває полімеразна ланцюгова реакція. Вже виготовлені праймери для родоспецифічної і видоспецифічної діагностики рикетсій з чутливістю 1-10 клітин на пробу. Метод ПЛР дає змогу рано і швидко поставити діагноз висипного тифу. При цьому можна використати не тільки свіжий нативний чи заморожений матеріал, а й фіксований формаліном або метанолом.

Для виявлення рикетсій у досліджуваному матеріалі, в організмі заражених тварин, курячому ембріоні або в тілі вошей, бліх і кліщів використовують мікроскопію. Метод забарвлення мазків повинен чітко й контрастно виявити як позаклітинні, так і внутрішньоклітинні (в тому числі й внутрішньоядерні) форми рикетсій. Для цієї мети найчастіше вживають методи Романовського-Гімзи і Здродовського.

При фарбуванні азур-еозином протягом 18-20 год рикетсії набувають різних відтінків голубого кольору. Мазки при цьому необхідно фіксувати метанолом або сумішшю Никифорова.

Швидше виявляють рикетсії при забарвленні за способом Здродовського. Матеріал наносять тонким шаром на предметне скло, фіксують на полум'ї, наливають на 5 хв розведений карболовий фуксин (10-15 крапель барвника на 10 мл дистильованої води). Препарат знебарвлюють 0,15 % розчином оцтової або соляної кислоти, промивають водою і протягом 10 с дофарбовують 0,5 % водним розчином метиленового синього. Рикетсії забарвлюються в рубіново-червоний, цитоплазма клітин – в голубий, а ядра – в синій колір (див. вкл., рис. 25).

Надійніші результати виявлення рикетсій у досліджуваному матеріалі дають прямий і особливо непрямий методи флуоресценції. Прямий метод полягає в тому, що виготовлений і висушений мазок крові, препарат-відбиток або тонкий зріз органів тварин, вошей тощо обробляють специфічною флуоресцентною сироваткою і досліджують під люмінесцентним мікроскопом. При наявності рикетсій видно специфічне золотаво-зелене світіння.

Більш прогресивний непрямий метод пов'язаний із попередньою обробкою мазків чи препаратів звичайною імунною (нелюмінесцентною) сироваткою, а потім міченою антиглобуліновою сироваткою проти глобулінів того виду тварин, на яких отримували звичайну імунну діагностичну сироватку. Можливе також використання антикомплементарної флуоресцентної сироватки. В обох випадках при позитивному результаті видно характерне люмінесцентне світіння.

А поки що для діагностики епідемічного висипного тифу використовують, в основному, серологічні реакції, особливо такі, як аглютинації, зв'язування комплексу, непрямой гемаглютинації, непрямий гемолізу та імуноферментний аналіз.

Серологічна діагностика. Для макроскопічної реакції аглютинації Вейгля використовують корпускулярний рикетсіозний антиген (500 млн клітин/мл). Сироватку хворого розводять від 1:40 до 1:1280 в об'ємі 0,25 мл і в кожен пробірку додають по 0,25 мл антигену (табл. 65). При цьому необхідно враховувати, що після внесення антигену розведення сироватки подвоюється.

Облік реакції проводять неозброєним оком або за допомогою аглютиноскопа через 2 год після того, як пробірки вийняли з термостата. Аглютинат рикетсій виглядає як ніжний, дрібнозернистий осад на дні пробірки, інтенсивність якого позначають за чотириплюсовою системою. Реакцію Вейгля вважають високоспецифічною. Вона випадає в діагностичному титрі 1:40-1:80 і більше майже у 100 % хворих на висипний тиф вже на 4-5-й день хвороби. Ще більш достовірні результати отримують при постановці реакції методом парних сироваток.

Таблиця 65

Схема постановки реакції аглютинації Вейгля

Компоненти, мл	Номер пробірки						
	1	2	3	4	5	6	7 (контр.)
Ізотонічний розчин хлориду натрію	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Сироватка хворого 1:10	0,25→	→	→	→	→	↓	-
Антиген рикетсій Провачека	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Остаточне розведення сироватки	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	-
Експозиція в термостаті 18 год при 37 °С							

Широко вживану в минулому неспецифічну реакцію аглютинації Вейля-Фелікса з діагностикомом *Proteus vulgaris* OX₁₉ тепер не використовують.

Досить чутливим і високоспецифічним методом серологічної діагностики висипного тифу є постановка реакції зв'язування комплексу. Комплекси зв'язуючі антитіла появляються в сироватці крові на 5-6-й день хвороби і досягають

максимальних титрів на 15-16-й день. Через 1-2 місяці титр їх починає падати, але ці антитіла зберігаються в організмі протягом багатьох років. РЗК особливо часто використовують для диференціальної діагностики між епідемічним і ендемічним висипним тифом, а також з рецидивною хворобою Брілля-Цінссера.

Сироватку крові хворого розводять від 1:10 до 1:250. Антигенами для РЗК можуть бути як корпускулярні, так і розчинні. Пробірки ретельно струшують після додавання кожного компоненту. Першу фазу реакції проводять або при низькій температурі в холодильнику протягом 18-20 год, або при 37 °С впродовж 60 хв. Другу фазу реакції після додавання гемолітичної системи проводять у термостаті протягом 30-45 хв.

Облік РЗК роблять через 1-2 год після того, як пробірки вийняли з термостату, за класичною чотириплюсовою системою. Реакцію вважають позитивною при титрі сироватки 1:60 під час захворювання і 1:10 – при ретроспективній діагностиці.

Ще більш чутливою є реакція непрямой гемаглютинації, яка стає позитивною з 3-4-го дня захворювання. Вже в початковий період хвороби діагностичний титр РНГА може досягати 1:1000, а через 2-3 тижні – 1:4000-1:64000. У зв'язку з цим інактивовану сироватку хворого розводять у пробірках чи лунках полістиролових планшет від 1:250 до 1:64000 в об'ємі 0,4 мл. У кожен пробірку (лунку) додають по 0,1 мл антигена, тобто 1 % зависі еритроцитів із адсорбованим на них рикетсіозним антигеном. Пробірки (пластини) ретельно струшують і вміщують у термостат на 45 хв при температурі 37 °С. Результат реакції враховують за наявністю або відсутністю гемаглютинації. обов'язково ставлять контроль сенсibiliзованих еритроцитів на відсутність спонтанної аглютинації.

Високу чутливість і специфічність має також реакція непрямой гемолізу, яку використовують як експрес-метод діагностики в ранній період хвороби. Для її постановки рикетсіозний антиген адсорбують на еритроцитах барана, а методика така сама, як і для РНГА, за винятком того, що після додавання антигена до різних розведень сироватки в кожен пробірку вносять по 0,1 мл комплекменту в розведенні 1:10. Пробірки вміщують у термостат на 60 хв. При позитивному результаті настає гемоліз еритроцитів. У контрольних пробірках гемоліз відсутній. Попередній облік цієї реакції можна проводити вже через 30 хв, а остаточний – через годину.

Для серологічної діагностики висипного тифу запропоновано імуноферментний метод у модифікації “захвату” антитіл IgM, які нагромаджуються при первинному захворюванні, що дозволяє диференціювати його від рецидивної форми Брілля-Цінссера.

Є спроба діагностувати епідемічний вошивий висипний тиф за допомогою внутрішньошкірної алергічної проби, яка виявляє гіперчутливість сповільненого типу.

Ендемічний висипний тиф

Ендемічний (блошиний, шурячий) висипний тиф – гостра природно-вогнищева зоонозна інфекційна хвороба, характеризується гарячкою, головним болем,

розеольозно-папульозним висипом і відносно доброякісним перебігом. Людина заражається від гризунів аліментарним шляхом, або хвороба передається блохами, значно рідше кліщами.

Збудник – *Rickettsia typhi* – за своїми розмірами, морфологією і антигенними властивостями дуже подібний до рикетсій Провачка. *R. typhi* добре розмножується в жовтковому мішку курячих ембріонів, викликаючи їх загибель через 6-8 діб після зараження, патогенна для гвінейських свинок і білих мишей. Зараження останніх через ніс викликає смертельну пневмонію з нагромадженням великої кількості збудника в легеневій тканині, що легко виявити за допомогою бактеріоскопії.

У зв'язку з тим, що клінічна картина щурячого висипного тифу дуже подібна до легких форм епідемічного вошивого тифу, основне значення в лабораторній діагностиці й диференціації обох нозологічних форм мають серологічні реакції.

Серологічна діагностика. Надійне розмежування ендемічного й епідемічного висипного тифів найчастіше проводять за допомогою реакцій аглютинації, зв'язування комплементу, непрямой гемаглютинації та імуноферментного аналізу. Кожну з цих серологічних реакцій проводять паралельно з антигенами рикетсій щурячого тифу і рикетсій Провачка. У випадку ендемічного висипного тифу діагностичний титр сироватки хворого буде у 3-4 рази більшим із *R. typhi*, ніж із рикетсіями Провачка, і навпаки. Якщо різниця між титрами антитіл у реакціях із рикетсіями Провачка і рикетсіями ендемічного тифу незначна, проводять біологічне дослідження.

Біологічна проба. Гвінейських свинок-самців заражують внутрішньоочеревинно кров'ю хворого. Поява у тварин гарячки і рикетсіозного періорхіту (скротального феномену) безумовно підтверджує діагноз ендемічного висипного тифу, особливо якщо в зскрібках з оболонок уражених яєчок мікроскопічно виявляють велику кількість рикетсій.

Ку-гарячка

Ку-гарячка (пневморикетсіоз) – гостра природно-вогнищева зоонозна інфекційна хвороба, що характеризується гарячкою, поліморфною клінічною картиною і частим запаленням легень. Від інших рикетсіозів відрізняється відсутністю висипу.

Збудник – *Coxiella burnetii* – строгий внутрішньоклітинний паразит, добре розмножується в жовтковому мішку курячого ембріона і в культурах фібробластів курки, мишачих клітин L та ін. Серед лабораторних тварин найбільш чутливі до рикетсій Бернета гвінейські свинки.

Люди заражуються від великої і малої рогатої худоби, смугастих щурів, інших гризунів і птахів різними способами: водним, аерогенним, аліментарним (молоко і м'ясо), значно рідше через укуси кліщів.

Клінічна діагностика Ку-гарячки утруднюється різноманітністю проявів хвороби, тому лабораторні дослідження особливо перших випадків мають вирішальне значення.

Матеріалом для дослідження служить кров, харкотиння, сеча, спинномозкова рідина. Для виділення збудника проводять внутрішньоочеревинне зараження гвінейських свинків, білих мишей або курячих ембріонів чи культур клітин. Рикетсії Бернета потім виявляють мікроскопічним методом при забарвленні мазків за Романовським-Гімзою або за Здродовським. Для їх ідентифікації використовують специфічні сироватки. Виділення збудника забезпечує найбільш точну діагностику Ку-гарячки. Для виявлення рикетсій Бернета в організмі людей, тварин та інших біологічних об'єктах останнім часом створені діагностичні тест-системи на основі імуноферментного аналізу.

Серологічна діагностика зводиться до постановки реакцій зв'язування комплекменту, аглютинації й непрямой гемаглютинації. Найчастіше використовують РЗК. Комплекмент зв'язуючі антитіла появляються в крові вже наприкінці першого тижня хвороби, досягають найвищої концентрації через 3-4 тижні. Діагностичним титром РЗК вважають 1:8-1:16, а через місяць від початку хвороби він підіймається до 1:128-1:256 і зберігається дуже довго.

Реакція аглютинації рикетсій Бернета менш чутлива. Аглютиніни в діагностичному титрі (1:20 і вище) з'являються на 10-20-й день хвороби. Важливо ставити реакцію методом парних сироваток для виявлення кратності наростання титру антитіл у динаміці.

Реакція непрямой гемаглютинації значно чутливіша від попередніх. Методика її постановки така сама, як при висипному тифі, тільки замість еритроцитарного діагностикуму з рикетсій Провачека використовують еритроцити з адсорбованим на їх поверхні антигеном із рикетсій Бернета.

Алергічна проба. З діагностичною метою, а також при проведенні епідеміологічних обстежень ставлять алергічну внутрішньошкірну пробу. Реакція стає позитивною вже з 3-8-го дня хвороби. Корпускулярний або розчинний алерген із рикетсій Бернета вводять внутрішньошкірно в дозі 0,1 мл на внутрішньому боці передпліччя. При позитивному результаті через 24-48 год виникає характерна гіперемія, набряк розміром більше 1 см із центрально розташованим щільним інфільтратом. Позитивна алергічна реакція зберігається у перехворілих протягом багатьох років.

Північноазіатський рикетсіоз

Кліщовий висипний тиф сибіру – гостра природно-вогнищева зоонозна інфекційна хвороба, яку викликає *Rickettsia sibirica*. Вона характеризується гарячкою, наявністю первинного афекту, регіонарного лімфаденіту, рясного поліморфного розеолезно-папулезного висипу. Перебіг захворювання доброякісний; передається воно іксодовими кліщами. Збудник містить антиген, спільний з антигеном протей ОХ₁₉.

Для лабораторної діагностики цього рикетсіозу використовують біологічні й серологічні дослідження.

Біологічна діагностика. *R. sibirica* патогенна для мавп, кролів, гвінейських свинок, пацюків і білих мишей. Для виділення збудника від хворого у спеціальних лабораторіях заражують внутрішньоочеревинно самців гвінейських свинок кров'ю хворих, узятою в ранній період захворювання. У заражених тварин виникає гарячка і запалення яєчок (скротальний феномен) із нагромадженням великої кількості рикетсій у мезотелії їх оболонки. Можна культивувати збудника за методом Кокса в 4-5 добових курячих ембріонах при температурі 32-34 °С або в культурах клітин. Рикетсії добре забарвлюються за методом Здродовського і, як правило, локалізуються в ядрах клітин.

Серологічна діагностика. Найчастіше ставлять реакції зв'язування комплекменту та непрямой гемаглютинації. Обидві реакції проводять як з гомологічним антигеном (*R. sibirica*), так і з гетерологічними (*R. conori*, *R. prowazekii*, *R. akari*) для диференціації сибірського рикетсіозу від марсельської гарячки, висипного тифу і везикульозного рикетсіозу. Як РЗК, так і РНГА є досить чутливими і високоспецифічними реакціями, стають позитивними з 5-го дня хвороби, а після 10-го дня виявляються майже в 100 % випадків. Діагностичні титри РЗК – 1:20-1:60, РНГА – 1:200-1:3200.

Як додаткову в діагностиці захворювання можна використати реакцію Вейля-Фелікса з протейним діагностикумом OX_{19} , яка випадає позитивною у 75-90 % хворих.

Для ранньої діагностики запропонована реакція непрямой гемолізу, яка полягає в тому, що еритроцити барана, сенсibiliзовані рикетсіозним діагностикумом, лізуються в присутності специфічної сироватки і комплекменту. Ця реакція виявилась високоспецифічною і чутливішою ніж РЗК. За її допомогою антитіла в сироватці крові хворого виявляють на 4-6-й день хвороби. Реакцію непрямой гемолізу можна використати як експрес-метод діагностики, адже вона дає відповідь через 1-1,5 год від початку дослідження. Окрім того, вона відрізняється простою методикою і мінімальною затратою компонентів.

Останнім часом важливого діагностичного значення набула реакція імунофлуоресценції. Вона поєднує в собі серологічний та морфологічний методи і дозволяє швидко (протягом 1-2-х год) виявити й ідентифікувати рикетсії, їх антигени й антитіла.

Гарячка цуцугамуші

Японська річкова хвороба (цуцугамуші) – гостра природно-вогнищева інфекція, характеризується наявністю гарячки, первинного афекту, лімфаденіту, рясного макуло-папульозного висипу, ураженням нервової і судинної систем. За клінічною картиною подібна до висипного тифу.

Збудник – *Rickettsia tsutsugamushi* – мало чим відрізняються від інших рикетсій кліщової групи, погано фарбується фуксином, оскільки легко знебарвлюється кислотою. При забарвленні за Романовським-Гімзою мають пурпурний колір і розташовуються в цитоплазмі мононуклеарних клітин. Існує 5 сероварів рикетсій

цуцугамуші, які відрізняються за вірулентністю. Людина заражується від гризунів через укуси червонотілкових кліщів.

Для лабораторної діагностики захворювання використовують біологічні й серологічні дослідження.

Біологічна діагностика. Найточнішим методом розпізнавання японської річкової гарячки є виділення від хворих збудника цієї хвороби. Як безумовно й абсолютно достовірний цей метод вкрай необхідний для діагностики цього рикетсіозу в регіоні, де його виявляють уперше. Для цього декілька білих мишей (рідше хом'ячків, бавовняних щурів) заражають внутрішньоочеревинно, вводячи їм по 0,1-0,2 мл крові хворих, взятої під час гарячки. Ще кращі результати дає зараження тварин 0,2-0,3 мл 10 % емульсії кров'яних згустків. Через 6-14 днів після зараження миші гинуть. При розтині у них виявляють перитоніт із наявністю рикетсій в клітинах ексудату або в зскрібках із очеревини. Мазки або препарати-відбитки забарвлюють за методом Романовського-Гімзи.

R. tsutsugamushi легко виділити і шляхом зараження кров'ю хворих 6-7-денних курячих ембріонів у жовтковий мішок та інкубування їх при 35 °С протягом 4-5 діб. Виявлення рикетсій проводять ще в живих ембріонах, оскільки мікроби швидко лізуються після загибелі курячих зародків. У добре оснащених лабораторіях можна виділити рикетсії цуцугамуші й на культурах первинно-трипсинізованих фібробластів, а також на перещеплюваних культурах клітин L.

Виявити рикетсії в досліджуваному матеріалі можна й за допомогою реакції імунофлуоресценції. Але для цього потрібно мати відповідні типові люмінесцентні діагностичні сироватки.

Серологічна діагностика. Широко використовують постановку реакції аглютинації з протейним діагностикомом OX_K , оскільки даний серовар протею має спільний антиген із рикетсіями цуцугамуші. Діагностичний титр 1:160 і більше. Реакція Вейля-Фелікса з антигенами протеїв OX_{19} і OX_2 у хворих на японську гарячку дає негативні результати. Реакція аглютинації з використанням специфічного рикетсіозного антигена випадає в мінімальному діагностичному титрі 1:100. Але вона менш придатна для діагностики, оскільки антигенна структура рикетсій цуцугамуші в різних регіонах неоднакова, та й до того ж вона стає позитивною лише з другого тижня хвороби.

Більш специфічною є реакція зв'язування комплекменту з набором різних штамів збудника. Вона стає позитивною вже на першому тижні хвороби. Діагностичним вважається титр 1:10-1:20. Серологічні реакції необхідно ставити методом парних сироваток.

Є спроба діагностувати японську гарячку за допомогою реакції непрямой імунофлуоресценції, непрямой гемаглютинації та імуноферментного аналізу.

Пароксизмальний рикетсіоз

Волинська (окопна, п'ятиденна, пароксизмальна) гарячка – гостра трансмісивна інфекційна хвороба, що викликається *Rochalima quintana*, передається одерж-

ними вошами, характеризується повторними 5-денними нападами гарячки, розеолезним висипом, болями в кістках і м'язах, особливо в гомілкових.

Збудник має вигляд коротких паличок, дещо крупніших від збудника висипного тифу. На відміну від інших рикетсій *R. quintana* може рости на сироватково-кров'яному агарі, утворюючи круглі, напівпрозорі, слизові колонії, які появляються через 12-14 днів після посіву. Ніколи не виявляються внутрішньоклітинно. В антигенному відношенні однорідні. Спільні антигени з іншими рикетсіями і протеем не виявлені. Гвінейські свинки і білі миші до збудника волинської гарячки нечутливі.

Для мікробіологічної діагностики захворювання використовують біологічні й серологічні дослідження.

Біологічна діагностика пароксизмального рикетсіозу ґрунтується на виділенні рикетсій із крові хворого шляхом зараження платтяних вошей з наступним виявленням збудника в кишечнику цих комах, забарвленням мазків за методом Романовського-Гімзи. Але такий спосіб можна здійснити лише в спеціально оснащених лабораторіях досвідченими співробітниками. У звичайних практичних лабораторіях він не використовується. Замість цього можна посіяти досліджуваній матеріал на живильні середовища і виділити чисту культуру. В перших генераціях рикетсії ростуть повільно. Наступні субкультури виростають через 3-5 днів.

Серологічна діагностика. Більш простим і поширеним методом лабораторного дослідження при п'ятиденній гарячці є постановка реакції зв'язування комплекменту і непрямой гемаглютинації. РЗК ставлять із специфічним рикетсіозним антигеном. Реакція стає позитивною на 15-20-й день захворювання, діагностичні титри 1:32-1:256. Більш чутливою є реакція непрямой гемаглютинації. Широке використання цих реакцій обмежене відсутністю або слабкою якістю антигенних препаратів. Реакція аглютинації Вейля-Фелікса з усіма протейними антигенами (OX_2 , OX_{19} , OX_K) дає негативні результати.

Хламідіози

Інфекційні захворювання, що викликаються хламідіями, дістали загальну назву хламідіози. До них належить трахома, орнітоз (пситакоз), респіраторний та уrogenітальний хламідіоз. З кожним роком ці захворювання зустрічаються все частіше. Рід *Chlamydia* містить три патогенних для людини види: *C. trachomatis*, *C. psittaci*, *C. pneumoniae*.

Трахома

Трахома – хронічна інфекційна хвороба очей, що характеризується запаленням кон'юнктиви й рогівки з утворенням специфічних фолікулів і наступним їх рубцюванням. Хламідії трахоми мають 15 сероварів, 4 з них викликають трахому, 8 – кон'юнктивіт із включеннями (або бленорея з включеннями), решта – запалення сечостатевого органів і венеричний лімфогранулематоз.

Зараження трахомою відбувається від хворої людини через забруднені руки, рушники, платки, посуд тощо. Бленорея новонароджених із включеннями передається дитині під час пологів від матері, у якої *S. trachomatis* зберігається в слизовій сечостатевої системи органів.

Для лабораторної діагностики трахоми після анестезії ока ватним тампоном видаляють слиз і гній, тупим кінцем скальпеля зіскрібують епітелій кон'юнктиви. Основні стандартні методи діагностики такі: мікроскопічний (виявлення тілець Провачека-Хальбершtedтера в уражених клітинах), флуоресцентний (виявлення антигенів хламідій за допомогою РІФ), бактеріологічний (виділення збудника зараженням курячих ембріонів або культур клітин), серологічний (визначення специфічних антитіл у сироватці крові). Останнім часом створені й успішно використовуються тест-системи для проведення полімеразної ланцюгової реакції з метою виявлення збудника.

Бактеріоскопічне дослідження. Зскрібки (не мазки!) із кон'юнктиви наносять на предметні скельця, фіксують рідкими фіксаторами, забарвлюють за Романовським-Гімзою протягом 3-4-х год і мікроскопують. В епітеліальних клітинах видно кокоподібні включення розміром до 10 мкм. Можна досліджувати й нативні препарати під фазово-контрастним чи аноптральним мікроскопом. Ще краще використати метод прямої або непрямой імунофлуоресценції. Для цього мазки із зскрібок фіксують у холодному ацетоні протягом 15 хв, обробляють флуоресцентними антитілами й досліджують під люмінесцентним мікроскопом. При наявності хламідій трахоми видно острівці специфічного світіння в цитоплазмі клітин.

Бактеріологічне дослідження. Культивування збудника трахоми є золотим стандартом лабораторної діагностики захворювання в більшості країн світу. Для виділення хламідій досліджуваним матеріалом заражують курячі ембріони або культури клітин L-929, McCoу, Hela. При інфікуванні культур клітин використовують спосіб "примусової адсорбції" шляхом низькошвидкісного центрифугування матеріалу в пробірках з моношарами культур клітин. Матеріал попередньо обробляють гентаміцином, стрептоміцином і канаміцином. Заражені ембріони або культури клітин інкубують 5-6 днів при 35-36 °С. Розвиток хламідій виявляють за допомогою фазово-контрастної мікроскопії або імунофлуоресценції, ставлять пробу на глікоген та ідентифікують в РЗК. Диференціацію різних видів хламідій проводять за спеціальними тестами (табл. 66).

Бактеріологічний метод діагностики трахоми досить трудомісткий, дорогий і вимагає підготовки кваліфікованих спеціалістів. Він можливий лише в спеціалізованих лабораторіях.

Більші можливості дає застосування імуноферментного аналізу. За його допомогою виявляють ліпополісахаридні антигени хламідій, які взаємодіють із специфічними моноклональними антитілами. Чутливість методу – 90 %.

Ще більшу ефективність при діагностиці трахоми, як і інших хламідіозів, дає використання полімеразної ланцюгової реакції. Цей метод дає позитивні результати в 90-100 % випадків, в той час як культуральні дослідження – в 60-80 %, а пряма імунофлуоресценція – в 55-75 %.

Диференціальні ознаки патогенних хламідій

<i>C. trachomatis</i>	<i>C. psittaci</i>	<i>C. pneumoniae</i>
<ol style="list-style-type: none"> 1. Елементарні тільця мають сферичну форму 2. Включення хламідій в клітині компактні, вони синтезують глікоген, який виявляють йодною пробою 3. Сульфадіазин пригнічує розмноження хламідій в курячому ембріоні 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Елементарні тільця мають сферичну форму 2. Мікроколонії в клітині менш компактні, хламідії розташовуються по всій цитоплазмі, глікоген відсутній 3. Сульфадіазин не пригнічує хламідій у курячому ембріоні 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Форма елементарних тілець грушоподібна 2. Мікроколонії в клітині менш компактні, хламідії часто розташовуються по всій цитоплазмі, не синтезується глікоген 3. У курячому ембріоні ростуть погано, не чутливі до сульфадіазину

Серологічна діагностика. Імуноферментний аналіз є високоспецифічним і доступним методом серологічної діагностики трахоми. При наявності специфічних хламідійних антигенів, адсорбованих на поверхні лунок полістиролових планшет, ІФА можна використовувати в будь-якій мікробіологічній лабораторії.

Реакція непрямой гемаглютинації також має високу чутливість. Вона проста за технікою постановки, але еритроцитарний хламідійний діагностикум може реагувати і з антитілами проти рикетсій Провачека. При тяжкій і середньої тяжкості формах захворювання РНГА випадає у високих титрах.

Реакція зв'язування комплекменту практично майже не використовується, оскільки часто дає псевдопозитивні результати.

Орнітоз

Орнітоз (пситакоз) – гостра інфекційна хвороба птахів, тварин і людей, що спричиняється *Chlamydia psittaci*, характеризується розвитком пневмонії, грипо- або тифоподібної гарячки, м'язового болю, рідше короподібного висипу. Зараження людини відбувається при вдиханні висушеного посліду, пуху від птахів, а також при розробці туш.

Мікробіологічна діагностика зводиться до виділення збудника з крові або харкотиння (1-й тиждень хвороби), виявлення наростання титру антитіл (2-4-й тиждень), постановки алергічної проби.

Бактеріологічне дослідження. Для виявлення хламідій у хворого беруть 8-10 мл крові в перші 2 тижні захворювання. З харкотиння збудника можна виділити до 25-го дня. Нативною кров'ю без попередньої її обробки заражають курячі ембріони в хоріоналантаїсну оболонку, порожнину алантаїсу або жовтковий мішок. Харкотиння перед введенням в ембріон обробляють антибіотиками. Заражені ембріони інкубують у термостаті при 35-36 °С протягом 3-4-х діб. У мазках-відбитках з алантаїсної оболонки або в алантаїсній рідині виявляють елементарні тільця після забарвлення акридином оранжевим або за Романовським-Гімзою. При мікро-

скопуванні у цитоплазмі клітин видно спеціальні включення, які мають яскраво-зелене світіння. Азур-еозин забарвлює молоді хламідії у червоно-фіолетовий колір, а зрілі форми – у синьо-фіолетовий.

Досліджуваним матеріалом заражують також культури епітеліальних клітин первинних або перещеплених ліній різного походження: L-929, Hela, HEp-2, курячі фібробласти. Після культивування протягом 48 год у цитоплазмі клітин виявляють специфічні включення за вище описаними способами. Найкращим із них є метод ідентифікації за допомогою прямої імуофлуоресценції.

Біологічне дослідження. Для виявлення хламідій орнітозу використовують біологічний метод – досліджуваним матеріалом заражають інтрацеребрально, інтраназально або в черевну порожнину білих мишей-сисунків. Через 3-5 днів вони гинуть від пневмонії. При мікроскопічному дослідженні мазків-відбитків виявляють мікроколонії хламідій в цитоплазмі моноклеарних клітин.

Серологічне дослідження. Основним методом серологічної діагностики хвороби є постановка реакції зв'язування комплементу, гальмування гемаглютинації та ІФА зі стандартним орнітозним діагностиком. Комплемент зв'язуючі та й інші антитіла з'являються в крові хворих через 5-8 днів у невеликій кількості, потім їх титр наростає. Тому серологічні реакції краще ставити методом парних сироваток. Діагноз підтверджується при наростанні титру антитіл у 4 рази і більше. Хороші результати дає також реакція непрямой імуофлуоресценції.

Алергічна проба з орнітином (інактивована алантоїсна культура *C. psittaci*) ставиться як для ранньої (2-9-й день хвороби), так і ретроспективної діагностики. Облік реакції проводять через 24-48 год. Гіперемію та інфільтрат діаметром до 1 см розцінюють як слабопозитивну реакцію, до 2 см – позитивну, більше 2 см – різко позитивну. Висока специфічність алергічної проби залежить від ступеня специфічності алергену, оскільки можуть бути перехресні реакції за рахунок групових хламідійних антигенів.

Респіраторний хламідіоз

Хламідійна пневмонія – інфекційна хвороба, яка характеризується запаленням легень, катаром верхніх дихальних шляхів, загальною інтоксикацією. Збудник – *Chlamydia pneumoniae*. Від інших хламідій вона відрізняється грушоподібною формою елементарних тілець. Джерело інфекції – хворі люди. Збудник виділяється з носоглотки, механізм зараження – повітряно-крапельний.

У зв'язку з тим, що *C. pneumoniae* погано розмножується в курячих ембріонах і культурах клітин, методи бактеріологічної діагностики не використовуються. Практичні лабораторії не мають реагентів і для серологічної діагностики респіраторного хламідіозу. Для виявлення та ідентифікації хламідій пневмонії в досліджуваному матеріалі використовують лише реакцію імуофлуоресценції із застосуванням моноклональних антитіл до високоспецифічного антигена збудника.

Сечостатевий хламідіоз

Патогенні хламідії, особливо *C. trachomatis*, досить часто викликають гострі або хронічні запалення уретри, вагіни, шийки матки. Урогенітальний хламідіоз впродовж останнього десятиріччя зустрічається частіше, ніж сифіліс і гонорея. Основний шлях передачі захворювань – статевий, значно рідше – побутовий.

Матеріалом для лабораторного дослідження служать зскрібки зі слизової уретри у чоловіків і жінок та зскрібки із шийки матки у жінок. Український НДІ дерматології та венерології розробив уніфіковані методи діагностики сечостатевих хламідіозів. Серед них важливе значення мають експрес-методи, виявлення морфологічних структур та антигенів хламідій у досліджуваному матеріалі, виділення хламідій в культурах клітин, виявлення хламідійних антитіл за допомогою серологічних реакцій та полімеразна ланцюгова реакція.

Експрес-методи. Ряд фірм США та Франції розробили спеціальні діагностичні тести для проведення імунохроматографічних експрес-методів, які можуть видати результат через 10-30 хв. Однак їх чутливість і специфічність значно менша, ніж при проведенні повномасштабних досліджень.

Мікроскопічні методи. Досліджуваний матеріал беруть у хворих, які протягом місяця не повинні приймати антибіотики. Зскрібки роблять одноразовим зондом (щіточкою, ложечкою Фолькмана, жолобкуватим зондом). Інфекційний матеріал наносять на поверхню 8 мм ямки спеціального предметного скла. Мазок висушують 20-30 хв і фіксують у холодному ацетоні протягом 5-10 хв, забарвлюють за методом Романовського-Гімзи 35-40 хв, обробляють підкисленим етанолом (3-5 крапель льодяної оцтової кислоти на 15-20 мл спирту) протягом 5-10 с, промивають водою, висушують і мікроскопують. Ретикулярні тільця забарвлюються в синьо-фіолетовий колір, а елементарні тільця – в рожево-червоний. Зернисті структури хламідій розміщуються поблизу ядра. Виявлення 5-10 типових включень має діагностичне значення.

Антигени хламідій в інфекційному матеріалі виявляють за допомогою прямої і непрямой реакції імунофлуоресценції. Суть прямого методу полягає у з'єднанні мічених флуорохромом антитіл із хламідійним антигеном і виявленні специфічного світіння при люмінесцентній мікроскопії. Люмінесцентна антихламідійна сироватка виготовляється в Харкові. Є багато закордонних діагностичних систем для проведення цього методу.

Суть непрямой методу полягає у з'єднанні комплексу антиген + немічені хламідійні антитіла з видовою (антиглобуліновою) міченою флуоресцеїном сироваткою.

Окрім мікроскопічних методів, антигени хламідій в інфекційному матеріалі можна виявити за допомогою імуноферментного аналізу. Принцип методу полягає у взаємодії моноклональних хламідійних антитіл, адсорбованих на твердій фазі, з антигеном хламідій, що знаходиться у досліджуваному матеріалі, й утворенні імунних комплексів. Матеріалом для аналізу можуть бути зскрібки зі слизових оболонок, центрифугати сечі, секрети, біоптати тощо.

Вже розроблено й впроваджено в практику багато діагностичних тест-систем для ІФА. Досліджуваний матеріал вносять на адсорбовані в лунках планшети антитіла. Оцінка результатів проводиться за допомогою імуноферментного аналізатора згідно з інструкцією до кожної тест-системи. Чутливість ІФА для виявлення хламідій коливається в межах 50-70 % у чоловіків і 88-100 % у жінок.

Виділення хламідій в культурах клітин. Найбільш точним і доказовим методом діагностики хламідіозу є виділення збудника на культурі клітин (золотий стандарт). Найчастіше використовують культури клітин L-929, McCoy, Hela, ВНК-21. У стерильні плоскодонні пробірки діаметром 14 мм вносять на дно покрівні скельця, додають по 1 мл клітинної суспензії в живильному середовищі ($1 \cdot 10^5$ клітин/мл) і ставлять на 24-48 год у термостат при 37 °С для утворення моношару клітин на покрівних скельцях. Потім середовище виливають, вносять інфекційний матеріал, оброблений антибіотиками, центрифугований протягом години при 3000 об/хв, інкубують у термостаті 2 год при 37 °С. Досліджуваний матеріал виливають, замінюють його свіжим живильним середовищем, інкубують у термостаті 48-72 год. Покрівні скельця з моношаром клітин виймають, фіксують 10 хв метанолом, промивають фосфатним буфером і забарвлюють за методом Романовського-Гімзи. Покрівні скельця монтують на предметному склі моношаром клітин донизу в канадському бальзамі.

Під імерсійним об'єктивом виявляють наявність цитоплазматичних включень. Елементарні тільця хламідій забарвлюються у червоний, а ретикулярні тільця – у синій колір.

При обробці препаратів флуоресцентними антитілами моношар клітин також монтують на предметному склі в гліцерині й досліджують за допомогою люмінесцентного мікроскопа. Метод високоспецифічний (100 %) і чутливий (75 %), але досить складний, дорогий, результат отримують через 72-96 год. Окрім того, є великий ризик зараження персоналу. Для практичних лабораторій він ще малодоступний.

Імунологічна діагностика. У сучасній практиці серологічних досліджень сечостатевих хламідіозів використовують 4 імунологічні реакції: непрямой імунофлуоресценції, непрямой гемаглютинації, зв'язування комплементу та метод імуноферментного аналізу. Матеріалом для дослідження в усіх 4-ох реакціях є сироватка крові хворих, секрет статевого залоз.

З метою виявлення хламідійних антитіл у реакції непрямой імунофлуоресценції застосовують специфічний хламідійний антиген, який забезпечує реакції з антитілами до всіх варіантів *C. trachomatis*.

При постановці цієї реакції на предметному склі готують слайд-антигени. Скло вміщують на трафарет із зазначенням зон нанесення антигенів (контрольного і специфічного). Слайди висушують 15-20 хв і фіксують в охолоджену ацетоні. Потім на слайд-антигени наносять відповідні розведення сироватки, інкубують 40 хв при 37 °С у вологій камері. Після цього препарат тричі промивають фосфатним буферним розчином, додають антивидову люміную сироватку, ще раз витримують 40 хв у вологій камері й знову тричі промивають. Висушені слайди досліджують під люмінесцентним мікроскопом. Техніку постановки ре-

акції виконують згідно з інструкцією, що додається до кожної діагностичної тест-системи.

Оцінку результатів проводять за ступенем специфічної флуоресценції комплексів елементарних і ретикулярних тілець з антитілами, використовуючи класичну чотириплюсову систему. Титром хламідійних антитіл сироватки хворого вважають те найбільше її розведення, при якому спостерігається чітке яскраво-зелене світіння не менше, ніж на 2+. При хламідійному ураженні сечостатевої системи він дорівнює 1:64 і вище. Постановка РІФ методом парних сироваток повинна виявити наростання титру антитіл у 4 рази від початкового рівня.

Реакцію непрямой гемаглютинації використовують, в основному, для діагностики зоонозних хламідіозів і первинного серологічного скринінгу захворювань у людей.

Реакція зв'язування комплементу дає змогу виявити антитіла до родоспецифічного антигену хламідій. Ставлять її за звичайною схемою. Діагноз вважають позитивним при титрі комплементзв'язуючих антитіл 1:64 і вище. РЗК мало підходить для діагностики хламідійних інфекцій генітальної системи.

Виявлення хламідійних антитіл імуноферментним методом базується на взаємодії антигену з хламідій на поверхні лунок полістирилових планшет з IgM і IgG у сироватках хворих людей. Уже виготовлена велика кількість діагностичних наборів.

Спочатку сироватку хворого розводять у допоміжному ряді пробірок, потім проводять сорбцію антитіл у лунках мікротитрувального планшета. Детальна методика постановки ІФА викладена в інструкції, що додається до діагностичної тест-системи. ІФА рекомендують ставити за допомогою парних сироваток. Оцінку результатів здійснюють за допомогою імуноферментного аналізатора за величиною оптичної щільності розчинів у лунках полістирилового планшета.

Мікоплазми

Мікоплазми – інфекційні захворювання людини, які викликають різні види мікоплазм, представники родів *Mycoplasma* і *Ureaplasma* з родини *Mycoplasmataceae*. Розрізняють респіраторний мікоплазмоз (пневмонія, фарингіт, трахеобронхіт, бронхіт), уrogenітальний мікоплазмоз (уретрит, цистит, простатит, пієлонефрит; у жінок – вагініт, кольпіт, цервіцит, ендометрит) і ураження суглобів (артрит). Більшість мікоплазмозів мають глобальне розповсюдження й переважно хронічний перебіг. У окремих випадках мікоплазми причетні до виникнення ендокардитів, патології вагітності й ураження плода.

Респіраторний мікоплазмоз найчастіше викликає *Mycoplasma pneumoniae*, значно рідше *M. hominis*. Матеріалом для виділення збудника служить харкотиння, слиз із носоглотки, плевральний ексудат, біоптати легеневої тканини, лаваж (змиви з поверхні бронхіол і альвеол, отримані при бронхоскопії); для серологічної діагностики беруть кров.

Досліджуваний матеріал можна зберігати при температурі 4 °С у середовищі нагромадження (триптиказний соєвий бульйон з бичачою сироваткою). Посіви роблять на щільні середовища (наприклад, серцево-мозковий агар), що містять

всі компоненти, необхідні для росту мікоплазм, та на двофазне середовище (короткий стовпчик селективного агару з налитим поверх нього сироватко-глюкозним бульйоном). Виділити збудника найчастіше вдається саме на двофазному середовищі. Для пригнічення росту супутньої мікрофлори до середовищ попередньо додають пеніцилін і ацетат талію, до яких мікоплазми пневмонії стійкі.

Ознаки росту (ферментація глюкози і зміна кольору рідкої частини двофазного середовища та ріст дуже дрібних колоній на щільному агарі) pojawiaються у строки від одного до семи тижнів. Колонії мікоплазм діаметром 0,1-0,2 мм мають щільний зернистий центр, який вростає в агар, та розпливчасту прозору периферичну зону (у вигляді “випускної яєшні”) (див. вкл., рис. 26).

Довготривалість росту мікоплазм на щільних середовищах обумовила розробку швидкого методу їх ідентифікації на чашках без додаткових пересівів для виділення чистих культур. Найпоширенішим методом ідентифікації колоній є тест епіфлуоресценції. Він полягає в тому, що на поверхню колоній наносять люмінуючі мікоплазменні антитіла й виявляють специфічне їх світіння при мікроскопії в ультрафіолетових променях.

Розроблено також метод вирощування мікоплазм пневмонії в органічній культурі трахеї курчат, який дає позитивні результати вже через 3-5 днів.

Остаточну ідентифікацію культур проводять на основі морфологічних, культуральних властивостей та деяких інших ознак (табл. 67).

Таблиця 67

Диференціальні ознаки патогенних для людини мікоплазм

Вид	Виділення ферментів			Ферментація		Відношення до еритроміцину
	уреази	аргінази	фосфатази	глюкози	манози	
<i>M. pneumoniae</i>	-	-	-	+	+	чутливі
<i>M. hominis</i>	-	+	-	-	-	стійкі
<i>M. arthritidis</i>	-	+	+	-	-	?
<i>M. fermentans</i>	-	+	-	+	-	стійкі
<i>U. urealyticum</i>	+	-	+	-	-	чутливі

Значно швидше можна виявити мікоплазми пневмонії або їх антигени в досліджуваному матеріалі за допомогою реакцій імуофлуоресценції, непрямой гемаглютинації, агрегат-аглютинації та ІФА. Однак, широке їх використання обмежене відсутністю або недостатньою кількістю відповідних діагностичних тест-систем.

Дуже ефективним методом діагностики респіраторного мікоплазмозу є метод гібридизації ДНК за допомогою спеціальних зондів, які є природними плазмідами мікоплазм або штучно синтезованими олігонуклеотидами.

Одним із перспективних і найчутливіших методів діагностики мікоплазмозів є полімеразна ланцюгова реакція. Для виявлення *M. pneumoniae* розроблена і впроваджена тест-система, яка дозволяє виявити поодинокі мікоплазми, які іншими способами виділити неможливо.

У практичних лабораторіях діагностику респіраторного мікоплазмозу найчастіше проводять на основі результатів серологічних досліджень. Найбільш широ-

ко використовують реакції зв'язування комплементу, непрямой гемаглютинації, непрямой імуофлуоресценції та метод ІФА з використанням гліколіпідних антигенів *M. pneumoniae* зарубіжних фірм.

Серед усіх серологічних методів найбільш стандартизована постановка РЗК. Високі титри комплементзв'язуючих антитіл виявляють впродовж 3-7-го тижнів після видужування. Підвищення титру антитіл за допомогою РНГА виявляють раніше, ніж в РЗК. Ще чутливішим методом є діагностика за допомогою імуоферментного аналізу з використанням стандартного антигену, адсорбованого в лунках мікротитраційних полістирилових планшет. Діагностичним титром сироватки вважають 1:64.

Мікоплазменний артрит найчастіше викликає *M. arthritis*, рідше *M. fermentans*, *M. pneumoniae*, і *U. urealyticum*. Джерелом збудників, що уражають суглоби, є хворі люди або безсимптомні носії мікоплазм. Матеріалом для лабораторних досліджень є синовіальна рідина, кров, тканини суглобових хрящів.

Мікробіологічна діагностика зводиться до посіву досліджуваних матеріалів на щільні і двофазові середовища, виділення та ідентифікації чистих культур (табл. 67). Збудники або антигени можна виявити в клінічному матеріалі за допомогою тих же методів, що використовуються для діагностики респіраторних мікоплазмозів.

При проведенні серологічних досліджень найчастіше вживають реакції зв'язування комплементу, агрегат-аглютинації та імуоферментний аналіз.

Уреаплазми – гострі або хронічні запальні процеси сечостатевого органу, викликані *Ureaplasma urealyticum*. Ці захворювання значно рідше може спричинити і *M. hominis*. Під час вагітності уреоплазменна інфекція активізується й може стати причиною передчасних пологів та спонтанних абортів, а при внутрішньоутробному зараженні може викликати загибель плода. У зв'язку з неможливістю відрізнити за клінічною картиною уреоплазмоз від торпідної чи хронічної гонореї особливого значення набуває етіологічна діагностика, тобто виділення збудника.

Лабораторні дослідження мають вирішальне значення в розпізнаванні уrogenітальних запальних процесів, тим більше, що серед людей досить часто зустрічається безсимптомне носійство мікоплазм і уреоплазм. Найчастіше використовують бактеріологічний та серологічний методи діагностики, а також мікроскопічне виявлення уреоплазм у препаратах сперми. Переваги надають культуральним методам.

Дуже важливо правильно взяти досліджуваний матеріал. У чоловіків його беруть з уретри не раніше як за 4-6 год до сечовипускання. Зовнішній отвір уретри ретельно очищають ватним тампоном, змоченим стерильною дистильованою водою. Перші краплини вільно витікаючих виділень при надавленні на уретру відкидають, а наступні використовують для посівів на рідкі та щільні середовища. При відсутності або незначних виділеннях проводять масаж уретри, а потім роблять зскрібок зі слизової оболонки ложечкою Фолькмана чи жолобкуватим зондом на глибині 2-3 см. Для посіву можна також використовувати секрет простати, сперму, осад із 10 мл першої ранкової порції сечі після її центрифугування.

У жінок матеріал для посіву беруть із уретри, каналу шийки матки і заднього склепіння вагіни перед чи відразу після менструацій.

Для культивування уреаз плазм використовують стандартні рідкі й щільні середовища, що виробляють в Українському НДІ дерматології та венерології (м. Харків). Посіви проводять відповідно до інструкції, що додаються до середовищ.

Пробірки і чашки з посівами вміщують у термостат не пізніше 30-60 хв після взяття і посіву клінічного матеріалу. Облік результатів посівів у рідке середовище проводять через 24-48 год. Посіви на щільне середовище інкубують при 37 °С в атмосфері підвищеного вмісту CO₂ протягом 5 діб, проводячи щоденний контроль за ростом колоній.

При посіві в рідке середовище уреаз плазми змінюють його колір від початкового жовтого до рожевого при відсутності каламуті. Сумнівним вважають результат при зміні кольору середовища та наявності каламуті. Якщо колір середовища не змінився, результат оцінюють як негативний. На щільному середовищі уреаз плазми утворюють характерні дуже дрібні колонії (0,1-0,2 мм) округлої форми із зубчастим краєм і зморщеною поверхнею. Їх досліджують під мікроскопом при малому збільшенні з використанням об'єктива 40х.

Ідентифікацію виділених культур проводять на основі їх морфології, характеру росту та інших ознак. Від інших видів мікоплазм *U. urealyticum* відрізняється здатністю гідролізувати сечовину, оскільки вона єдина продукує уреазу. Отже, метод визначення уреазної активності є основним при діагностиці уреаз плазмозу.

Мікроскопічне визначення уреаз плазм у препаратах сперми базується на виявленні ДНК збудника при забарвленні флуорохромом олівоміцином. Для цього використовують тест-систему, що виробляється в Українському НДІ дерматології та венерології.

Краплю сперми наносять на предметне скло, розподіляють її до розмірів покривного скельця, висушують і фіксують протягом 3 хв у холодному 70° спирті. На мазок наносять робочий розчин олівоміцину на 30 хв, промивають дистильованою водою, додають краплю забуференого гліцерину і накривають покривним скельцем. При мікроскопії під люмінесцентним мікроскопом уреаз плазми мають вигляд яскраво-зеленої зернистості на темному фоні препарату. Інші види бактерій також яскраво світяться, але вони легко відрізняються від уреаз плазм за розмірами і формою. Інтенсивність зараження сперми уреаз плазмами оцінюють за чотириплюсовою системою: 4+ – максимальна кількість уреаз плазм у вигляді скупчень на більшості сперматозоїдів; 3+ – окремі уреаз плазми і їх скупчення у двох-трьох полях зору; 2+ – невеликі скупчення уреаз плазм на окремих сперматозоїдах; 1+ – поодинокі уреаз плазми в препараті.

Для серологічної діагностики можна використати постановку реакцій зв'язування комплементу, непрямой імуофлуоресценції, непрямой гемаглютинації, агрегат-аглютинації та метод імуоферментного аналізу. Однак реактиви для цих реакцій поки що мало доступні для практичних лабораторій і є лише у профільних науково-дослідних центрах.

Частина IV

ВІРУСОЛОГІЯ

Розділ 12

БУДОВА І КЛАСИФІКАЦІЯ ВІРУСІВ

Відомо тисячі видів різноманітних вірусів людини, тварин, комах, рослин, бактерій. Вони відіграють надзвичайно велику роль у природі: виступають як фактор, що об'єднує складні живі системи органічного світу, служать переносниками генетичної інформації. Саме за допомогою вірусів зроблені фундаментальні відкриття з розшифрування структури нуклеїнових кислот, механізмів реплікації ДНК та синтезу білка. Фундаментальне вивчення вірусів та бактеріофагів увінчалось грандіозними успіхами генної інженерії. Отже, вони дають ключ до розуміння функціонування нуклеїнових кислот і сутності життя.

Понад 500 вірусів викликають різноманітні захворювання людини. Грип, інфекційні гепатити, жовта гарячка, геморагічні гарячки Ебола та Ласса, сказ, поліомієліт, СНІД.

Віруси – неклітинні форми живих істот, які характеризуються малими розмірами, відсутністю власних білоксинтезуючих та енергієгенеруючих систем, а також облігатним внутрішньоклітинним паразитизмом.

За ступенем небезпеки для людини віруси поділяють на чотири групи. До першої групи належать збудники гарячки Ебола, Ласса, Марбурга, Мачупо, натуральної віспи, до другої входять арбо- і аренавіруси, віруси сказу, гепатитів А і В, ВІЛ. До третьої групи належать віруси грипу, поліомієліту, енцефаломіокардиту, вісповакцини. Четверта група представлена адено-, корона-, герпес-, рео- та онковірусами. Цей поділ певною мірою умовний, так як внаслідок генетичної мінливості можуть з'являтися штами вірусів з підвищеною вірулентністю.

Структура вірусів. Окрема вірусна частинка одержала назву **віріон**. Він складається з однієї молекули нуклеїнової кислоти (ДНК або РНК) та білкового футляра, що її оточує, – **капсида**. Разом вони формують **нуклеокапсид**. Капсиди утворені з білкових субодиниць (поліпептидів), які називаються **капсомерами**. Їх кількість стабільна для кожного виду вірусів і використовується як таксономічна ознака. Віруси з таким типом будови називають простими. До них належать найдрібніші з патогенних вірусів людини: поліовіруси, аденовіруси, паповавіруси.

Проте більшість вірусів має ще одну оболонку – **суперкапсидну**, яка містить ліпіди. Вона пронизана вірусспецифічними білками-глікопротеїдами, які на поверхні оболонки утворюють особливі структури, що називаються шипами. Такі віруси називають складними або оболонковими. Структурною одиницею суперкап-

сидної оболонки є **пепломер**. До них належать віруси сказу, герпесу, грипу, енцефалітів, імунодефіциту людини та ін.

Віріони характеризуються поняттям **симетрії**. Тип симетрії залежить від способу укладки нуклеїнової кислоти і, відповідно, розташування капсомерів навколо неї. Виділяють **ізометричний** (або кубічний), **спіральний** та **змішаний** типи симетрії. Кубічний тип характеризується тим, що капсомери утворюють багатогранник (найчастіше ікосаедр – 20-гранник). Усі відомі ДНК-геномні віруси мають складні капсиди (аденовіруси, герпесвіруси, парвовіруси), а також деякі віруси, що містять РНК – пікорнавіруси, тогавіруси.

У віріоні зі спіральною симетрією молекула нуклеїнової кислоти закручена разом із капсомерами в тугу спіраль. Такий тип симетрії мають віруси мозаїчної хвороби тютюну, грипу, кору, епідемічного паротиту та ін.

Комбінований тип симетрії спостерігається у деяких бактеріофагів. При цьому головка бактеріофага має кубічний тип симетрії, а нуклеопротеїд, розміщений у хвості, укладається спірально.

Форма вірусів може бути найрізноманітнішою: паличкоподібна (віруси мозаїчної хвороби тютюну), кулеподібна (віруси сказу), сферична (віруси грипу, папіломи), кубоїдальна (віруси натуральної віспи), головчаста або сперматозоїдна (бактеріофаги), ниткоподібна (віруси Ебола, віруси бактерій). На рис 85 і 86 представлені основні форми і структури найпоширеніших РНК- і ДНК-геномних вірусів.

Класифікація вірусів. В основі сучасної класифікації вірусів лежать ознаки, що характеризують тип нуклеїнової кислоти, їх морфологію, особливості репродукції, антигенні властивості тощо. За наявності нуклеїнової кислоти їх поділяють на ДНК-геномні та РНК-геномні віруси. Із 71 відомої родини вірусів 20 родин містять віруси, патогенні для людини (табл. 68).

Хімічний склад вірусів. Віруси містять лише один тип нуклеїнової кислоти (ДНК або РНК), яка становить від 1 до 40 % маси віріона. Вірусні геноми містять інформацію, достатню для синтезу лише декількох білків. Їх маса сягає 10^{-15} мг, що в 1 млн разів менше, ніж у клітини, а довжина – до 0,093 мм. Число нуклеотидних пар коливається від 3150 (вірус гепатиту В) до 230000 (вірус натуральної віспи). Віруси характеризуються надзвичайним розмаїттям форм геному. Він може бути представлений як односпіральними, так і двоспіральними молекулами, бути лінійним, циркулярним або фрагментованим.

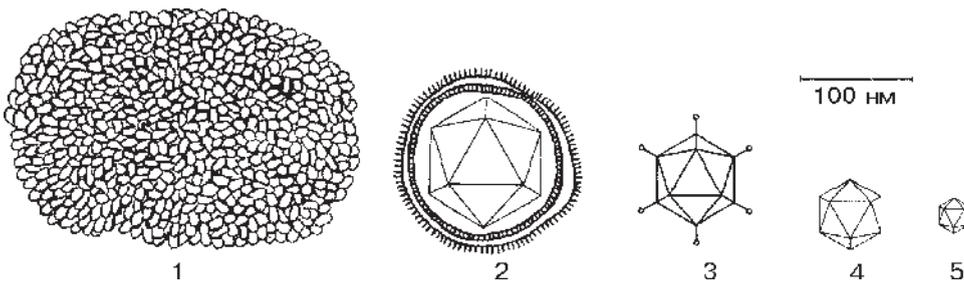


Рис. 85. Форма, розміри і структура деяких ДНК-геномних вірусів:

1 – Poxviridae; 2 – Herpesviridae; 3 – Adenoviridae; 4 – Papovaviridae; 5 – Parvoviridae.

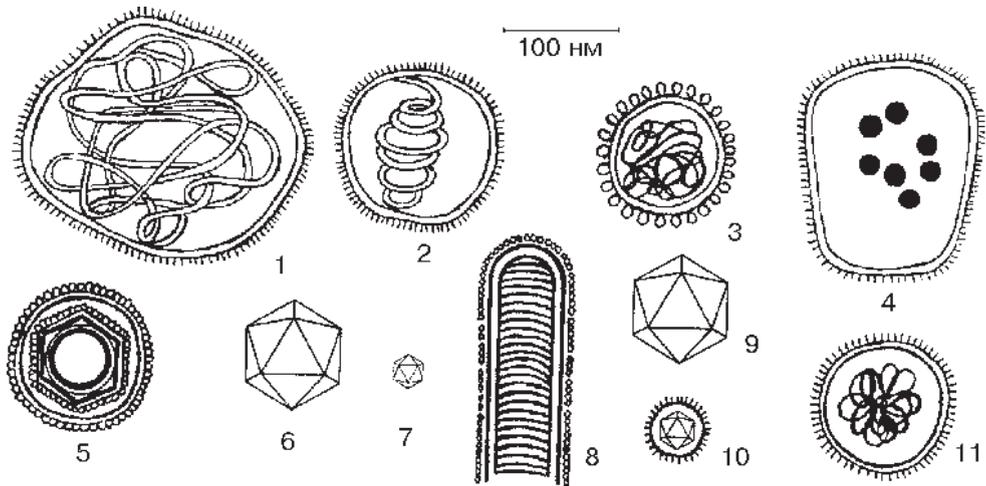


Рис. 86. Форма, розміри і структура деяких РНК-геномних вірусів:

- 1 – *Paramyxoviridae*; 2 – *Orthomyxoviridae*; 3 – *Coronaviridae*; 4 – *Arenaviridae*; 5 – *Retroviridae*;
6 – *Reoviridae*; 7 – *Picornaviridae*; 8 – *Rhabdoviridae*; 9 – *Orbiviridae*; 10 – *Togaviridae*;
11 – *Bunyaviridae*.

Білки вірусів (70-90 % маси віріона) поділяються на **структурні** та **неструктурні**. Структурними називають такі білки, які входять до складу зрілих позаклітинних віріонів. Вони виконують ряд важливих функцій: захищають нуклеїнову кислоту від зовнішнього пошкодження, взаємодіють з мембранами чутливих клітин, і забезпечують проникнення вірусу в клітину, мають РНК- і ДНК-полімеразну активність та ін. Неструктурні білки не входять до складу зрілих віріонів, однак утворюються під час їх репродукції. Вони забезпечують регуляцію експресії вірусного геному, є попередниками вірусних білків, здатні пригнічувати клітинний біосинтез. Залежно від розташування у віріоні, білки поділяються на капсидні, суперкапсидні, матриксні, білки серцевини та асоційовані з нуклеїною кислотою.

Ліпіди містяться в складних вірусах і входять до складу суперкапсидної оболонки, утворюючи її подвійний ліпідний шар. Вони стабілізують вірусну оболонку, забезпечують захист внутрішніх шарів віріонів від гідрофільних речовин зовнішнього середовища. Віруси мають до 15-35 % ліпідів. Ліпопротеїди – комплекс вірусних суперкапсидних білків та ліпідів клітинної мембрани яких віруси набувають при виділенні з клітини під час репродукції.

Молекули вуглеводів входять до складу глікопротеїнів, гліколіпідів, сягаючи 3,5-9 %. Вони відіграють важливу роль, забезпечуючи захист відповідних молекул від дії клітинних протеаз.

Різні групи вірусів мають неоднакову стійкість до дії факторів зовнішнього середовища. Найчутливіші до них віруси, що мають ліпопротеїнову оболонку. Наприклад, віруси грипу, парагрипу, епідемічного паротиту інактивуються на поверхнях за декілька годин, проте аденовіруси зберігають інфекційні властивості декілька днів. Чутливість вірусів до дії рентгенівського та ультрафіолетового оп-

Таблиця 68

Класифікація вірусів

Родина, рід	Наявність суперкапсиду	Тип симетрії	Розміри (нм)	Структура РНК	Віруси, патогенні для людини
1	2	3	4	5	6
РНК-геномні віруси					
Picornaviridae	Ні	Кубічний	28	Однониткова, лінійна, несегментована, “плюс”	Поліовіруси, Коксаки-, ЕСНО-, риновіруси, віруси ящура, віруси гепатиту А
Caliciviridae	Ні	Кубічний	38	Однониткова, лінійна, несегментована, “плюс”	Вірус Норволк, вірус гепатиту Е
Astroviridae	Ні	Кубічний	28-30	Однониткова, лінійна, несегментована, “плюс”	Астровіруси людини
Togaviridae	Так	Кубічний	60	Однониткова, лінійна, несегментована, “плюс”	Віруси Синдбіс, Чикунгунья, віруси східного американського, західного американського і везикулярного енцефаломієлітів коней, віруси краснухи
Flaviviridae	Так	Кубічний	45-60	Однониткова, лінійна, несегментована, “плюс”	Віруси кліщового та японського енцефалітів, жовтої гарячки, гарячки Західного Нілу, гепатиту С
Coronaviridae	Так	Спіральний	80-220	Однониткова, лінійна, несегментована, “плюс”	Коронавіруси
Paramyxoviridae	Так	Спіральний	120-150	Однониткова, лінійна, несегментована, “мінус”	Віруси паратрипу, кору, паротиту, респіраторно-синциціальний вірус
Rhabdoviridae	Так	Спіральний	75-180	Однониткова, лінійна, несегментована, “мінус”	Вірус сказу, везикулярного стоматиту

Продовження табл. 68

1	2	3	4	5	6
Filoviridae	Так	Спіральний	80-14000	Однониткова, лінійна, несегментована, "мінус"	Віруси Ебола і Марбург
Orthomyxoviridae	Так	Спіральний	80-120	Однониткова, лінійна, 8 сегментів, "мінус"	Віруси грипу
Bunyaviridae	Так	Спіральний	80-120	Однониткова, циркулярна, 3 сегменти, "мінус"	Хантавіруси, вірус Кримської-Конго гарячки, вірус каліфорнійського енцефаліту
Arenaviridae	Так	Спіральний	110-130	Однониткова, циркулярна, 2 сегменти, "мінус"	Вірус лімфоцитарного хориомеїнігїту, віруси гарячки Ласса, Мочупо
Reoviridae	Ні	Кубічний	70-80	Двониткова, 10-11 сегментів	Реовіруси, орбівіруси, ротавіруси
Retroviridae	Так	Кубічний	80-100	Однониткова, лінійна, несегментована, "плюс"	ВІЛ, вірус Т-клітинної лейкемії людини
Некласифіковані РНК-геномні віруси					
Bornaviridae	Так	Кубічний	До 100	Однониткова, лінійна, несегментована, "мінус"	Віруси хвороби Борна
Deltavirus	Так	Невідомо	37	Однониткова, циркулярна, кільце, "мінус"	Вірус гепатиту Дельта
ДНК-геномні віруси					
Hepadnaviridae	Так	Кубічний	40-48	Частково двониткова, циркулярна	Вірус гепатиту В
Parvoviridae	Ні	Кубічний	18-26	Однониткова, лінійна	Віруси ревматоїдного артрити, інфекційної еритеми, гемолітичної анемії
Papovaviridae	Ні	Кубічний	45-55	Двониткова, циркулярна	Віруси папіломи, поліоми
Adenoviridae	Ні	Кубічний	85-110	Двониткова, лінійна	Аденовіруси

Продовження табл. 68

1	2	3	4	5	6
Herpesviridae	Так	Кубічний	150-200	Двониткова, лінійна	Віруси простого і оперізуючого герпесу, ітомегаловірус, вірус Епштейна-Барр, віруси герпесу 6, 7, 8
Poxviridae	Так	Змішаний	220-450 у довжину 140-260 у товщину 140-260 у висоту	Двониткова, лінійна	Вірус натуральної віспи, вірус вакцини

ромінення залежить від величини геному вірусів: чим менший геном, тим резистентніший вірус до опромінення. Віруси, які мають ліпопротеїдну оболонку, чутливі до ефіру, хлороформу та дезоксихолату натрію, інших жиророзчинників і детергентів.

Важливою особливістю вірусів є їх чутливість до концентрації водневих іонів. Частина з них стійка до кислих значень рН (2,2-3,0). До них належать віруси, які викликають кишкові інфекції, проникаючи в організм аліментарним шляхом (віруси поліомієліту, Коксакі, ЕСНО). Віруси, які потрапляють в організм через верхні дихальні шляхи (риновіруси, віруси грипу та ін.), чутливі до кислих значень рН.

Взаємодія вірусів і клітини. Розрізняють декілька типів взаємодії. При **продуктивній інфекції** вірус функціонує в клітині автономно, а його репродукція відбувається незалежно від репродукції клітинного генетичного апарата. При цьому утворюється нове покоління інфекційних вірусів.

Якщо цикл репродукції вірусів блокується на одній із стадій, а інфекційні віріони не утворюються, такий тип взаємодії позначають як **абортивний**.

Коли з клітиною взаємодіють онкогенні РНК- та ДНК-геномні віруси (СНІДу, лейкозу), нуклеїнова кислота інтегрується в клітинну хромосому та існує там у вигляді **провірусу**. В результаті може спричинятися зміна спадкових властивостей клітини. Такий тип взаємодії називають **вірогенією**.

Отже, віруси є особливими інфекційними агентами, які вимагають своєрідних прийомів для роботи з ними, не подібних до мікробіологічних. Вірусологічні дослідження проводять у спеціально обладнаних вірусологічних лабораторіях.

Методи лабораторної діагностики вірусних інфекцій

Лабораторна діагностика вірусних інфекцій може здійснюватись за двома основними напрямками. Перший – виявлення та ідентифікація вірусів або їх компонентів в організмі хворого (вірусологічна діагностика). Другий напрямок – ви-

явлення специфічних противірусних антитіл у сироватці крові (серологічна діагностика). Оскільки антитіла з'являються не зразу після проникнення вірусів в організм, а потім їх титр протягом деякого часу зростає, діагностичну цінність має визначення приросту титру антитіл. Саме тому всі імунологічні реакції ставляться з парними сироватками, перша з яких береться у хворого на початку захворювання, а друга – через 2-3 тижні. Оскільки застосування цього методу практично підтверджує перенесення захворювання, його ще називають ретроспективною діагностикою. Практично для всіх вірусних інфекцій реакції, які використовуються з цією метою, вважаються позитивними, якщо в досліді виявлено чотирикратний і більше приріст титру антитіл.

Третя група методів – експрес-діагностика вірусних інфекцій. Використання цих чутливих і надійних імунологічних тестів дозволяє значно прискорити лабораторну діагностику захворювань.

Виявлення вірусів. Для виділення вірусів, необхідних для подальшого їх дослідження з метою ідентифікації, дуже важливо провести правильний забір, швидке транспортування матеріалу до лабораторії, раціональний вибір тест-системи (курячі ембріони, культури клітин, лабораторні тварини).

Для вірусологічного дослідження матеріал краще збирати у перші дні захворювання. Від правильного його забору залежить хід подальшого вірусологічного дослідження. Залежно від проявів хвороби досліджуваним матеріалом може бути кров, змиви з носо- і ротоглотки, харкотиння, рідина з пухирців, спинномозкова рідина, сеча, фекалії, шматочки органів і тканин людини, отриманих при дослідженні трупів, матеріал від лабораторних тварин тощо. Одержаний матеріал необхідно зберігати за умов збереження активності вірусів. Тому його слід тримати (заморозити) при температурі -20°C . Для транспортування вірусів можна використати термоси, які заповнюються сухим льодом.

Досліджуваний матеріал, який не контамінується сторонньою флорою (кров, плазма, сироватка, спинномозкова рідина), може бути безпосередньо використаний для зараження тест-систем. Допустимим є розведення його фосфатно-буферним розчином рН 7,6. Якщо досліджуються шматочки тканин, вони спочатку подрібнюються в стерильних умовах до гомогенного стану, потім додається фосфатний буферний розчин, одержана суспензія центрифугується протягом 10 хв при 1500-2000 об/хв. З метою зараження використовують надосадову рідину.

Однак у багатьох випадках досліджуваний матеріал (фекалії, змиви з ротоглотки, носових ходів тощо) може містити бактеріальну флору, яка при подальшому зараженні тест-систем спотворюватиме результати досліджень, включаючи їх загибель. Тому в лабораторіях використовують методи знищення бактерій в доставлених взірцях. Надійним методом є обробка матеріалу антибіотиками пеніциліном і стрептоміцином у концентрації 500-1000 ОД/мл, у разі простих вірусів – ефіром. Допустимим вважається використання спеціальних антибактеріальних фільтрів або центрифугування матеріалу при невисоких швидкостях. У цьому випадку бактерії опускаються з осадом на дно. Супернатант підлягає подальшому ультрацентрифугуванню, і його потім використовують для зараження.

Зараження курячих ембріонів. Курячі ембріони 6-12-денного віку є зручною моделлю для виділення та подальшої ідентифікації вірусів. Після зараження їх інкубують у термостаті при температурі 36-38 °С протягом декількох днів.

Існує два способи зараження курячих ембріонів – відкритий і закритий (рис. 83). Перед проведенням зараження відбирають ембріони, у яких візуально немає пошкодження шкаралупи. Їх просвічують за допомогою овоскопа і відмічають межу повітряного мішка. При відкритому способі шкаралупу над мішком обробляють спиртом і розчином йоду, за допомогою гострих ножиць зрізають шкаралупу, знімають верхній листок оболонки повітряного мішка і проводять зараження. Отвір закривають спеціальною скляною кришкою або шкаралупою і герметизують стерильним розтопленим парафіном.

При закритому способі зараження шкаралупу над повітряним мішком також обробляють розчином йоду і спиртом, потім роблять колючим інструментом отвір у шкаралупі і вводять за допомогою шприца з товстою голкою 0,1-0,2 мл вірусмісткого матеріалу під контролем овоскопа. Отвір заливають стерильним розплавленим парафіном, а ембріони закладають у термостат.

Для виділення вірусів у курячих ембріонах їх можна заражати на хоріоантотісну оболонку, в алантоїсну порожнину, порожнину амніону, жовтковий мішок тощо. При зараженні на хоріоантотісну оболонку після зняття шкаралупи над повітряним мішком обережно відшаровують верхній і нижній листки підшкаралупної оболонки і наносять матеріал на відповідну оболонку.

В алантоїсну порожнину матеріал вводять закритим способом через невеликий отвір у шкаралупі на глибину 10-15 мм у безсудинній ділянці хоріоантотісної оболонки.

При зараженні в амніотичну порожнину використовують ембріони старшого віку. Зараження можна проводити відкритим і закритим способами. При першому після знаходження хоріоантотісної оболонки в ній роблять отвір, захоплюють стерильним пінцетом амніотичну оболонку і вводять матеріал з вірусами. При закритому способі вірусмісткий матеріал вводять на глибину до 20-25 мм за допомогою голки, яку спрямовують до тіла ембріона.

Для зараження в жовтковий мішок використовують 3-8-денні ембріони, тому що в них жовтковий мішок займає значну частину порожнини яйця. Зараження проводять закритим способом.

Заражені ембріони інкубують у термостаті протягом 2-4 діб. Потім їх охолоджують до температури 4 °С протягом однієї доби для максимального звуження судин. Розтинають ембріони в стерильних умовах, попередньо обробивши шкаралупу йодом і спиртом. Матеріал із порожнин ембріона відсмоктують стерильним шпри-

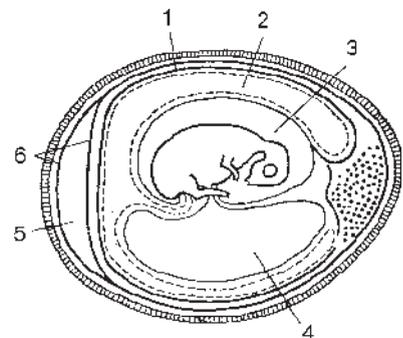


Рис. 83. Курячий ембріон:
1 – хоріоантотісна оболонка;
2 – порожнина алантоїса; 3 – порожнина амніона; 4 – жовтковий мішок; 5 – повітряний мішок; 6 – підшкаралупна оболонка.

цом. У разі потреби досліджують оболонки і сам ембріон, які після виймання поміщають у стерильні чашки Петрі.

Деякі віруси (натуральної віспи, простого герпесу) мають характерну цитопатичну дію, яка проявляється утворенням особливих бляшок на поверхні хоріоналантоїсної оболонки. Вони опуклі, мають дрібні розміри, білуватий колір (рис. 84).

Таким чином, визначити наявність вірусів у матеріалі з курячих ембріонів можна за їх цитопатичною дією. Однак більшість вірусів репродукується в ньому без зовнішніх проявів ураження. Тоді для індикації вірусів застосовують реакцію гемаглютинації. Принцип її полягає в тому, що віруси здатні, адсорбуючись на мембрані еритроцитів, викликати їх аглютинацію. Кількість віріонів в ембріоні визначають за титром гемаглютинації – найбільшим розведенням матеріалу, при якому ще виявляють склеювання еритроцитів. Титрувати віруси можна також при культивуванні їх на шматочках хоріоналантоїсної оболонки. Для цього в стерильні лунки плексигласових пластин вносять шматочки шкаралупи, на якій знаходиться неушкоджена хоріоналантоїсна оболонка. Потім у цих лунках роблять розведення матеріалу, що містить віруси. Їх закривають спеціальними стерильними пластинами з фольги, і культивують віруси протягом двох-трьох діб при температурі 35-37 °С. Пізніше в кожному лунку вносять 0,5 % завись еритроцитів курки і через деякий час за умови наявності вірусів спостерігають випадання осаду еритроцитів у вигляді перевернутої парасольки.

Зараження лабораторних тварин. Численні лабораторні тварини широко використовуються у вірусології для виділення та ідентифікації вірусів, отримання специфічних противірусних сироваток, вивчення різноманітних аспектів патогенезу вірусних захворювань, розробки способів боротьби із захворюваннями та їх профілактики. Найчастіше використовують білих мишей різного віку (навіть одно- і дводенного), білих щурів, гвінейських свинок, кролів, ховрахів, бавовникових щурів, мавп та інших.

Існують різноманітні способи зараження тварин залежно від тропізму вірусів, клінічної картини захворювання тощо. Досліджуваний матеріал можна вводити через рот, у дихальні шляхи (інгаляційно, через ніс), на шкірно, внутрішньошкірно, підшкірно, внутрішньом'язово, внутрішньо-овенно, внутрішньоочеревинно, внутрішньо-серцево, на скарифіковану рогівку, у передню камеру ока, у мозок.

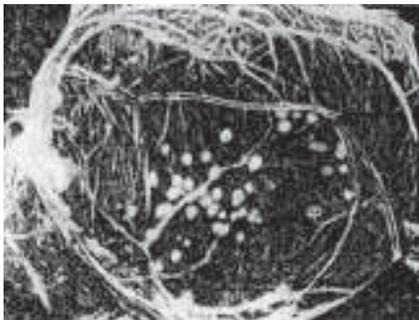


Рис. 84. Утворення бляшок на хоріоналантоїсній оболонці після зараження вірусом вісповакцини.

Для виділення вірусів простого герпесу, натуральної віспи використовують зараження лабораторних тварин (кроликів) на скарифіковану рогівку ока. При дослідженні вірусів гепатиту А вводять досліджуваний матеріал через рот. При виділенні вірусів з нейротропними властивостями, таких як арбовіруси, віруси сказу, Коксаки доцільно заражати білих мишей (1-2-денних сисунців) у мозок. Для цього ма-

Для виділення вірусів простого герпесу, натуральної віспи використовують зараження лабораторних тварин (кроликів) на скарифіковану рогівку ока. При дослідженні вірусів гепатиту А вводять досліджуваний матеріал через рот. При виділенні вірусів з нейротропними властивостями, таких як арбовіруси, віруси сказу, Коксаки доцільно заражати білих мишей (1-2-денних сисунців) у мозок. Для цього ма-

теріал попередньо обробляють антибіотиками для деконтамінації від бактерій. Відбирають групу мишей-сисунців (6 штук) і вводять у мозок до 0,02 мл матеріалу дещо вище орбітального горбика. Тварин, які загинули протягом 24 год після введення матеріалу, бракують, вважаючи, що їх загибель настала внаслідок травматичних ушкоджень. За рештою тварин спостерігають до появи клінічних ознак захворювання (2-4 тижні). Їх забувають, дотримуючись правил роботи з інфікованими тваринами, а органи досліджують на наявність вірусів.

Репродукція вірусів у культурах клітин. Цей метод широко використовують для лабораторної діагностики вірусних інфекцій. Цьому сприяла розробка методів культивування клітин в умовах *in vitro* і створення штучних живильних середовищ для них, відкриття антибіотиків, які використовуються для пригнічення розмноження сторонньої мікрофлори тощо. Тепер у будь-якій вірусологічній лабораторії є спеціальні лінії культур клітин, які високочутливі до більшості вірусів, здатних викликати захворювання у людини. До них належать перещеплювані культури клітин HeLa, HEp-2, Vero, KB, первинно-трипсинізовані культури ембріонів людини, нирок мавп, фібробластів ембріона курки тощо.

Первинно-трипсинізовані культури клітин отримують із будь-яких тканин тварини або людини шляхом їх дезинтеграції ферментативною обробкою. Для цього отримані тканини подрібнюють на невеликі шматочки і доливають до них 0,25 % розчин трипсину. Дезинтеграцію (руйнування зв'язків між клітинами) можна проводити при температурі 37 °С або 4 °С. Після цього суспензію центрифугують, отримані клітини поміщають у спеціальні середовища, а їх кількість визначають при підрахунку в камері Горяєва.

Живильні середовища, які використовуються для підтримання культур клітин або їх росту, бувають природними або синтетичними (штучними). Природні середовища – сироватка крові великої рогатої худоби, рідини із серозних порожнин, продукти гідролізу молока, різноманітні гідролізати (5 % гемогідролізат, 0,5 % гідролізат лактальбуміну) або екстракти тканин. Їх хімічний склад допомагає створити умови, які подібні до тих, що існують в організмі людини. Суттєвим недоліком таких середовищ вважається їх нестандартність, адже якісний і кількісний склад компонентів, які входять до їх складу, може змінюватися.

Синтетичні живильні середовища не мають цього недоліку, адже їх хімічний склад стандартний, тому що їх одержують, комбінуючи різноманітні сольові розчини (вітаміни, амінокислоти) в штучних умовах. До таких найбільш вживаних розчинів належать середовище 199 (культивування первинно-трипсинізованих і перещеплюваних культур клітин), середовище Ігла (містить мінімальний набір амінокислот і вітамінів та використовується для культивування різних ліній клітин), середовище Ігла МЕМ (культивування особливо вимогливих ліній клітин), розчин Хенкса, що використовується для виготовлення живильних середовищ, відмивання клітин тощо.

Для одержання первинно-трипсинізованих культур найчастіше в лабораторіях використовують нирки ембріонів людини (для виділення вірусів кору, аденовірусів), нирки макаки-резус (для виділення поліовірусів, аденовірусів, вірусів кору,

паротиту, гепатиту А), нирки африканської зеленої мавпи (культивування поліовірусів, тогавірусів, флавівірусів), клітин курячих ембріонів (культивування різноманітних арбовірусів), нирки ембріона свині (виділення вірусів грипу, аденовірусів, пікорнавірусів, реовірусів) та інші.

Важливою умовою культивування ліній клітин є дотримання суворих правил асептики. Це робиться для запобігання їх контамінування мікроорганізмами, грибами. Адже попадання бактерій в культури клітини із досліджуваного матеріалу або повітря спричиняє їх загибель. Тоді неможливо оцінити цитопатичний ефект вірусів, оскільки у цьому випадку невідома причина загибелі клітин. Для запобігання цього до живильних середовищ і досліджуваного матеріалу додають розчини антибіотиків з різними механізмами дії: пеніциліну (100 ОД/мл, стрептоміцину (100 мкг/мл), неоміцину, канаміцину, гентаміцину, лінкоміцину, протигрибкових препаратів ністатину (50 ОД/мл), афотерицину В або інших.

Одним з недоліків первинно-трипсінізованих ліній культур клітин є неможливість тривалий час підтримувати їх у лабораторних умовах, адже вони здатні витримувати тільки до 10 пасажів *in vitro*.

Іншою групою культур клітин є *перещеплювані клітини*. Вони представляють собою культури клітин, які набули здатності до необмеженого росту і розмноження. Їх одержують із злоякісних пухлин або з нормальних людських чи тваринних тканин, що мають змінений каріотип. Вони широко використовуються в лабораторній практиці, оскільки здатні швидко та інтенсивно розмножуватись у пробірках і чутливі до багатьох вірусів. Їх отримують із центральних банків тканинних культур.

Ці культури вирощують, як правило, у вигляді одношарових культур, прикріплених до поверхні скла, у спеціальних матрацах, флаконах або пробірках. Найчастіше використовують лінії культур клітин HeLa (карцинома шийки матки), HEp-2 (карцинома гортані людини), KB (карцинома ротової порожнини людини), RD (рабдоміосаркома людини), RH (нирка ембріона людини), Vero (нирка зеленої мавпи), СПЭВ (нирка ембріона свині), ВНК-32 (нирка сирійського хом'яка) та інші.

Для підтримання ліній клітин відбирають ті з них, які мають типову морфологію, чітко відмежовані одна від іншої, не мають вакуолей і включень.

Третьою групою є *диплоїдні клітини*. Вони представляють собою культури клітин одного типу, мають диплоїдний набір хромосом і здатні витримувати при цьому до 100 пересівів в умовах лабораторії. Вони є зручною моделлю для отримання вакцинних препаратів вірусів, оскільки вільні від контамінації чужорідними вірусами, зберігають вихідний каріотип під час пасажів, не мають онкогенної активності. У той же час вони надзвичайно вибагливі до умов культивування, через що їх рідко використовують у практиці звичайних вірусологічних лабораторій. Найчастіше користуються лініями культур, які одержано із фібробластів ембріона людини (WI-38, MRC-5, MRC-9, IMR-90), корів, свиней, овець тощо.

Культури клітин зберігають у замороженому стані. Для цього спочатку одержують моношар клітин 4-6-денного віку, а потім суспендують їх у живильному середовищі, щоб отримати концентрацію клітин до 10^6 в 1 мл. Для стабілізації клітин до складу середовища додають 10-20 % сироватки крові та гліцерин. Отри-

ману суспензію розливають у стерильних умовах в ампули і поступово заморожують до -20°C . Зберігають клітини у спеціальних посудинах з рідким азотом при температурі -196°C . Доведено, що за таких умов життєздатність культур клітин не змінюється протягом невизначеного часу. У разі потреби культури швидко розморожують, використовуючи водяну баню, при температурі $37-38^{\circ}\text{C}$.

Деколи у вірусологічній практиці використовують культури органів. Вони представляють собою виготовлені у стерильних умовах зрізи органів тварин, які протягом певного часу (дні, тижні) зберігають свою життєдіяльність в особливих умовах культивування.

Для зараження тканинних культур використовують моношарові культури. З цією метою культури клітини вирощують у флаконах, пробірках, матрацах, які розташовуються горизонтально, щоб клітини могли прикріпитись до скла. Перед зараженням їх проглядають під мікроскопом, відбирають пробірки, де є гарно сформований моношар клітин. Для зараження використовують 6-8 пробірок і таку саму кількість зберігають для контролю. Безпосередньо перед експериментом змінюють живильне середовище у пробірках, промиваючи їх розчином Хенкса. Інокулюють у кожен пробірочку 0,2 мл досліджуваного матеріалу, а потім інкубують у термостаті при температурі 37°C протягом 1-2 год для адсорбції вірусів на поверхні клітин. Після цього видаляють матеріал, знову промивають культуру розчином Хенкса для видалення неприкріплених вірусів і токсичних субстратів і додають живильне середовище (середовище 199 або середовище Ігла з 2 % сироватки крові великої рогатої худоби чи гідролізат лактальбуміну). Пробірки культивують у термостаті при 37°C протягом 1-2 тижнів, постійно проглядаючи їх і фіксуючи результати.

Внаслідок розмноження вірусів у культурі клітин у них виникають дегенеративні зміни, які позначаються як *цитопатична дія вірусів* (ЦПД). Ступінь їх вираження визначається видом вірусів, їх інфікуючою дозою, фізіологічними особливостями клітин тощо. В одних випадках ці зміни виникають через декілька днів після зараження (віруси поліомієліту, ЕСНО, грипу), в інших – через декілька тижнів і навіть місяців (аденовіруси, віруси гепатиту А). Для зараження найчастіше використовують дози вірусів, які дорівнюють $1000-10\ 000$ ЦПД₅₀ (ЦПД₅₀ – така цитопатична доза вірусів, яка викликає дегенеративні зміни в 50 % пробірок, що містять заражені культури клітин).

Виявляти віруси в культурі тканин можна за феноменом бляшкоутворення. Останнім часом досліджують утворення бляшок під бентонітовим живильним покриттям. Попередньо готують десятикратні розведення досліджуваного матеріалу, яким заражають відповідні культури клітин. Після 30-хвилинної інкубації їх відмивають стерильним фірозчином і заливають бентонітовим покриттям, яке містить бентонітовий гель, розчин Ерла, нативну бичачу сироватку, гідрокарбонат натрію, дистильовану воду і розчини антибіотиків для пригнічення сторонньої мікрофлори. Адсорбуючись на поверхні клітин, бентоніт надає моношару клітин молочного кольору. Внаслідок такого покриття репродукція вірусів обмежується тільки первинно інфікованими клітинами, а ЦПД проявляється формуванням вогнищ клітинної дегенерації у вигляді бляшок (див. вкл., рис. 97).

За морфологічними змінами в культурі клітин можна виділити декілька типів прояву цитопатичної дії. Її особливості дозволяють провести попередню діагностику захворювання (рис. 85).

При *повній дегенерації* клітинного моношару спостерігаються зміни в переважній більшості клітин. Вони гинуть, відокремлюються від скла. Окремі клітини, що залишаються живими, змінюють свою морфологію, в них помітний пікноз ядра і цитоплазми. Такий тип дії притаманний пікорнавірусам – вірусам поліомієліту, Коксаки, ЕСНО. Для часткової дегенерації не характерне відокремлення всіх клітин від скла.

Для збудників кору, епідемічного паротиту, парагрипу, респіраторно-синцитальних вірусів характерний *симпластоутворюючий* тип ЦПД. При цьому виникають багатоядерні гігантські клітини (симпласти або синцитії). Аденовіруси викликають утворення скупчень великих округлих клітин, які нагадують грона (*круглоклітинна дегенерація*). При репродукції риновірусів утворюються округлі клітини, які мають відростки, а при розмноженні герпесвірусів спостерігається формування подібних клітин однакового розміру, які розкидано по всьому моношарі. Онкогенні віруси стимулюють клітинну проліферацію (*проліферативний* тип змін), при якій спостерігається формування декількох шарів клітин.

Окремі віруси (віруси краснухи, кримської геморагічної гарячки) не здатні викликати видимих дегенеративних проявів з боку клітин. У таких випадках для їх виявлення використовують феномен інтерференції, при якому клітинні культури паралельно заражають іншими вірусами, здатними викликати ЦПД.

Ступінь вираження дегенеративних змін оцінюють за чотири-плюсовою системою: (4+) – означає, що відбувається деструкція всіх клітин, (3+) – у 75 % їх, (2+) – у 50 %, (+) – до 25 % клітин, (–) – ЦПД проявляється в окремих клітинах.

Досить часто як прояв цитопатичної дії віруси утворюють внутрішньоклітинні включення. Вони можуть локалізуватись як внутрішньоядерно, так і в цитоплазмі клітин. Їх утворення, форма, величина, наявність у них вірусних нуклеїнових кислот є важливим моментом при проведенні вірусологічної діагностики захворювань. Такі включення утворюють віруси сказу (тільця Бабеша-Негрі), натуральної віспи (тільця Гварнієрі), простого герпесу (тільця Ліпшютца), аденовіруси, віруси грипу та інші.



1

2

3

Рис. 85. Цитопатична дія аденовірусів на клітини амніона людини:

1 – моношар клітин до зараження; 2 – початкова фаза дегенерації;

3 – кінцева фаза дегенерації.

Включення виявляють при світловій мікроскопії, фарбуючи препарати за допомогою методу Романовського-Гімзи. З цією метою культури клітин спочатку вирощують на спеціальних скляних пластинках або пластинках із прозорої слюди. Пізніше, після одержання моношару клітин, їх заражують досліджуваним матеріалом, що містить віруси, і через деякий час забарвлюють отримані культури.

Часто для виявлення включень використовують метод імунофлуоресценції. При цьому препарати обробляють специфічними противірусними сироватками, кон'югованими з флуорохромами. В ультрафіолетових променях люмінесцентного мікроскопа включення світяться характерним кольором. Можна довести наявність включень у матеріалі (біоптати) за допомогою електронної мікроскопії, яка дозволяє дослідити тонку структуру цих утворень, виявити окремі віріони.

Часто для виявлення внутрішньоядерних або внутрішньоцитоплазматичних включень використовують відбитки тканин або органів, зскрібки клітин або гістологічні зрізи із тканин загиблих.

Методи ідентифікації вірусів

Важливим етапом лабораторної діагностики будь-якої вірусної інфекції є виявлення та типування вірусів у досліджуваному матеріалі, яке передбачає використання специфічних противірусних сироваток.

Реакція гальмування гемаглютинації (РГГА). Реакція базується на здатності блокувати гемаглютинуючі властивості вірусів за допомогою специфічних антитіл. У результаті цього спостерігається затримка аглютинації еритроцитів.

Компонентами реакції є невідомі антигени (вірусмісткий матеріал), який може бути збагачений пасажами в культурі клітин, лабораторних тваринах або курячому ембріоні, специфічні імунні противірусні (або проти окремих вірусних антигенів) сироватки, еритроцити. Для розведення компонентів реакції використовують забуферений фізіологічний розчин (рН 7,2-7,4). Еритроцити отримують із крові птахів (кури, гуси), ссавців (гвінейські свинки), людини (0 група). Їх тричі промивають у стерильному фізіологічному розчині та зберігають у вигляді 0,5-1,0 % суспензії. З метою їх стабілізації еритроцити попередньо обробляють формаліном або глутаровим чи акриловим альдегідом.

Імунні сироватки попередньо позбавляють неспецифічних інгібіторів, прогріваючи при температурі 56 °С протягом 30 хв (для видалення термолабільних інгібіторів) або обробляючи розчинами перйодату калію чи натрію, бентонітом, каоліном, етакридину лактатом та іншими.

Реакцію ставлять у пробірках або спеціальних полістиролових планшетах з луночками. Постановці реакції передують визначення активності вірусного антигена, який титрують за допомогою РГА. У досліді використовують робочу дозу антигена, яка дорівнює від 4 до 8 ГАО (ГАО – гемаглютинуюча одиниця – максимальне розведення антигена, яке повністю аглютинуює стандартну суспензію еритроцитів). Позитивною реакцією вважають утворення червоного зернистого з нерівними краями осаду, який дифузно розташовується на дні пробірки. Про не-

гативний результат свідчить наявність компактного осаду у вигляді “гудзика” на дні пробірки або лунки, який може стікати при її нахиленні. При частковій аглютинації утворюється осад у вигляді кільця (див. вкл., рис. 27).

Для постановки реакції з метою визначення невідомого вірусу або його антигенів у буферному розчині (0,2) роблять двократні розведення імунної сироватки (вихідне розведення 1:10), а потім додають невідомий антиген в об’ємі 0,2 мл (4-8 ГАО). Систему інкубують залежно від властивостей вірусу при температурі 4 °С, 18 °С, 37 °С 1-18 год. Потім до комплексу додають подвійний об’єм зависі еритроцитів. Пробірки або пластини інкубують протягом 1-3 год при тій самій температурі до повного осідання еритроцитів і оцінюють результати. Реакцію вважають позитивною при відсутності аглютинації еритроцитів. РГГА широко використовують для ідентифікації вірусів грипу, паротиту, енцефалітів та ін.

Реакція гальмування гемадсорбції (РГГ_{адс}). Принцип реакції базується на явищі гемадсорбції. Воно полягає в тому, що еритроцити набувають здатності адсорбуватись на поверхні культур клітин, які зазнали модифікації внаслідок появи в оболонці глікопротеїнів вірусів. Антитіла імунної сироватки при взаємодії з поверхневими антигенами вірусів, представленими в оболонці, зв’язують їх, внаслідок чого гальмується адсорбція еритроцитів на клітинах.

Компонентами реакції є віруси, здатні до гемадсорбції, культура клітин, в якій вони розвиваються, противірусна сироватка з розведенням 1:10 і більше, 0,4-1,0 % зависі еритроцитів півня, гвінейської свинки або людини, тричі відмита фізіологічним розчином або розчином Хенкса. Специфічні сироватки, які використовують у досліді, попередньо обробляють ферментами, які руйнують рецептори, піддають температурному впливу, щоб звільнити від неспецифічних інгібіторів гемаглютинації.

Реакцію ставлять у пробірках або на спеціальних скляних пластинках, на яких є моношар культури клітин. Одна з переваг РГГ_{адс} полягає в тому, що її можна ставити до появи цитопатичного ефекту.

Попередньо заражають культуру клітин вірусмістким матеріалом та інкубують протягом деякого часу залежно від властивостей вірусу. Як контроль використовують культуру клітин, неінфіковану вірусами. Безпосередньо перед дослідом з пробірок видаляють живильне середовище, відмивають клітини від баластних речовин (білків) розчином Хенкса. У кожен дослідну пробірку додають по 0,6 мл розчину Хенкса і по 0,2 мл противірусної сироватки. У контрольні пробірки вносять по 0,8 мл розчину Хенкса та неімунну сироватку тварин. Пробірки інкубують нахиленими, щоб живильне середовище і сироватка омивали клітини, при кімнатній температурі протягом 15-30 хв. Потім в усі пробірки додають по 0,2 мл 0,4 % зависі еритроцитів, інкубують ще 20-30 хв при кімнатній температурі. Після цього пробірки обережно обертають в долонях 5-10 разів для ресуспендування еритроцитів та видалення їх з моношару культур клітин. Розглядаючи пробірки під малим збільшенням мікроскопа, звертають увагу на наявність чи відсутність адсорбції еритроцитів на поверхні клітин. При позитивній РГГ_{адс} еритроцити вільно плавають у живильному середовищі, при негативній – вони адсорбуються на кліти-

нах. РГГ_{адс} використовують для ідентифікації збудників парагрипу, паротиту, респіраторно-синцитіальних вірусів та ін.

Реакція нейтралізації. Принцип реакції ґрунтується на взаємодії специфічних антитіл імунної сироватки з вірусом, яке призводить до нейтралізації останнього. Реакцію можна ставити в культурах клітин з обліком результатів за цитопатичною дією, в кольоровій пробі, за допомогою рН-метрії та феноменом бляшкоутворення. Крім того можна використати для постановки реакції інші живі системи – курячі ембріони та лабораторні тварини

При вивченні нейтралізації цитопатичної дії вірусів в культурі клітин компонентами реакції є вірусмісткий матеріал (культуральна рідина, інфіковані або дезінтегровані культури клітин), імунна противірусна сироватка, спеціальні живильні середовища (сольовий розчин Хенкса, середовища Ігла, 199 тощо) та культура клітин у пробірках або флаконах. Її підбирають залежно від біологічних властивостей вірусів. Найчастіше використовують культури клітин HeLa, СМЦ, нирок мавп, первинні культури клітин курячих чи людських ембріонів.

З матеріалу, що містить віруси, попередньо готують послідовні десятикратні розведення від 10^{-1} до 10^{-8} . По 0,1 мл кожного розведення вносять у пробірки, в яких знаходиться культура клітин. Перед проведенням досліду в пробірках замінюють живильне середовище. Як правило, заражують по три пробірки з культурою клітин для кожного розведення вірусмісткого матеріалу. Контролем є культури клітин, які не інфікують вірусом. Клітинні культури інкубують при 37°C протягом 5-7 днів. Результати оцінюють за наявністю або відсутністю цитопатичної дії. Визначають 50 % тканинну цитопатичну дію вірусів (ТЦД₅₀), тобто найбільше розведення вірусів, яке викликає цитопатичний ефект у 50 % заражених клітин.

В основному досліді використовують пробірки із розведеннями імунної сироватки, куди вносять стандартну дозу вірусу (найчастіше 100 ТЦД₅₀), а після інкубації при кімнатній температурі протягом 30-60 хв додають одношарові культури клітин. Систему інкубують при 37°C протягом одного тижня і враховують наявність цитопатичного ефекту. Відсутність його свідчить про нейтралізацію вірусу, який вивчається, специфічною імунною сироваткою. За ідентичною схемою реакцію можна ставити в спеціальних полістиролових планшетах.

Кольорова проба передбачає, що при взаємодії вірусів з культурою клітин останні гинуть, рН середовища залишається лужним, і колір індикатора не змінюється. При нейтралізації вірусів антитілами специфічної сироватки або при відсутності відповідних вірусів створюються умови для розвитку культур клітин. Вони залишаються живими, активно здійснюють обмін речовин, внаслідок чого утворюються продукти клітинного метаболізму, які зсувають рН середовища в кислу сторону. Це приводить до зміни кольору індикатора фенолроту з червоного (лужне рН) на солом'яно-жовтий або оранжевий (кисле значення рН).

При постановці реакції спочатку змішують 0,25 мл досліджуваного вірусмісткого матеріалу, який містить 100 ТЦД₅₀, з різними розведеннями специфічної противірусної імунної сироватки. Після 30-60-хвилинної інкубації при температурі 37°C у пробірки додають по 0,25 мл клітинної суспензії з індикатором фенолро-

том і заливають їх шаром вазелінової олії або закривають резиновими корками. Пробірки витримують у термостаті при 37 °С протягом одного тижня, а потім читають результати. При позитивному тесті в дослідних пробірках спостерігають зміну кольору індикатора з червоного на оранжевий.

Оцінити результати реакції можна також безпосередньо вимірюючи значення рН середовища за допомогою іономера. Кольорову пробу особливо часто використовують для лабораторної діагностики поліомієліту.

Надійним методом ідентифікації вірусів є **реакція нейтралізації бляшкоутворення** вірусів у культурах клітин. Принцип реакції полягає в тому, що антитіла специфічної імунної сироватки, які нейтралізують віруси, сприяють зменшенню числа бляшок – зон некрозів – в одношаровій культурі клітин.

Для постановки реакції на одношарову культуру клітин у чашках або матрацах наносять суміш вірусів і специфічної імунної сироватки, які попередньо інкубовані при 37 °С протягом 1 год для нейтралізації. Після цього поверхню моношару клітин заливають освітленим індиферентним агаром у суміші з усіма необхідними компонентами і суправітальним барвником нейтральним червоним. Заражені клітини інкубують у вологій камері в атмосфері з 5 % вуглекислого газу протягом 5 діб при температурі 37 °С.

Більш чутливим методом вивчення утворення бляшок є використання бентонітового покриття. Цей метод набув широкого застосування при вивченні ентеровірусів. Особливість його полягає в тому, що заражені сумішшю вірусів та імунної сироватки моношарові культури клітин заливають рідким живильним середовищем, яке містить гель бентоніту. Часточки бентоніту адсорбуються на поверхні культур клітин і гальмують вільне поширення вірусів серед клітин. Вже через 2 дні після зараження з'являються вірусні бляшки у вигляді прозорих плям на молочно-матовому фоні моношару клітин (див. вкл., рис. 28).

Про нейтралізуючу активність сироватки свідчить зменшення числа та величини бляшок, які утворюються під агаровим покриттям у порівнянні із контролем без специфічної сироватки. Реакцію вважають позитивною, якщо число бляшок або їх величина зменшились на 80 % у порівнянні з контролем. Нейтралізуючим титром сироватки є те її найбільше розведення, при якому ще спостерігають нейтралізацію вірусів, що попереджує утворення бляшок в культурі клітин.

При постановці реакції нейтралізації в курячих ембріонах або лабораторних тваринах їх заражають сумішшю вірусмісткого матеріалу та специфічної імунної сироватки. При обліку результатів враховують кількість загиблих ембріонів чи тварин, утворення зон некрозів на хоріонантоїсній оболонці курячих ембріонів або оцінюють ступінь нейтралізації вірусів за їх, наприклад, гемаглютинуючою активністю. РН часто застосовують для лабораторної діагностики герпесу, грипу, парагрипу, паротиту, поліомієліту тощо.

Реакцію зв'язування комплекменту досить широко використовують у вірусологічній практиці для ідентифікації хвороботворних агентів. Вона належить до непрямих двосистемних гетерологічних реакцій і ґрунтується на принципі взаємодії комплекменту із специфічним комплексом антиген-антитіло. Внаслідок цього не відбувається гемолізу сенсibiliзованих еритроцитів.

Компонентами реакції є вірусмісткий матеріал, специфічна імунна сироватка, комплемент, гемолітична сироватка, еритроцити барана та електроліт. Зважаючи на високу чутливість реакції, всі її компоненти перед постановкою основного дослідження обов'язково титрують для визначення робочих доз інгредієнтів.

При виконанні реакції в окремих пробірках змішують вірусмісткий матеріал, специфічну імунну сироватку і комплемент у робочій дозі. Після інкубування цієї першої системи до неї додають попередньо сенсibilізовані гемолітичною сироваткою еритроцити барана. Після витримування дослідних пробірок при відповідній температурі проводять облік результатів.

При утворенні специфічного комплексу між вірусами та імунною сироваткою він набуває здатності адсорбувати комплемент. Тому наступне додавання гемолітичної системи (при відсутності вільного комплексу) не супроводжується лізісом еритроцитів – позитивний результат. Якщо антигени та антитіла є гетерологічними, вільний комплемент зв'язується із сенсibilізованими еритроцитами барана, викликаючи їх гемоліз. Залежно від ступеня вираження гемолізу реакцію оцінюють за 4-плюсовою системою: від “++++” – різко позитивна реакція (прозора рідина і осад еритроцитів) до “–” – негативна реакція (відсутність осаду еритроцитів, повний гемоліз або “лакова кров”).

До особливостей РЗК при вірусологічних інфекціях належить те, що її можна ставити як при температурі 37 °С (інкубуючи систему “антиген – антитіло – комплемент” протягом 1 год), так і на холоді (+4 °С протягом 18 год), а також використовуючи мікрометод, коли всі інгредієнти реакції беруться в об'ємі не 0,5 мл, а 0,25 мл. РЗК використовують майже при всіх вірусних інфекціях.

У *реакціях імунодифузії* використовують принцип дифундування антигенів і антитіл назустріч один одному в напіврідкому середовищі, наприклад, агаровому гелі. У зоні оптимальних співвідношень антигенів та антитіл утворюються лінії преципітації. Їх число залежить від кількості антигенів, які відрізняються своїми епітопами, так як кожна лінія відповідає своїй системі антиген – антитіло.

Реакцію ставлять, як правило, на стерильному склі, яке покривають 1 % агарозою. Після застигання в ній роблять лунки. У центральну лунку вносять специфічну противірусну сироватку, а лунки навколо заповнюють матеріалом, який містить віруси. Систему інкубують у вологій камері протягом 24-48 год. Поява нижніх ліній преципітації свідчить про наявність вірусного антигена.

Тест є більш чутливим при поєднанні із електрофорезом. Метод *зустрічного імуноелектрофорезу* найчастіше використовують для визначення HBsAg вірусу гепатиту В або інших вірусних антигенів, які мають негативний заряд. Сутність цього методу полягає в тому, що на скляну пластинку наносять шар агарози, в якому після застигання роблять паралельні ряди лунок. Антиген наливають у лунки, які розташовані ближче до катода, а сироватки – в лунки поблизу аноду. Після цього пластини кладуть у вологій камері і пропускають постійний електричний струм. Вірусні антигени з негативним зарядом рухаються в напрямку до аноду, а антитіла сироватки – до катода. Через 24 год в агаровому гелі спостерігають появу ліній преципітації, які утворюються в зонах, що містять еквівалентні концентрації антигенів і антитіл.

Метод *імуноної електронної мікроскопії (ІЕМ)* дозволяє визначити комплекси, які утворюються внаслідок взаємодії вірусних антигенів із специфічними антитілами сироваток. У багатьох випадках цей метод є більш ефективним, ніж використання звичайної електронної мікроскопії. Для реалізації методу матеріал, який містить віруси, змішують з імуною сироваткою, інкубують протягом 1 год при температурі 37 °С, потім 8-12 год при 6 °С. Комплекси вірусів з антитілами осаджують при ультрацентрифугуванні. Після промивання осаду до нього додають 3 % вольфрамво-оцтову кислоту або ураніл-ацетат. Встановлюють відповідне значення рН, наносять матеріал на спеціальну мідну сітку і вивчають під електронним мікроскопом, спостерігаючи наявність агрегації вірусів, навантажених антитілами. ІЕМ використовують для виявлення та ідентифікації вірусів гепатиту А і В, поліомієліту, цитомегалії, ротавірусного ентериту тощо.

Метод флуоресціюючих антитіл (МФА) набув широкого застосування у вірусології внаслідок високої специфічності та зручності в користуванні. Існують численні модифікації цього методу. Зокрема, можна виявляти та ідентифікувати віруси як безпосередньо в досліджуваному матеріалі, так і після попереднього зараження ними, наприклад, культур клітин. Принцип методу полягає у взаємодії антигенів з антитілами, які заздалегідь мічені флуорохромами (родаміном, який дає люмінесценцію червоного кольору, або флуоресцеїнізотіоціанатом натрію, який зумовлює зелене світіння комплексу в ультрафіолетових променях). Метод непрямої імунофлуоресценції можна ефективно використовувати для ідентифікації більшості вірусів.

При непрямому методі дослідження культуру клітин, яка розташовується моношаром на предметних скельцях, попередньо заражають досліджуваним матеріалом, що містить віруси, та інкубують при оптимальних параметрах протягом декількох днів. Після цього скельця фіксують в ацетоні та наносять на них специфічну сироватку. Систему інкубують у вологій камері при температурі 37 °С протягом 30 хв, відмивають від надлишку сироватки і наносять тонкий шар флуоресціюючої антисироватки. Після 30 хвилинного контакту скельця відмивають для видалення надлишку антитіл, підсушують і досліджують під люмінесцентним мікроскопом, спостерігаючи характерне світіння.

При *реакції радіального гемолізу* відбувається взаємодія вірусних антигенів, які адсорбовані на еритроцитах, суспендованих в агарозному гелі, з антитілами, що внесені в лунки і дифундують в шар агару. При цьому утворюються специфічні імуноні комплекси на поверхні еритроцитів. У присутності комплементу спостерігається лізис еритроцитів і, відповідно, утворення зон гемолізу навколо лунок. Реакцію оцінюють за допомогою стереоскопічної лупи. При позитивному тесті діаметр зони гемолізу навколо лунки може досягати 2 мм і більше. При відсутності гемолізу або його діаметрі менше 2 мм реакцію розцінюють як негативну. Вважається, що за своєю чутливістю ця реакція не поступається РГГА.

Реакція зворотної непрямої гемаглютинації використовується у вірусологічній практиці для виявлення невідомих вірусних антигенів. Сутність її полягає в тому, що еритроцити тварин або людини, навантажені специфічними проти-

вірусними антитілами, здатні взаємодіяти з вірусними антигенами, внаслідок чого вони склеюються і випадають в осад.

Таким чином, компонентами реакції є еритроцити, оброблені таніновою кислотою з адсорбованими на них молекулами противірусних антитіл (сенсibiliзовані еритроцити), вірусні антигени і розчин електроліту.

Реакцію можна ставити в пробірках, лунках, на склі, в капілярах, а також мікрометодом.

Для постановки реакції досліджуваний матеріал (0,025 мл) розводять двократно електролітом, після чого додають такий самий об'єм еритроцитарного антигенового діагностичного. Експозиція відбувається протягом 30 хв при температурі 37 °С після чого проводять облік реакції.

При позитивній реакції в дослідних лунках спостерігають виражену аглютинацію еритроцитів з утворенням осаду з нерівними хвилястими краями, який розподіляється рівномірним шаром по дну пробірки або лунки – “перевернута парасолька”. При негативному результаті – щільний, компактний осад з рівними краями.

Крім цих реакцій для виявлення та типування вірусів широко використовують РЕМА, РІА, полімеразну ланцюгову реакцію та інші, викладені у попередніх розділах.

Виділення та титрування бактеріофагів

Вперше спонтанний лізис бактерій описав М.Ф. Гамалія в 1898 р. Детальніше явище розчинення дизентерійних бактерій якимось невідомим агентом дослідив канадський мікробіолог Ф. д'Ерелль у 1917 р. Він назвав цей агент **бактеріофагом**. На основі вивчення феномена бактеріофагії були вирішені дуже важливі проблеми молекулярної біології та генетики. Бактеріофаги виявились основною моделлю для дослідження тонкої структури гена, універсального генетичного коду, впливу радіації на спадкові структури організмів.

Більшість бактеріофагів мають форму сперматозоїда. Вони складаються з гексагональної головки, в якій міститься ДНК, хвостового відростка (стержня, оточеного білковим чохлам), базальної пластинки з фібрилами – рецепторами. Розмір голівки 60-100 нм. Її двошарова оболонка утворена капсомерами, які оточують одну щільно скручену молекулу ДНК. Порожнистий відросток довжиною 100-200 нм служить для прикріплення до поверхні бактерійної клітини та її інфікування. Адсорбується фаг на клітині за допомогою базальної пластинки та фібрил-рецепторів. Існує шість морфологічних типів фагів: нитчасті, без відростка, з аналогом відростка, коротким відростком, з чохлам відростка, що не скорочується й з чохлам відростка, що скорочується (рис. 86).

Хімічний склад фагів, як інших вірусів, представлений нуклеїновою кислотою, білками, невеликою кількістю

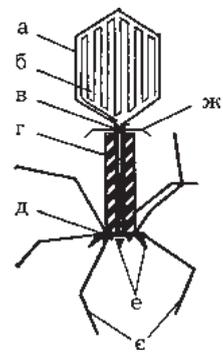


Рис. 86. Схема будови бактеріофага:

а – голівка; б – ДНК;
в – стержень; г – чохлам;
д – базальна пластинка;
е – шипи; е – хвостові
фібрили; ж – коміречко.

ліпідів у оболонці. Переважна більшість фагів містить ДНК і лише окремі – РНК. За своїм складом фагові нуклеїнові кислоти не відрізняються від аналогічних структур інших мікроорганізмів і вірусів. Всередині голівки є невелика кількість “внутрішнього білка”. В дистальній частині відростка, під чохлам, міститься фермент лізоцим, який відіграє велику роль у проникненні фагової нуклеїнової кислоти в бактеріальну клітину.

У мікроорганізмів, виявляється, також існують “інфекційні хвороби”, і викликають їх бактеріофаги. При цьому лізис бактерій під впливом фагів характеризується строгою специфічністю. Для кожного виду як патогенних, так і сапрофітних мікроорганізмів існує свій індивідуальний бактеріофаг, який вибірково діє лише на “свій” мікроб. Ця вибіркова спеціалізація дії може бути спрямована тільки на певну різновидність (або навіть певний штам), що має велике значення для ідентифікації збудників інфекційних хвороб, їх окремих фаговарів. Це допомагає епідеміологам і клініцистам встановити джерело інфекції та намітити раціональні шляхи для її профілактики. Такі високоспеціалізовані бактеріофаги називають монофагами. Але в природі існують і поліфаги, які здатні лізувати кілька близьких між собою видів бактерій.

Бактеріофаги стійкі до дії багатьох факторів зовнішнього середовища. Зокрема, вони витримують високий тиск, зберігають активність при дії іонізуючого та рентгенівського випромінювання, а також при значеннях рН – 2,5-8,5. Однак вони швидко втрачають свої властивості при кип’ятінні, дії дезінфікуючих розчинів та ультрафіолетових променів.

Феномен бактеріофагії можна спостерігати як на рідких, так і на щільних живильних середовищах. Якщо в пробірку з МПБ, де росте кишкова паличка, додати декілька крапель відповідного бактеріофага, то через певний час відбувається просвітління мутної суспензії бактерій за рахунок дії фагів. Для вивчення лізису клітин на щільних живильних середовищах їх попередньо засівають мікроорганізмами, а потім наносять бактеріофаги. Через добу на фоні суцільного газону бактерій утворюються зони, де ріст відсутній. Такі зони мають, як правило, круглу форму і виникають внаслідок літичної дії бактеріофагів. Їх називають **негативними колоніями** або **бляшками** бактеріофагів (рис. 87).

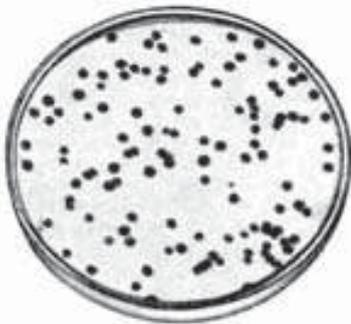


Рис. 87. Стерильні плями (“бляшки”) на бактеріальному газоні після зараження бактеріофагом.

Залежно від наслідків взаємодії фагів з бактеріальною клітиною, вони поділяються на **вірулентні** та **помірні**.

Вірулентні бактеріофаги проникають всередину клітини, спричиняючи її лізис. Взаємодія їх з клітиною складається з ряду етапів, притаманних практично всім вірусам.

Коли з клітиною взаємодіють помірні бактеріофаги, частина клітин залишається неушкодженою ними, тому що спостерігається явище **лізогенії** – інтеграції генома бактеріофага в геном клітини.

Такий фаг, який вмонтовано в хромосому клітини, називається **профагом**. Мікроорганізми з профагом називаються **лізогенними бактеріями**, і при дії деяких факторів (іонізуючого й ультрафіолетового випромінювання, мутагенів) вони здатні до продукції помірною фага втрачаючи свою лізогенність. Лізогенізація має велике біологічне значення й широко поширена у мікробному світі, тому що під впливом бактеріофагів можуть суттєво змінюватись біологічні властивості бактерій. Таке явище називають **фаговою конверсією**. Доказана можливість перетворення нетоксигенних дифтерійних паличок у токсигенні під впливом лізогенізації їх помірним бактеріофагом, який несе в своєму геномі tox^+ -гени. Саме вони забезпечують синтез дифтерійними паличками сильного екзотоксину. Доведена роль бактеріофагів у забезпеченні продукції токсинів збудників ботулізму, стафілококів та інших бактерій. У деяких випадках під впливом помірних бактеріофагів можуть змінюватись антигенні властивості бактерій кишкової групи, вібріонів, ферментативна активність мікробів, їх резистентність до антибіотиків.

Помірні бактеріофаги відіграють роль типових плазмід. Їх використовують як моделі для вивчення актуальних проблем генетики мікроорганізмів, в генно-інженерних дослідженнях і біотехнологічних процесах.

Бактеріофаги широко розповсюджені в природі. Вони зустрічаються в будь-яких середовищах довкілля: ґрунті, воді, стічних водах – всюди, де є відповідні їм види мікроорганізмів. Фаги знайдено в кишечнику та виділеннях людей, тварин, птахів, плазунів, риб. Відповідно звідси в навколишнє середовище потрапляють бактеріофаги численних збудників інфекційних захворювань: черевного тифу та паратифів, сальмонельозів, ешерихіозів, дизентерії, холери та ін.

Одержують бактеріофаги або з лізогенних культур мікроорганізмів, або з навколишнього середовища, заражаючи матеріалом відповідні бактерії. Для цього досліджуваний матеріал центрифугують, для осадження твердих частинок, а надосадову рідину в об'ємі 1 мл вносять у 30 мл м'ясо-пептонного бульйону, який попередньо засіяний 1 мл 6-18-годинної культури бактерій. Через 18-24 год інкубації при температурі 37 °С посів фільтрують через бактеріальний фільтр, розводять у 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} разів, додають 0,05-0,1 мл культури мікроорганізмів та інкубують протягом доби при оптимальній температурі. Як контроль використовують культуру бактерій без бактеріофагу. Якщо в матеріалі присутній бактеріофаг, середовище залишається прозорим внаслідок лізису бактерій фагами, в той час як у контрольній пробірці відбувається ріст бактерій (середовище стає мутним).

Для визначення наявності інфекційних бактеріофагів використовують метод Грація – метод агарових шарів. Він полягає в тому, що попередньо матеріал, який містить бактеріофаг, розводять м'ясо-пептонним бульйоном: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} . Після цього по 1 мл кожного розведення вносять в 2,5 мл розтопленого 0,7 % м'ясо-пептонного агару, додають 0,1 мл індикаторних мікроорганізмів, ретельно перемішують і виливають у чашки Петрі на поверхню підсушеного щільного 1,5 % м'ясо-пептонного агару. Чашки залишають на 30 хв при кімнатній температурі для застигання агару і поміщають у термостат при температурі 37 °С на добу.

У разі наявності бактеріофагів спостерігають появу окремих стерильних плям – “негативних” колоній (“бляшок”) – зон лізису мікроорганізмів.

Титруючи фаги за **методом Грація**, після добової інкубації підраховують число “негативних” колоній бактеріофагів. Кількість цих плям відповідає кількості фагів у засіяній суспензії. Виходячи з цього, можна підрахувати число фагових корпускул в 1 мл вихідної суспензії (титр бактеріофагів): число колоній множать на розведення бактеріофагів. Наприклад, при розведенні 10^{-4} з’явилося 50 колоній, отже, титр фагів дорівнює: 50×10^{-4} або 5×10^{-5} в 1 мл.

Для визначення титру бактеріофагів за **методом Аппельмана** готують ряд пробірок із м’ясо-пептонним бульйоном, в яких розводять досліджуваний фаг (табл. 69).

Таблиця 69

Титрування бактеріофагів за методом Аппельмана

Компоненти	Пробірки										Контроль	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	культури	фага
М’ясо-пептонний бульйон	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
Досліджуваний фаг	0,5	→	→	→	→	→	→	→	→	↑	–	0,5
Розведення	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	–	–
Суспензія мікроорганізмів	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	–
Облік результатів												

Після цього в них додають по 0,05 мл індикаторних мікроорганізмів. Паралельно готують контрольні пробірки: одну – з культурою бактерій без фага, а другу – з бактеріофагом без мікробів. Посіви інкубують при 37°C протягом 18-24 год і спостерігають за лізисом мікроорганізмів. Титром бактеріофага вважають найбільше його розведення, яке викликає повний лізис бактерій.

Оскільки фаги мають специфічну літичну дію на мікроорганізми, їх можна використовувати для **фагоіндикації** – визначення виду відповідних бактерій в інфекційному матеріалі та об’єктах зовнішнього середовища.

Для цього у дві пробірки з м’ясо-пептонним бульйоном засівають досліджувану культуру бактерій. Потім в одну з них додають декілька крапель індикаторного фага. Пробірки інкубують при оптимальній температурі протягом 18-24 год. Порівнюють мутність бульйону в контрольній та дослідній пробірці і роблять висновки про чутливість мікроорганізмів до літичної дії бактеріофагів.

З цією ж метою на щільне живильне середовище газом засівають досліджувану культуру бактерій. Після підсушування чашок на них бактеріологічною петлею або пастерівською піпеткою наносять краплю відповідного розведення бактеріофага, яке вказано на ампулі. Посіви інкубують у термостаті при 37°C протягом 18-24 год і фіксують наявність прозорих круглих плям, які свідчать про

літичну дію бактеріофага. Позитивний результат вказує на належність бактерій до певного виду.

Фаготипування бактерій проводять з метою аналізу епідеміологічної ситуації для визначення джерела інфекції. Найчастіше його виконують при діагностиці стафілококових, кишкових та інших інфекцій. Цей метод ґрунтується на використанні специфічної чутливості бактерій до своїх бактеріофагів, яка свідчить про спільне (тотожне) походження бактерій, що мають однаковий фаготип.

В основі тесту лежить визначення фаговаріантів (фаговарів) збудників. Для цього чашку з м'ясо-пептонним агаром за числом бактеріофагів поділяють на квадрати. Вирощують 4 годинну бульйонну культуру досліджуваного штаму і 1 мл її засівають на поверхню середовища. Розподіляють рівномірно культуру по поверхні середовища і надлишок її зливають. Чашку підсушують у термостаті при 37 °С протягом 30-40 хв і на поверхню засіяного газону в кожний квадрат капають піпеткою певні бактеріофаги відповідних розведень. Посіви ставлять у термостат або залишають при кімнатній температурі протягом 18-20 год, після чого оцінюють результати за допомогою лупи. Залежно від чутливості культури до бактеріофагів виділяють різні ступені лізису бактерій, який оцінюють за чотири-плюсовою системою: від лізису, який зливається, до його відсутності.

Враховуючи, що чутливість бактерій до фага є постійною ознакою, порівнюють фаготипи досліджуваних культур з фаготипом мікробів, який було виділено від вірогідного джерела інфекції. При їх збігові роблять висновок про виявлене джерело інфекції.

Розділ 13

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ

Грип

Грип – гостре респіраторне захворювання людини, яке має тенденцію до епідемічного поширення. Характеризується катаральним запаленням верхніх дихальних шляхів, гарячкою, вираженою загальною інтоксикацією. Часто грип супроводжується виникненням тяжких ускладнень – вторинних бактеріальних пневмоній, загостренням хронічних захворювань легень.

Збудники грипу належать до родини Orthomyxoviridae. Вона включає три роди вірусів – А, В, С.

Вірус грипу має сферичну форму, його розміри 80-120 нм (рис. 88; див. вкл., рис. 29). Деколи утворюються ниткоподібні віріони. Генوم утворений одонитковою мінус-ниткою РНК, яка складається з восьми фрагментів, і оточений білковим капсидом. РНК асоційована з 4 внутрішніми білками: нуклеопротеїдом (NP) і

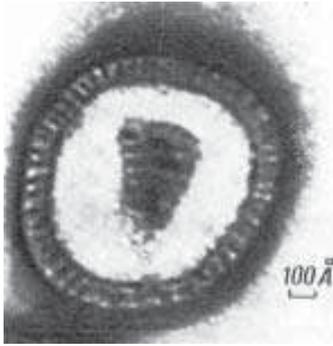


Рис. 88. Вірус грипу.

високомолекулярними білками P1, P2, P3, які беруть участь у транскрипції геному та реплікації вірусу. Нуклеокапсид має спіральний тип симетрії. Над капсидною оболонкою знаходиться шар матричного білка (М протеїн). На зовнішній, суперкапсидній оболонці у вигляді шипиків розміщені гемаглютинін (H) і нейрамінідаза (N). Обидва глікопротеїни (N і H) мають виражені антигенні властивості. У вірусів грипу знайдено 13 різних антигенних типів гемаглютиніну (H1-13) та 10 варіантів нейрамінідази (N1-10).

За внутрішнім нуклеопротеїдним антигеном розрізняють три типи вірусів грипу – А, В, С, які можна визначити в РЗК. У вірусів типу А, які вражають людину, є три різновидності гемаглютиніну (H1, H2, H3) і дві – нейрамінідази (N1, N2). Залежно від їх комбінацій, виділяють варіанти вірусів грипу А – H1N1, H2N2, H3N2. Їх визначають у реакції гальмування гемаглютинації з відповідними сироватками.

Віруси грипу легко культивуються в курячих ембріонах і різноманітних культурах клітин. Максимальне нагромадження вірусів відбувається через 2-3 дні. У зовнішньому середовищі вірус швидко втрачає інфекційність через висушування. При низькій температурі в холодильнику зберігається протягом тижня, при -70°C – значно довше. Нагрівання призводить до його інактивації через кілька хвилин. Під впливом ефіру, фенолу, формаліну швидко руйнується.

Вірусологічний метод діагностики. Матеріалом для дослідження є змиви з носоглотки, виділення з носа, які беруть сухими або вологими стерильними ватними тампонами в перші дні захворювання, харкотиння. Віруси можна також знайти в крові, спинномозковій рідині. При летальних випадках забирають шматочки уражених тканин верхніх і нижніх дихальних шляхів, головного мозку тощо.

Носоглоткові змиви беруть натщесерце. Хворий повинен тричі прополоскати горло стерильним ізотонічним розчином хлориду натрію (10-15 мл), який збирають у стерильну банку з широким горлом. Після цього шматочком стерильної вати протирають задню стінку глотки, носові ходи, потім її занурюють у банку із змивом.

Можна взяти матеріал стерильним, зволженим в розчині хлориду натрію тампоном, яким ретельно протирають задню стінку глотки. Після забору матеріалу тампон занурюють у пробірку з ізотонічним розчином, до якого додано 5% інактивованої сироватки тварин. У лабораторії тампони полощуть у рідині, віджимають біля стінки пробірки і видаляють. Змив витримують у холодильнику для відстоювання, потім відбирають середню частину рідини в стерильні пробірки. До матеріалу додають антибіотики пеніцилін (200-1000 ОД/мл), стрептоміцин (200-500 мкг/мл), ністатин (100-1000 ОД/мл) для знищення супутньої мікрофлори, витримують 30 хв при кімнатній температурі і використовують для виділення вірусів, попередньо перевіривши його на стерильність.

Найчутливішим методом виділення вірусів є зараження 10-11-денних курячих ембріонів. Матеріал в об'ємі 0,1-0,2 мл вводять в амніотичну або алантоїсну

Таблиця 71

Схема типування вірусів грипу в РГГА

Компоненти, мл	Досліджувані лунки								
	1	2	3	4	5	6	7	Контроль сироватки	Контроль еритроцитів
Ізотонічний розчин хлориду натрію	–	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Діагностичні сироватки (1:10)									
H1N1 (1-ий ряд)	0,2	0,2	→	→	→	→	↓	0,2	–
H2N2 (2-ий ряд)	0,2	0,2	→	→	→	→	↓	0,2	–
H3N2 (3-ій ряд)	0,2	0,2	→	→	→	→	↓	0,2	–
Досліджувані віруси (4 ГАО в 0,2 мл)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	–	–
Розведення	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	–	–
Інкубація при 18-20 °С протягом 30 хв									
1 % суспензія еритроцитів курки	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Інкубація при 18-20 °С протягом 1 год									
Результат									
Сироватки: H1N1									
H2N2									
H3N2									

Для ідентифікації виділених вірусів використовують РГГА (за умови, якщо титр гемаглютининів становить у культуральній рідині не менше 1:8). Крім цієї реакції, можна використати РГГ_{алс}, однак вона є менш чутливою і вимагає титру імунної сироватки не менше, ніж 1:160 а також РЗК, РН, РЕМА тощо.

Серологічне дослідження використовують для підтвердження діагнозу грипу. Воно ґрунтується на визначенні чотирикратного зростання титру антитіл у сироватці хворого.

Першу сироватку отримують на початку хвороби в гострому періоді (2-5-й день хвороби), другу – після 10-14-го дня захворювання. Оскільки сироватки досліджують одночасно, першу з них зберігають у холодильнику при температурі -20 °С.

Найчастіше використовують РГГА, РЗК, РНГА. Ці реакції ставлять із спеціальними наборами стандартних вірусних діагностикумів (еталонні штами вірусів грипу різних серологічних типів). Оскільки сироватки хворих можуть містити неспецифічні інгібітори гемаглютинації, їх спочатку прогрівають при температурі 56 °С, а також обробляють спеціальним ферментом (наприклад, нейрамінідазою) або розчинами перйодату калію, риванолу, хлориду марганця, суспензією білої глини тощо за спеціальними схемами.

Реакцію гальмування гемаглютинації можна ставити в пробірках (макрометод) або в спеціальних планшетах для імунологічних досліджень (мікрометод). Схема постановки РГГА наведена в таблиці 72.

Таблиця 72

Схема РГГА для серологічної діагностики грипу

Компоненти, мл	Досліджувані лунки									
	1	2	3	4	5	6	7	Контроль сироватки 1:5	Контроль діагностичному	Контроль еритроцитів
Ізотонічний розчин хлориду натрію	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Сироватки хворого (1:5):										
I (1-ий ряд)	0,2	→	→	→	→	→	↓	0,2	–	–
II (2-ий ряд)	0,2	→	→	→	→	→	↓	0,2	–	–
Вірусний діагностичум (4 ГАО в 0,2 мл)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	–	0,2	–
Розведення сироваток	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	–	–	–
Інкубація при 18-20 °С протягом 30 хв										
1 % суспензія еритроцитів курей	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Інкубація при 18-20 °С протягом 1 год										
Результат										
Сироватки: I										
II										

Реакція вважається позитивною при утворенні компактного, щільного осаду еритроцитів з рівними краями.

Експрес-діагностика. Метод базується на виявленні в досліджуваному матеріалі специфічних вірусних антигенів за допомогою імунофлуоресценції в прямій або непрямій РІФ. Слиз отримують із носових ходів або задньої стінки глотки, центрифугують і з осаду клітин циліндричного епітелію слизової оболонки готують мазки на предметних скельцях. Їх обробляють імунофлуоресцентними сироватками, кон'югованими з флуорохромами, наприклад, ФІТЦ (флуоресцеїнізотіоціанат). При дослідженні препаратів за допомогою люмінесцентного мікроскопа спостерігають характерне зелено-жовтувате світіння вірусів грипу, які локалізуються на початку хвороби в ядрах епітеліальних клітин.

Останнім часом пропонується використовувати для індикації специфічних вірусних антигенів ІФА, РЗНГА, ПЛР.

Параміксовірусні інфекції

До родини *Paramyxoviridae* (пара – біля, муха – слиз) належать віруси парагрипу, епідемічного паротиту, кору та респіраторно-синцитіальний вірус.

Парагрип

Віруси парагрипу за формою та ультраструктурою подібні до грипозних, але значно більші за розмірами. Діаметр сферичних форм – 150-300 нм. Зустрічаються також грушеподібні й гіллясті форми. Віруси містять одониткову лінійну нефрагментовану “мінус” нитку РНК. Суперкапсидна оболонка має гемаглютинин і нейрамінідазу. Віруси містять 6-8 структурних білків, серед яких білки нуклеокапсиду – HN, P, L. Особливий білок М локалізується між нуклеокапсидом і суперкапсидною оболонкою.

Віруси здатні аглютинувати еритроцити гвінейських свинок, курей, мавп і людини. Культивуються в перещеплюваних і первинних культурах клітин людини й мавп (HeLa, ВНК-21, Vero, НЕР-2, СМЦ), але погано розвиваються в курячих ембріонах. За антигенною будовою розрізняють 5 серотипів, які спричиняють різні респіраторні захворювання: гострі фарингіти, ларингіти, трахеобронхіти, пневмонію, круп. Особливо тяжкий перебіг захворювань у дітей першого року життя.

Для **вірусологічної діагностики** парагрипозної інфекції досліджують слиз із задньої стінки глотки, нижніх носових ходів, автопсійний матеріал (тканини трахеї, бронхів, легень). Як правило, матеріал забирають у перші дні хвороби, що пов'язано з високою концентрацією віріонів у ньому. Забір проводять одночасно за допомогою 2-3 стерильних ватних тампонів, які пізніше занурюють в одну пробірку з 5 мл розчину Хенкса та 5 % бичачого сироваткового альбуміну або грітої бичачої сироватки крові. Перед наступним виділенням вірусів тампони віджимають і видаляють з пробірки, і після відстоювання відбирають середню порцію рідини для подальшого дослідження. Присутню мікрофлору знищують додаванням по 500 ОД/мл пеніциліну і стрептоміцину, виримуючи пробірки протягом 30 хвилин при кімнатній температурі, і заражають моношари культур клітин. Матеріал, який залишився, зберігають певний час при температурі -18 °С для повторного, у разі потреби, дослідження.

Довести наявність вірусів у культурах клітин можна через 2-4 дні за цитопатичною дією. При цьому спостерігається утворення симпластів з численними ядрами, заокруглені контури клітин, культура набуває вигляду твердого сиру (ділянки відсутності клітин). З цією метою також широко використовується реакція гемадсорбції (РГ_{алс}), яку ставлять з еритроцитами гвінейських свинок. Починаючи з 6-8 дня культивування вірусів для індикації їх в культурі клітин можна використати РГА з еритроцитами гвінейських свинок.

Для типування парагрипозних вірусів використовують РН, РГГА, РЗК, РГГ_{алс} та інші. У реакції гальмування гемаглютинації використовують 0,7 % завись еритроцитів гвінейських свинок або людини. Слід звернути увагу, що чутливість ре-

акції підвищується, якщо систему „вірусмісткий матеріал – противірусна діагностична сироватка” інкубувати при кімнатній температурі протягом 2 год або 18 год при 4 °С. Після додавання відповідних еритроцитів реакцію ще витримують при 22 °С протягом 1 год і оцінюють результати. Оскільки різні серотипи вірусів парагрипу мають спільні антигени імунологічні реакції ставлять, попередньо зробивши розведення діагностичних сироваток. Серологічний тип вірусу визначають за найбільшим титром діагностичної сироватки, яка дала позитивний результат.

Значного поширення набула для ідентифікації вірусів парагрипу РН, в якій результати оцінюють за гемадсорбцією. При її постановці спочатку витримують суміш інактивованих прогріванням при 56 °С 30 хв типоспецифічних діагностичних сироваток з виділеним вірусом протягом 2 год при кімнатній температурі. Потім заражають культури клітин, інкубуючи їх при 35 °С 4-5 днів, і додають завись еритроцитів гвінейських свинків. Після інкубації протягом 20 хв при температурі 37 °С читають результати. При нейтралізації сироваткою вірусів парагрипу не спостерігається адсорбції еритроцитів на поверхні клітин.

Серологічна діагностика проводиться з парними сироватками хворого, які одержують відповідно на початку захворювання і двома тижнями пізніше. Протягом цього часу першу сироватку зберігають у холодильнику в замороженому стані. Чотирикратний приріст титру антитіл визначають паралельно у двох рядах пробірок, використовуючи стандартні методики постановки РГГА і РЗК.

Експрес-діагностика є достатньо інформативним методом, який дозволяє визначити віруси в досліджуваному матеріалі. З цією метою частину матеріалу, який було отримано для вірусологічної діагностики, центрифугують 5-7 хв при 1000 об/хв. Отриманий осад ресуспензують у 3-5 краплях надосадової рідини і готують з нього мазки. Їх обробляють імунофлуоресцентними сироватками і досліджують у люмінесцентному мікроскопі.

Спостерігаються циліндричні або полігональні клітини і заокругленої форми лейкоцити. За умови наявності вірусів у клітинах з'являється характерне зелене світіння цитоплазми окремих клітин, у той час як клітини, що не містять вірусів, мають цегляно-червоний колір. Оцінити достовірність результатів дозволяє вивчення контрольних препаратів.

До супернатанту, що залишився, додають пеніцилін і стрептоміцин в концентрації 500 ОД/мл. Через 30 хв інкубації при температурі 18-20 °С матеріалом заражають культури клітин, які вирощуються заздалегідь на стерильних предметних скельцях, вміщених у пробірки. Культивують віруси у такому стані 24-72 год при температурі 35 °С, а потім скельця з культурою клітин промивають стерильним буферним розчином і висушують. Для фіксування використовують охолоджений до -20 °С ацетон (10-20 хв при кімнатній температурі), пізніше скельця висушують і обробляють специфічними імунофлуоресцентними сироватками (пряма або непряма реакція імунофлуоресценції).

Визначити незначну кількість вірусів у будь-якому досліджуваному матеріалі можна, використовуючи методи генетичної діагностики, і, зокрема, полімеразну ланцюгову реакцію.

Епідемічний паротит

Під електронним мікроскопом паротитний віріон має неправильну куполоподібну форму діаметром 150-170 нм. Збудник паротиту добре культивується в курячих ембріонах, а також у клітинах HeLa та ниркового епітелію ембріона людини. Віруси мають виражені гемаглютинуючі, нейрамінідазні й гемолітичні властивості. Вони нестійкі до дії фізичних і хімічних факторів, швидко інактивуються ефіром, трипсином, формаліном, ультрафіолетовими променями. Резистентні до висушування, не втрачають інфекційних властивостей при 4 °С протягом 2 міс., при кімнатній температурі – 4 дні. При 55 °С гинуть через 20 хв.

Вірусологічна діагностика. Для дослідження від хворого беруть слину, спинномозкову рідину (при підозрі на менінгіт, менінгоенцефаліт), сечу. Забір матеріалу краще проводити в перші дні захворювання. Для знищення сторонньої мікрофлори отриманий матеріал обробляють сумішшю пеніциліну і стрептоміцину в концентрації 500-1000 ОД/мл. Спочатку його центрифугують при 1500 об/хв, потім супернатант підлягає повторному центрифугуванню при 40000 об/хв протягом 1,5 год. Для подальших досліджень використовують осад, попередньо ресуспензований в розчині Хенкса.

Щоб виділити з нього вірус, осад вводять в амніотичну порожнину 7-8-денних курячих ембріонів. Ембріони інкубують при температурі 35 °С протягом 6-7 днів. Щоб довести наявність вірусу в матеріалі, використовують РГА з 1 % суспензією еритроцитів курей. Можна використати як досліджуваний об'єкт освітлену 20 % суспензію амніотичних оболонок, оскільки при декількох пасажах вірусів у алантоїсній рідині їх гемаглютинуючий титр зростає.

Іншим методом виділення вірусів є зараження культур клітин. Найчастіше використовують клітини нирок мавп, ембріону людини, перещеплювані лінії Vero, ВНК-21. Довести наявність вірусів можна за допомогою оцінки цитопатичної дії, РГА та РГА_{алс}. Для постановки останньої до інфікованої культури клітин додають 0,4 % суспензію еритроцитів курей або гвінейських свинків. Систему витримують до 5 хв при температурі 18-20 °С, відмивають вільні еритроцити і спостерігають під мікроскопом явище адсорбції останніх на поверхні заражених клітин.

Для ідентифікації збудників використовують РЗК, РГГА, а при використанні культур клітин – РН. Можна використати з цією метою метод антитіл, які флуоресцують. Як діагностичні препарати використовують сироватки імунізованих тварин або людей, які перехворіли на епідемічний паротит.

Серологічна діагностика. З цією метою досліджують парні сироватки для виявлення приросту титру антитіл проти вірусів епідемічного паротиту в РГГА, РЗК, РН, РГГ_{алс}. Як антиген використовують стандартний діагностикум із збудників або антигени, які одержують із амніотичної чи алантоїсної рідини заражених курячих ембріонів. Діагностичним вважається чотирикратний приріст титру антитіл у другій сироватці в порівнянні з першою. Як правило, титри антитіл у другій сироватці при використанні РГГА сягають 1:320, а при РЗК – 1:64.

Експрес-діагностика. Довести наявності вірусів у слині, сечі чи спинномозковій рідині можна при використанні методу антитіл, які флуорескують. Найчастіше використовують метод непрямой імунофлуоресценції.

Останнім часом у спеціалізованих вірусологічних лабораторіях використовують полімеразну ланцюгову реакцію для виявлення вірусної нуклеотидної кислоти у досліджуваному матеріалі.

Кір

Зрілий віріон кору має овальну форму діаметром 120-250 нм. У середині містить одностричкову “мінус”-нитку несеgmentованої РНК. Суперкапсидна оболонка має вирости (шипики). Вірусні структурні компоненти представлено гемаглютиніном, F1- і F2-білками, нуклеокапсидним та М-протеїном, а також білком полімеразного комплексу. На відміну від інших парамікосвірусів, не містить нейрамінідази, однак має гемаглютинін, який спричиняє аглютинацію еритроцитів мавп. Репродукується в первинно-трипсинізованих культурах клітин ниркового епітелію, HeLa, HEp-2, Vero, погано культивується в курячих ембріонах. У культурах клітин викликає цитопатичну дію у вигляді симпластів. Існує лише один антигенний тип вірусу. Він нестійкий до дії факторів зовнішнього середовища, при кімнатній температурі гине через кілька годин, але вірулентність втрачає через 30 хв. Чутливий до дії високих температур, ультрафіолетового опромінення, добре зберігається в замороженому стані.

Вірусологічна діагностика. Найчастіше кір діагностують на підставі клінічної симптоматики, спостерігаючи етапи появи висипань, появу плям Бельського-Філатова-Копліка на слизовій оболонці щік тощо.

Лабораторна діагностика проводиться рідко. Методи виділення та ідентифікації вірусів у звичайній лабораторній практиці не застосовують, хоча знайти вірус у досліджуваному матеріалі можна за 2-3 дні до появи висипань. Проте, як досліджуваний матеріал для виділення вірусів, можуть бути використані змиви з носової частини глотки, виділення з кон'юнктиви, сеча, кров, спинномозкова рідина, а також секційний матеріал. Після відповідної підготовки (додавання пеніциліну і стрептоміцину, в разі потреби центрифугування тощо) матеріалом заражають первинно-трипсинізовані культури клітин ембріона людини, нирок мавп або перещеплювані лінії HeLa, HEp-2 та інші. Культури клітин підлягають спостереженню протягом 30 діб. Одним з критеріїв наявності вірусів у матеріалі є поява цитопатичної дії, що проявляється утворенням синцитіїв і злиттям клітин. Типувати віруси можна, використовуючи метод імунофлуоресценції, РГГ_{алс}, РН у культурі клітин за феноменом гемадсорбції, ІФА.

Серологічна діагностика кору використовується в лабораторній практиці значно частіше. Дослідженню підлягають парні сироватки хворих. Віруснейтралізуючі, антигемаглютинуючі та комплементзв'язуючі антитіла виявляють в крові досить рано. Часто вони досягають високих титрів разом з появою висипань. Першу сироватку беруть у перші дні захворювання, другу – через 12-14 днів. Ставлять реакції паралельно в двох рядах пробірок.

Для спостереження за динамікою зростання титру антитіл використовують РН, РГГА, РНГА, РЗК. Для постановки РГГА використовують еритроцити приматів. РНГА є однією з найдоступніших у лабораторній практиці. Позитивними вважають ті реакції, які довели чотирикратне зростання титру антитіл.

Експрес-діагностика. Як і при більшості інших вірусних захворювань, метод флуоресцюючих антитіл дозволяє швидко визначити вірус в епітеліальних клітинах носоглоткових змивів, осаді сечі, лейкоцитах крові, секційному матеріалі (мозок) тощо. Антигени, що локалізуються в цитоплазмі, світяться в ультрафіолетових променях люмінесцентного мікроскопа при обробці специфічними сироватками, міченими флуорохромами.

Полімеразна ланцюгова реакція надає можливість швидко визначити нуклеїнову кислоту віріонів кору безпосередньо в досліджуваному матеріалі.

Респіраторно-синцитіальні інфекції

РС-віруси належать до роду *Pneumovirus*. У центрі віріона розташована одониткова “мінус”-нитка несеgmentованої РНК. Вона вкрита капсидною та суперкапсидною оболонками. На поверхні вірусу розташовується F-білок (білок злиття), який забезпечує проникнення вірусів у чутливі клітини. Поверхня віріонів вкрита особливими виростами (шипиками), які складаються з глікопротеїдів. Структурні білки вірусів представлено 8 поліпептидами: N, P, L, M, M2, F, G, SH4. Віруси не мають гемаглютинуючої та нейрамінідазної, проте проявляють частково гемолітичну та гемадсорбуючу активність. Виділяють два підтипи респіраторно-синцитіальних вірусів, які диференціюються за допомогою серологічних реакцій.

Віруси культивують у культурах клітин, одержаних із тканин мавп, великої рогатої худоби, людини, перещеплених клітинах Vero, HEp-2 та ін.

РС-віруси мають досить високу чутливість до дії факторів зовнішнього середовища, таких як температура, ультрафіолетове опромінення, різноманітні жиророзчинники, детергенти, дезінфектанти тощо. Тривалий час може зберігатись при температурі -70°C .

Вірусологічна діагностика. Досліджуваним матеріалом для виділення вірусів є виділення з носоглотки, слиз з ділянки голосової щілини, мазки із порожнини носа, ротоглотки, біоптати, секційний матеріал (шматочки трахеї, бронхів) та ін. Враховуючи, що вірус надзвичайно чутливий до дії факторів довкілля, бажано проводити зараження культур клітин біля ліжка хворого або матеріал перед транспортуванням у вірусологічну лабораторію заморожується до -70°C .

Використовуються 3-4-денні перещеплені лінії культур HeLa, HEp-2, KB, Vero та ін. Через 3-7 днів визначають наявність вірусів у клітинах і проводять їх ідентифікацію. Візуально під мікроскопом можна виявити багатоядерні клітини (синцитій) з цитоплазматичними включеннями. За декілька днів спостерігають їх деструкцію та відшарування від скла. Ідентифікують віруси за допомогою РН, РЗК, методу імунофлуоресценції, ІФА.

Серологічна діагностика. З цією метою досліджують парні сироватки хворого на наявність антитіл. Діагноз підтверджує чотирикратне зростання титру антитіл у другій сироватці порівняно з першою. РН і РЗК, РНГА, ІФА найчастіше використовують для ретроспективної діагностики. РЗК ставлять на холоді. Запропоновано також нові варіанти РН – у присутності комплементу, мікрометод, реакція пригнічення бляшкоутворення під агаровим покриттям. Діагностиком для цих реакцій готують, заражаючи респіраторно-синцитіальним вірусом стандартні культури клітин. У пробірки вносять, як правило, по 100 ЦПД₅₀.

Експрес-діагностика. Віруси (специфічний антиген) можна знайти в епітеліальних клітинах носових ходів, ротоглотки тощо. Після обробки його імунофлуоресцентною сироваткою спостерігають характерне світіння поліморфних включень у цитоплазмі або всієї цитоплазми клітини. Може бути використаний непрямий метод ензиммічених антитіл, РІА, РЗНГА, а також генетичні методи діагностики.

Ентеровірусні інфекції

Ентеровіруси людини входять до родини *Picornaviridae*, яка нараховує понад 70 представників: 3 серотипи поліовірусу, 29 серотипів вірусів Коксакі, 32 серотипи вірусів ЕСНО і 4 ентеровіруси 68-71-го серотипів. Сюди віднесено також і вірус гепатиту А, який часто називають ентеровірусом 72-го серотипу.

Для лабораторної діагностики ентеровірусних інфекцій використовують вірусологічні, серологічні та експрес-методи. Останнім часом різко знизилась захворюваність на поліомієліт і зросла кількість поліомієлітоподібних захворювань, які викликають віруси Коксакі, ЕСНО. Отже, вірусологічні дослідження необхідно проводити одночасно на виявлення всіх ентеровірусів.

Матеріалом для дослідження служать випорожнення хворих протягом першого тижня, змиви з носоглотки не пізніше третього дня, кров, ліквор, сеча не пізніше п'ятого дня, сироватка крові в перший і 14 дні; в разі смерті – шматочки мозку, внутрішніх органів, лімфовузли.

Випорожнення беруть у пеніцилінові флакони, емульгують у розчині Хенкса, центрифугують і додають ефір та антибіотики. Змиви з носоглотки отримують шляхом двократного полоскання горла стерильним ізотонічним розчином хлориду натрію, освітлюють центрифугуванням і обробляють ефіром та антибіотиками. Середню порцію сечі (10 мл) також обробляють пеніциліном і стрептоміцином.

Кров та ліквор використовують для вірусологічних досліджень без попередньої обробки. Секційний матеріал емульгують у стерильних ступках з піском, готують 20 % суспензію в розчині Хенкса, центрифугують і додають антибіотики

Вірусологічні дослідження. Виділення та ідентифікація ентеровірусів є основним методом лабораторної діагностики. Для цього використовують різноманітні культури клітин та лабораторних тварин. Оброблений, як вище зазначено, клінічний матеріал інокулюють у 2-3 види перещеплених і первинних культур клітин. Наприклад, для виділення всіх 3-ох типів вірусу поліомієліту використовують пер-

винні культури клітин нирок мавп і перещеплювані клітини HeLa, Vero, HEp-2. Віруси Коксаки В, ЕСНО успішно виділяють на клітинах ниркового епітелію мавп та на багатьох клітинах людського походження (RH, HeLa, HEp-2 та інші). Виділення вірусів Коксаки А здійснюється на культурі клітин RD.

При розмноженні ентеровірусів у культурі клітин мікроскопічно виявляють цитопатичну дію. Інфіковані клітини зморщуються, стають маленькими, круглими, в їх ядрах виникає пікноз. Пізніше клітини повністю руйнуються і відпадають від стінки флакона. Такі зміни викликає вірус поліомієліту, більшість серотипів вірусів Коксаки В, ЕСНО, деякі серотипи вірусів Коксаки А. В клітинах амніону людини, епітелію нирок, диплоїдних клітинах W1-38 та RD добре репродукуються віруси Коксаки А та окремі серотипи вірусів ЕСНО.

Віруси Коксаки А і В успішно виділяють із досліджуваного матеріалу шляхом зараження одноденних мишей-сисунців у мозок (0,01 мл), під шкіру (0,03 мл) або в черевну порожнину (0,05 мл). За інфікованими мишами ведуть спостереження протягом 14 днів. При наявності в матеріалі вірусів Коксаки А на 2-5 день у тварин проявляються збудження, тремор, парези і паралічі м'язів спини і кінцівок. При Коксаки В-інфекції на 4-9 день у новонароджених мишей виникають спастичні паралічі. З тканин і органів тварин, що загинули, готують вірусмістку суспензію для подальших досліджень. При гістологічному дослідженні виявляють дегенеративні зміни в ЦНС, печінці, підшлунковій залозі та міокарді.

Індикацію ентеровірусів проводять також за цитопатичною дією в культурі клітин або за бляшкоутворенням під агаровим чи бентонітовим покриттям, а також за розвитком паралічу і загибеллю тварин.

Для їх ідентифікації використовують імуноферментний аналіз, реакцію гальмування гемаглютинації, імунофлуоресценції та РЗК. Реакцію нейтралізації на моделі клітин проводять як вище описано.

Необхідно враховувати, що при масовій імунізації дітей живою поліомієлітною вакциною можливе виділення вакцинних штамів. Отже, необхідно встановлювати походження виділених вірусів.

Виявлення ентеровірусів і визначення видів та серотипів найефективніше і найшвидше можна провести за допомогою полімеразної ланцюгової реакції.

Серологічні дослідження. Методом парних сироваток ставлять кольорову пробу, реакцію нейтралізації з пригніченням цитопатичної дії, бляшкоутворення, РЗК, РНГА з еритроцитарними діагностикумами. Кольорову реакцію раніше часто ставили при серологічній діагностиці поліомієліту. Вона базується на здатності вірусу пригнічувати обмінні процеси в інфікованих культурах клітин в результаті чого зберігається вихідний колір середовища (малиновий).

Антитіла сироватки крові хворих нейтралізують вірус і метаболізм клітин продовжується. Це призводить до нагромадження кислих продуктів у системі, які змінюють РН середовища і воно набуває жовтого кольору. Наводимо схему постановки кольорової реакції при серологічній діагностиці поліомієліту (табл. 73).

Результати реакції враховують візуально на 5-7 добу шляхом порівняння кольору середовища в дослідних і контрольних пробірках. Титром сироватки вва-

Таблиця 73

Схема титрування антитіл за допомогою кольорової проби

Компоненти	Пробірки						
	1	2	3	4	5	6	7
Живильне середовище, мл	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Сироватка хворого 1:5, мл:							
I (1-ий ряд)	0,5	→	→	→	↓	–	0,5
II (2-ий ряд)	0,5	→	→	→	↓	–	0,5
Розведення сироваток	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	–	–
Поліовірус певного типу, 100 ЦПД ₅₀ /мл	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	–
Інкубування 30 хв при 18-20 °С							
Завись клітин HeLa з індикатором, 40000 кл/мл	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Інкубування 5-7 діб при 37 °С							
Результати:							
перша сироватка							
друга сироватка							

жають її найбільше розведення, при якому відбулась нейтралізація вірусу (остання пробірка з культурою клітин, де середовище жовтого кольору). Діагностичне значення має наростання титру антитіл у другій сироватці не менше, ніж у 4 рази в порівнянні з першою сироваткою.

Експрес-методи лабораторної діагностики ентеровірусних інфекцій не знайшли широкого застосування із-за особливостей їх патогенезу. Можливе використання реакції непрямой гемаглютинації з еритроцитарним поліовірусним діагностиком та непрямой реакції імунофлуоресценції. Для постановки останньої використовують імунну діагностичну антивидову сироватку, виснажену гомологічними клітинами крові, амніону, фібробластами. Така сироватка реагує лише з вірусним антигеном, що знаходиться всередині клітин досліджуваного матеріалу.

Останнім часом для експрес-діагностики використовують каріологічний аналіз, оснований на виявленні характерних змін в структурі ядер клітин клінічного матеріалу, взятого у перші дні захворювання. Мікроскопують мазки з осаду після центрифугування змивів з носоглотки і сечі та мазки-відбитки з органів, які взяті при автопсії. Їх фіксують у холодному ацетоні, забарвлюють гематоксиліном. Специфічним для ентеровірусних інфекцій є виявлення в препаратах зміщення хроматину до периферії ядра і утворення яскраво-фіолетових тілець, що нагадують півмісяць. Це дає змогу дати попередню відповідь про репродукцію ентеровірусів у досліджуваному матеріалі.

Диференціацію даних та агенуїзованих поліовірусних штамів здійснюють за допомогою ПЛР, ІФА, РН з моноклональними антитілами. Для поліовірусів I типу використовується бентонітовий тест (вірулентні поліовіруси мають характеристики $A_{\text{бент}}^-$, а авірулентні – $A_{\text{бент}}^+$).

Ротавірусні гастроентерити

У високорозвинених країнах понад 60 % гострих гастроентеритів викликають віруси з родини *Reoviridae*. Серед них домінують ротавіруси. Рід *Rotavirus* включає ротавіруси людини і віруси, що викликають діареї у тварин. Останні для людини непатогенні. Ротавіруси людини викликають, в основному, гастроентерити у дітей до трьох років і людей похилого віку. Збудник передається фекально-оральним способом при побутових контактах. Висока стійкість вірусів у зовнішньому середовищі сприяє розвитку спалахів гастроентеритів особливо в зимовий період (до 90 %). За білковими антигенами ротавіруси поділяють на 4 сероваріанти.

Матеріалом для лабораторної діагностики служать випорожнення і кров. Проби калу беруть у перші години і дні хвороби у стерильні пеніцилінові флакони і направляють до вірусологічної лабораторії в контейнерах із льодом. Готують 10-20 % суспензію в розчині Хенкса, центрифугують 30 хв при 3000 об/хв. Центрифугат переносять у стерильний флакон, додають фреон 113 або 1000 ОД/мл пеніциліну і 500 ОД/мл стрептоміцину, вміщують у холодильник на 10-12 год. Кров для серологічних реакцій беруть у перші 2-3 дні хвороби і через 12-14 днів.

Лабораторна діагностика ротавірусних діарей ґрунтується на швидкому виявленні вірусів у випорожненнях за допомогою електронної та імунної електронної мікроскопії, реакції непрямой гемаглютинації з антитільним еритроцитарним ротавірусним діагностиком. Використовують також імуноферментний аналіз у твердофазному варіанті, реакцію коагулінації, метод клонуваних РНК-зондів і полімеразну ланцюгову реакцію.

У перші дні хвороби вміст ротавірусів у копроматеріалах досягає 10^6 - 10^8 в 1 г, тому їх виявлення при прямій електронній мікроскопії можливе без додаткової концентрації. Краплю досліджуваного матеріалу наносять на спеціальні плівки з нітроцелюлози і мікроскопують при збільшенні 50000.

Метод чутливий і надійний, дає змогу швидко виявити вірус і дослідити його морфологію. При виявленні 5-6 віріонів практично у кожному полі зору можна достовірно підтвердити діагноз ротавірусного гастроентериту.

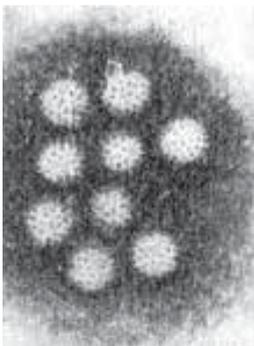


Рис. 89. Ротавіруси у фекаліях хворого.

Ще більше діагностичне значення має метод імуноелектронної мікроскопії. Принцип її полягає в тому, що імунну противірусну сироватку додають до освітленої низькошвидкісним центрифугуванням суспензії фекалій, витримують 60 хв при кімнатній температурі і ще 12 год при 4 °С, потім центрифугують при 15000 об/хв для осадження вірусних частинок та імунних комплексів. Осад ресуспензують у 2-3 краплях дистильованої води, контрастують у фосфорно-вольфрамовій кислоті і досліджують під електронним мікроскопом. У препаратах виявляють характерні скупчення ротавірусів (рис. 89). Висока ефективність методу практично не залежить від вихідної концентрації вірусів у досліджуваних пробах.

Вірусологічні дослідження з метою виділення ротавірусів у культурах клітин або на лабораторних тваринах у рутинних вірусологічних лабораторіях не проводять.

Найбільш широко в діагностиці ротавірусних гастроентеритів використовують імуноферментний аналіз. Принцип його полягає в тому, що лунки полістиролових планшет спочатку сенсibilізують антитілами проти ротавірусів, а потім додають у них освітлену суспензію фекалій, інкубують 1 год в термостаті. Утворений в лунках комплекс антиген-антитіло після трикратного промивання фосфатним буфером виявляють внесенням антиглобулінової сироватки, кон'югованої з ферментом. Після інкубації в термостаті додають хромогенний субстрат до появи забарвленого продукту реакції. Облік результатів проводять за допомогою імуноферментного аналізатора.

У невеликих лабораторіях досить часто проводять реакцію оберненої непрямой гемаглютинації з використанням антитільного ротавірусного еритроцитарного діагностикому. Вона проста за методикою постановки, хоч і менш чутлива в порівнянні з реакцією ензиммічених антитіл.

У практику лабораторної діагностики ротавірусних інфекцій впроваджують також тест коагулінації для індикації ротавірусного антигену у випорожненнях хворих. На предметне скло наносять краплю зависі стафілококів (штам Cowan 1), сенсibilізованих ротавірусною сироваткою, і додають краплю освітленого центрифугуванням копроматеріалу. При наявності ротавірусів через 30-60 с виникає аглюїнація навантажених антитілами стафілококів.

Дуже чутливим способом швидкої діагностики ротавірусних гастроентеритів є метод виявлення вірусоспецифічної РНК за допомогою молекулярної гібридизації. Він заснований на гібридизації мічених РНК-зондів, фіксованих на нітроцелюльозних фільтрах. Мічення здійснюють біотином або ферментом, що значно спрощує і здешевлює метод у порівнянні з радіоізотопними мітками.

Аналіз ротавірусної РНК, не зважаючи на його дорожнечу, все ширше впроваджується в практику, особливо після розробки методу полімеразної ланцюгової реакції. Остання є найчутливішим і специфічним методом діагностики, який, безумовно, є діагностичним тестом нового покоління, так званім "золотим стандартом". Однак постановка цієї реакції все ще вимагає високої кваліфікації дослідника, дорогих реактивів і складної апаратури.

Серологічна діагностика спрямована на виявлення специфічних антитіл у парних сироватках, взятих з двотижневим інтервалом. Для цієї мети використовують різноманітні нейтралізаційні або преципітаційні тести та непрямую реакцію імунофлуоресценції. Але останнім часом найширше застосовують імуноферментний аналіз.

Раніше для серодіагностики широко ставили РЗК з використанням в якості антигену заздалегідь відібрані фекалії хворих на гастроентерит або ротавіруси телят. Але за своєю чутливістю і специфічністю вона значно поступається методу імуноферментного аналізу. Для виявлення специфічних антитіл до ротавірусів ставлять також реакцію гальмування непрямой гемаглютинації з парними сироватками.

Гастроентерити у дітей можуть також викликати каліцівіруси, астровіруси і віруси Норволк. Всі вони виділяються з випорожненнями в перші 2-3 дні захворювання, не розмножуються в культурах клітин або слабо репродукуються без цитопатичної дії. Для лабораторної діагностики гастроентеритів, викликаних даними вірусами, використовують, в основному, метод імунної електронної мікроскопії. Інших методів діагностики, доступних для вірусологічних лабораторій, поки що немає.

Герпесвірусні інфекції

Віруси родини *Herpesviridae* поділяються на три підродини: *Alphaherpesvirinae* (викликають простий оперізуючий герпес та вітряну віспу), *Betaherpesvirinae* (спричиняє цитомегалію), *Gammapherpesvirinae* (асоціюється з лімфомаю Беркітта, назофарингеальною карциномаю). Всього в родині нараховують біля 50 вірусів.

Простий герпес

Захворювання має декілька клінічних форм, але найчастіше вірус персистує в організмі, і хвороба має безсимптомний перебіг. Звичайні клінічні прояви – везикулярна висипка на шкірі і слизових оболонках, рідко виникає менінгоенцефаліт, кератит і генералізована форма у новонароджених. Вірус герпесу 1-го типу проникає в організм ще в ранньому дитинстві й постійно персистує у 70-90 % дорослих людей. Передається контактним шляхом через слину, посуд, побутові речі. Вірус 2-го типу передається статевим шляхом і викликає генітальний герпес.

Лабораторна діагностика включає проведення вірусоскопічних, прискорених, вірусологічних і серологічних методів. Залежно від клінічних проявів матеріалом для дослідження служать слина, вміст пухирців, кірочки, ліквор, мазки з виразок на слизовій оболонці рота, статевих органів, рогівки; при автопсії – шматочки головного і спинного мозку та паренхіматозних органів. Взятий матеріал найкраще зберігати в 10 % сироватці при температурі – 70 °С.

Мікроскопія. Зскрібки, мазки, пухирцевий вміст після негайної фіксації в суміші Никифорова забарвлюють за методом Романовського-Гімзи і досліджують під імерсійним об'єктивом на наявність гігантських багатоядерних клітин з характерними внутрішньоядерними включеннями (тільця Каудрі).

Для **експрес-діагностики** використовують електронну мікроскопію, реакцію імунофлуоресценції, імуноферментний аналіз, генетичну діагностику. Під електронним мікроскопом досліджують вміст пухирців, рідку фракцію кірок після їх гомогенізації в дистильованій воді, змиви з елементів висипу. Виявлення 2-3 віріонів з типовою морфологією цілком достатньо для встановлення діагнозу (рис. 90). Швидке виявлення герпетичного антигену можливе в реакції імунофлуоресценції. Мазки з пухирцевої рідини, виразок на рогівці або осаду з ліквору фіксують і обробляють протигерпетичною флуоресцентною сироваткою. Антиген знаходять у цитоплазмі та ядрах уражених клітин за характерним золотаво-зеленим

світінням. Вірусспецифічний антиген у досліджуваному матеріалі легко виявляють за допомогою імуноферментного аналізу, чутливість і специфічність якого може сягати 95-96 %.

Виділення герпесвірусів. Ізоляцію вірусів проводять шляхом інокуляції досліджуваного матеріалу в культури клітин ниркового епітелію кроля, курячого ембріона, амніона людини, HeLa та ін., або зараженням мишей-сисунців, хом'ячків, кроликів, курячих ембріонів.

Репродукція вірусів у культурах клітин настає через 4-7 днів. Вона супроводжується розвитком цитопатичних змін, утворенням гігантських багатоядерних клітин та синцитію.

У мишей виникають паралічі і смерть, у кроликів через 2-5 днів спостерігають кератит, у хом'ячків захворювання закінчується летально. На хоріоналантаїсній оболонці курячих ембріонів через 48 годин з'являються опуклі непрозорі бляшки.

Виділені штами вірусів ідентифікують за допомогою стандартних протигерпетичних сироваток у тестах нейтралізації на культурах клітин, лабораторних тваринах або курячих ембріонах.

Серологічну діагностику проводять шляхом постановки реакції непрямой гемаглютинації, імунофлуоресценції та імуноферментного аналізу обов'язково методом парних сироваток. Діагностичне значення має наростання титру антитіл у 4 рази і більше. Серологічна діагностика простого герпесу значною мірою утруднена із-за широкої циркуляції вірусів серед населення і наявності спільних антигенів у 1-го і 2-го сероваріантів герпетичних вірусів. При первинному захворюванні на простий герпес певне діагностичне значення має постановка РЗК для виявлення комплементзв'язуючих антитіл. Особливо важливе значення при цьому набуває визначення Ig M.

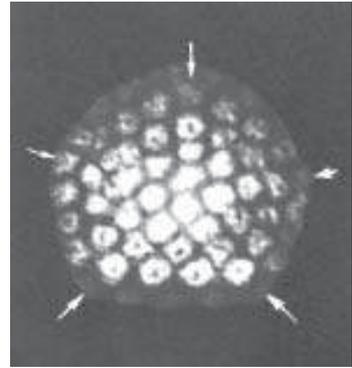


Рис. 90. Вірус герпесу.

Вітряна віспа – оперізуючий герпес

Збудник вітряної віспи й оперізуючого герпесу належить до роду *Varicellovirus* і є двома варіантами одного і того самого вірусу. За морфологічними, біологічними властивостями вони ідентичні до вірусів простого герпесу, але не репродукуються в організмі лабораторних тварин. Той самий вірус у дітей до 10 років викликає вітряну віспу – сильнозаразне, але легке захворювання. У дорослих (і дуже рідко у дітей) він викликає оперізуючий герпес (герпес зостер). Розпізнавання цих захворювань, як правило, проводять на основі характерних клінічних симптомів та епідеміологічних даних. Значно рідше використовують вірусологічні або серологічні дослідження.

Лабораторна діагностика. Найбільш цінним матеріалом для виділення вірусів є вміст пухирців (везикул). Забирають також зскрібки з папул, кірочки,

виділення з носоглотки, кров для постановки серологічних реакцій. Лабораторні дослідження проводять так само, як і при простому герпесі, але необхідно враховувати, що віруси вітряної віспи і оперізуючого герпесу не вражають клітин курячого ембріону, нервових клітин мишей, рогівки кролів. У культурах клітин вони розвиваються значно повільніше (3-5 днів) у порівнянні з вірусом простого герпесу (18-24 год).

Експрес-методи базуються на виявленні вірусспецифічних антигенів у мазках і відбитках за допомогою реакції непрямой імуофлуоресценції. Використовують антивидову сироватку проти імуноглобулінів людини, мічену ФІТЦ. Специфічне світіння проявляється в цитоплазмі і ядрах уражених клітин. Герпесвірусні антигени можна виявити і за допомогою імунодифузії в гелі з відповідними преципітуючими сироватками. При наявності діагностичних тест-систем і відповідної апаратури можна використати полімеразну ланцюгову реакцію.

Виділення вірусів проводять на первинних і перещеплених культурах клітин щитоподібної залози людини, фібробластів, ниркового епітелію, амніона людини тощо. Цитопатична дія носить острівковий характер, розвивається повільно і супроводжується утворенням багатоядерних клітин з характерними включеннями.

Ідентифікацію виділених вірусів проводять в реакціях нейтралізації, зв'язування комплекменту і непрямой імуофлуоресценції.

Серологічна діагностика проводиться на основі постановки реакції зв'язування комплекменту, нейтралізації, непрямой імуофлуоресценції з парними сироватками хворих. Необхідною умовою для постановки діагнозу є 4-кратне збільшення титру антитіл. Останнім часом для серологічної діагностики частіше використовують імуоферментний аналіз.

Цитомегалія

Цитомегаловірус подібний до інших видів герпесвірусів, але відрізняється більш тривалою репродукцією всередині клітини. Він викликає захворювання, що характеризується ураженням слинних залоз та інших органів з утворенням в їх тканинах гігантських клітин з крупними внутрішньоядерними включеннями.

Діагноз цитомегалії встановлюють на основі проведення цитологічних, вірусологічних і серологічних досліджень. Матеріалом для дослідження служать слина, осад сечі, ліквор, пунктати лімфатичних вузлів, печінки, а також лейкоцити крові. Найхарактерніша ознака цитомегалії – поява гігантських клітин з ядерними включеннями розміром від 8 до 20 мкм.

Виділення вірусів проводять шляхом інокуляції досліджуваного матеріалу в первинну культуру фібробластів шкіри та легеневиких клітин ембріона людини. Цитопатична дія виявляється через 2-3 тижні особливо у вторинних і третинних субкультурах у вигляді появи гігантських клітин, що мають внутрішньоядерні включення. При генералізованій формі хвороби цитомегаловірус проникає в лейкоцити крові, тому для його виділення краще брати лейкоцитарні культури клітин.

Ідентифікацію виділених вірусів, а також їх антигенні варіанти визначають у реакції нейтралізації з відповідними антисироватками. Титр вірусу встановлюють за допомогою бляшкоутворення або підрахунків фокусів уражених клітин методом імуофлуоресценції.

Серологічна діагностика. Для визначення титру сироваткових антитіл на початку захворювання і в період реконвалесценції використовують реакції зв'язування комплементу і нейтралізації цитопатичної дії вірусу або феномену бляшкоутворення. Метод флуоресцюючих антитіл застосовують як для визначення 4-кратного наростання титру антитіл, так і для виявлення концентрації Ig M. Для серологічної діагностики цитомегаловірусної інфекції більшість лабораторій починає широко застосовувати імуоферментний аналіз.

Аденовірусні інфекції

Родина *Adenoviridae* поділяється на два роди: *Mastadenovirus* – аденовіруси ссавців, у тому числі понад 40 сероваріантів, що викликають захворювання у людей, і *Aviadenovirus* – 14 сероваріантів, що спричиняють захворювання у птахів. Окремі серотипи (12, 18, 31) мають онкогенні властивості для деяких видів гризунів (сирійські хом'ячки). По відношенню до людини онкогенні властивості аденовірусів не проявляються.

Аденовірусні інфекції виникають переважно у дітей від 6 місяців до 5 років, особливо у холодні пори року. Для них характерний розвиток респіраторного, кон'юнктивального і кишечного синдромів. Найчастіше виникають тонзиліти, фарингіти, бронхіти, атипові пневмонії, риніти, катаральні і плівчасті кон'юнктивіти. Основні механізми зараження – повітряно-краплинний, контактно-побутовий, рідше – фекально-оральний.

Лабораторна діагностика. Більшість клінічних симптомів при аденовірусних інфекціях подібні до інших респіраторних захворювань як вірусної, так і бактеріальної етіології. У зв'язку з цим методи лабораторної діагностики мають винятково велике значення.

Залежно від клінічних проявів захворювання матеріалом для дослідження служать мазки і змиви з носоглотки, харкотиння, зіскрібки з кон'юнктиви, кров, ліквор, випорожнення. Матеріал потрібно взяти у перший тиждень хвороби, пересилати і зберігати у замороженому стані. Досліджують і секційний матеріал – шматочки трахеї, бронхів, легень, кишечника, лімфовузлів.

Експрес-діагностику здійснюють за допомогою реакцій імуофлуоресценції та ензиммічених антитіл з метою індикації групових антигенів аденовірусів у епітеліальних клітинах носоглотки та кон'юнктиви. При цьому виявляють характерні дрібнозернисті включення зелено-жовтого кольору в центральній частині ядер.

Кишкові аденовіруси, що викликають гастроентерити, виявляють у випорожненнях хворих за допомогою прямої та імуноної електронної мікроскопії (рис. 91), імуоферментного аналізу, ДНК-зондів і полімеразної ланцюгової реакції.

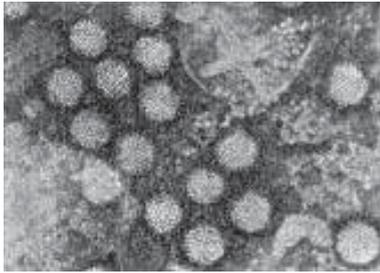


Рис. 91. Аденовіруси.

Виділення вірусів проводять на первинно-трипсинізованих і перещеплюваних культурах клітин (Hela, HEp-2, KB та ін.), які чутливі до всіх сероваріантів аденовірусів. У звичайних умовах курячі ембріони і лабораторні тварини практично нечутливі до аденовірусів людини, тому біологічну модель виділення вірусів для діагностики не використовують.

У культурах клітин віруси виявляють за їх цитопатичною дією під світловим мікроскопом.

Уражені клітини округлюються, скупчуються у вигляді грон, в їх цитоплазмі виникає зернистість. Більш точним методом виявлення цитопатичної дії є дослідження за допомогою люмінесцентного мікроскопа специфічних внутрішньоядерних включень у клітинах на покривних скельцях, забарвлених акридиновим оранжевим. Цей метод дозволяє через 1-2 доби виявити навіть поодинокі інфіковані клітини.

Ідентифікацію та типування виділених аденовірусів проводять за допомогою реакції нейтралізації в культурах клітин спочатку із сумішшю типоспецифічних сироваток, а потім і з кожною сироваткою тієї суміші, яка нейтралізувала цитопатичну дію. Останнім часом для типування аденовірусів широко застосовують реакцію гальмування гемаглютинації.

За здатністю аглютинувати еритроцити мавп і білих щурів аденовіруси поділили на 3 групи. До першої групи увійшли 9 сероваріантів (3, 7, 11, 14, 16, 20, 21, 25, 28), які аглютинують лише еритроцити мавп, до другої – 14 сероваріантів (8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 22, 23, 24, 26, 27, 29, 30), що викликають повну аглютинацію еритроцитів щурів, до третьої – 6 сероварів (1, 2, 4, 5, 6, 12), здатних лише частково аглютинувати еритроцити щурів. Спочатку за допомогою тесту гемаглютинації виділений аденовірус відносять до однієї з трьох груп, а потім в реакції гальмування гемаглютинації з типоспецифічними сироватками визначають серотип.

Серологічна діагностика аденовірусних інфекцій проводиться методом парних сироваток за допомогою РЗК та імуноферментного аналізу з будь-яким типом вірусів. Другу сироватку беруть на 18-20-й день захворювання. Діагностичне значення має наростання антитіл в 4 рази і більше. При оцінці результатів реакцій потрібно враховувати можливість наявності антитіл в результаті широкої циркуляції аденовірусів серед людей. У сироватці крові, взятій у перші дні захворювання, титр РЗК з аденовірусним антигеном складає 1:16. Особливо важливе значення має раннє виявлення в сироватці хворих IgM, що свідчить про гострий перебіг хвороби. Тепер це найчастіше проводять за допомогою імуноферментного аналізу.

Коронавірусні інфекції

До родини *Coronaviridae* входить 13 видів вірусів, два з яких – респіраторний і ентральний коронавіруси людини – мають високу вірулентність і здатні викликати захворювання.

Коронавіруси є дуже частими збудниками респіраторних захворювань у дорослих: профузного риніту, ринофарингіту, часто навіть без підвищення температури. У дітей основними симптомами є профузний нежить, кашель, гарячка, головний біль. Часто хвороба ускладнюється пневмонією. Клінічно коронавірусну інфекцію важко відрізнити від інших захворювань респіраторного тракту, тому лабораторні дослідження мають вирішальне значення.

Лабораторна діагностика. Матеріалом для дослідження служить слиз із носа і глотки, зібраний сухими ватними тампонами, які занурюють в ізотонічний розчин хлориду натрію з антибіотиками. Секційний матеріал (шматочки трахеї, бронхів, легень) збирають у фосфатний буфер з гліцериним. У разі виникнення гастроентериту досліджують випорожнення. Для серологічних реакцій використовують парні сироватки крові.

Експрес-методи діагностики проводять за допомогою реакції імунофлуоресценції. У цитоплазмі епітеліальних клітин із осаду змивів з носоглотки, оброблених люмінесцентними антисироватками, виявляють специфічні включення. При можливості використовують пряму та імунону електронну мікроскопію, за допомогою яких виявляють поодинокі віріони або їх скупчення з типовою для коронавірусів морфологією (віруси зовні покриті виступами грушоподібної форми, що нагадують корону сонця під час його затемнення). У препаратах з випорожнень коронавіруси знаходять за допомогою електронної мікроскопії та полімеразної ланцюгової реакції (рис. 92).

Виділення вірусів з діагностичною метою проводять дуже рідко, оскільки коронавіруси людини практично не репродукуються в курячих ембріонах і перещеплюваних культурах клітин. Найбільш чутливою системою для їх виділення є органна культура клітин трахеї ембріона людини. У пробірці з культурою вносять 0,1-0,2 мл досліджуваного матеріалу, обробленого антибіотиками. Рідко ставлять біологічну пробу на мишах-сисунцях. При інтрацеребральному зараженні у тварин виникає енцефаліт, від якого вони гинуть. У дорослих мишей коронавіруси спричиняють безсимптомну інфекцію.

Ідентифікують віруси шляхом визначення в інфікованих клітинах коронавірусного антигену методом імунофлуоресценції, імуноферментного аналізу або РЗК. Можна виявити типові за морфологією віріони і при електронній мікроскопії.

Серологічна діагностика коронавірусних інфекцій до сьогодні залишається основним методом їх розпізнавання. Для цього використовують визначення приросту антитіл у парних сироватках за допомогою реакцій гальмування гемаглютинації, зв'язування комплекменту та імуноферментного аналізу.

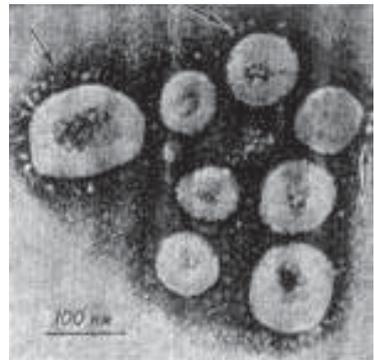


Рис. 92. Коронавіруси.

Сказ

Вірус сказу належить до роду *Lyssavirus* родини *Rhabdoviridae*, має характерну кулеподібну форму з одним плоским і другим заокругленим кінцем (рис. 92). Існують два варіанти вірусу – вуличний (дикий), що циркулює в природі серед тварин, і атенуйований – *Virus fixe*, отриманий Л. Пастером шляхом багатократних пасажів через мозок кроликів.

На сказ найчастіше хворіють собаки, вовки, лисиці, шакали, коти, рідше корови, скунси, койоти, кажани. Зараження людини відбувається через укуси хворих тварин і навіть при ослинненні ними подряпин шкіри чи слизових оболонок. Захворювання у людини завжди закінчується летально, основні методи діагностики сказу є посмертними, хоч розроблені й деякі прижиттєві тести.

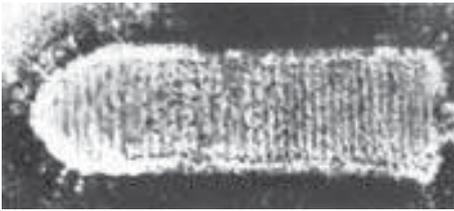


Рис. 92. Вірус сказу.

Лабораторна діагностика базується на використанні вірусоскопічного, біологічного і серологічного методів. Матеріалом для дослідження служить мозок тварин і загиблих людей, слина, тканина слинних залоз, які направляють до лабораторії в стерильному посуді з гліцерином і обкладені льодом.

Метод флуоресцюючих антитіл – найбільш швидкий і точний метод лабораторної діагностики сказу. Для виявлення вірусного антигену в мазках-відбитках мозку, слинних залоз і рогівки ока (прижиттєвий тест) використовують пряму і непряму реакцію імунофлуоресценції. Мазки фіксують у холодному ацетоні протягом 8-10 год при температурі 4 °С і обробляють у вологій камері 30 хв антирабічним імуноглобуліном, міченим ФІТЦ, промивають фосфатним буфером, висушують і досліджують в люмінесцентному мікроскопі. Антигени вірусу спостерігають у вигляді зелених гранул різної форми і величини.

Виявлення тілець Бабеша-Негрі у мазках-відбитках, гістологічних зрізах мозку і тканини слинних залоз є також швидким методом діагностики сказу. З мозку загиблої людини чи тварини стерильними ножицями нарізають у поперечному напрямку шматочки товщиною 3-4 мм з довгастого мозку, амонowego рогу і мозочка. Предметне скло притискають до поверхні зрізу щоб отримати відбиток тканини. В препаратах, забарвлених за Муромцевим або Селлером, тілця мають різну величину (4-10 мм) округлої або овальної форми пурпурно-червоні, а цитоплазма і ядра нервових клітин мають синій колір. Гістологічні зрізи забарвлюють за Романовським-Гімзою, Манном або Туревичем. В одній клітині може бути одне або декілька тілець. Вони оточені чітко окресленою оболонкою і мають внутрішню структуру у вигляді базофільної зернистості, частіше розташовуються біля ядра (рис. 93).

Метод виявлення включень Бабеша-Негрі є досить специфічним для сказу, хоч він і менш чутливий, ніж метод флуоресцюючих антитіл. У тканині мозку собак тілця знаходять у 90-95 % випадків, а в людей, померлих від сказу – в 70 %.

Отже, відсутність тілець Бабеша-Негрі не виключає діагнозу сказу. У таких випадках необхідно використати й інші методи дослідження.

Біопроба на мишах. Біологічний метод застосовують для виділення вірусу сказу із тканин мозку, слинних залоз трупів та слини хворих людей і тварин (прижиттєвий тест). Найбільш придатними для зараження є миші-сисунці. Для постановки біопробы використовують 15-20 тварин. Зараження проводять під наркозом шляхом інтрацеребрального введення 0,03 мл суспензії досліджуваного матеріалу. Можна поставити біологічну пробу і на сірійських хом'ячках, заражуючи їх матеріалом внутрішньом'язово.

При наявності в досліджуваному матеріалі вірусу сказу у мишей виникає тремор м'язів, паралічі. У більшості випадків тварини гинуть протягом п'яти днів. Наявність рабічних вірусів у заражених і загиблих мишей необхідно підтвердити за допомогою прямої реакції імунофлуоресценції або виявлення тілець Бабеша-Негрі.

Ідентифікацію виявленого вірусу сказу проводять також за допомогою реакції нейтралізації на білих мишах.

Серологічні дослідження проводять для визначення поствакцинального імунітету. Антитіла проти вірусу сказу виявляють в реакціях нейтралізації, зв'язування комплексу, імунофлуоресценції. Найчутливішими є імуносорбентні реакції (радіоімунний та імуноферментний аналізи).

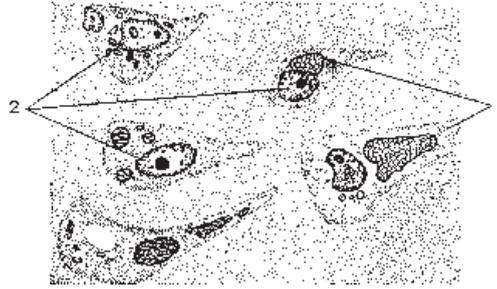


Рис. 93. Тільця Бабеша-Негрі: 1 – в нервових клітинах; 2 – ядра клітин.

Гарячки Марбург і Ебола

Збудники цих захворювань входять до роду *Filovirus* родини *Filoviridae*. Віруси мають ниткоподібну або циліндричну форму, часом нагадують рабдовіруси. Внутрішньоклітинні включення при репродукції цих вірусів дещо подібні до включень при сказі, тому раніше їх відносили до рабдовірусів.

Обидві хвороби ендемічні для деяких африканських країн (ЮАР, Кенія, Зимбабве), але останнім часом почали з'являтися і на території інших континентів. Початок захворювань гострий з гарячкою, висипом, ураженням печінки, нирковою недостатністю, профузним поносом. Летальність досягає 50-90 %.

Лабораторна діагностика гарячок Марбург і Ебола полягає в проведенні вірусологічних досліджень у добре оснащених лабораторіях з додержанням суворого режиму. Віруси виявляють у крові, сечі, геморагічному ексудаті зараженим досліджуваним матеріалом гвінейських свинок або культур клітин мавп. Крім того, проводять і пряму електронну мікроскопію патологічного матеріалу для виявлення вірусів. Розроблені і впроваджуються в практику імуноферментний метод і реакція імунофлуоресценції. В більш пізніх стадіях захворювання і в період реконвалесценції застосовують РЗК для виявлення комплексу зв'язуючих антитіл.

Арбовірусні інфекції

Арбовіруси – особлива група вірусів, що включає декілька родин: *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, *Arenaviridae*, *Rhabdoviridae* і *Reoviridae*. Вони здатні розмножуватись в організмі членистоногих (комарів, кліщів, москітів тощо) і передаватись хребетним через укуси.

Всі арбовіруси мають складну структуру віріона: містять РНК, капсид, зовнішню суперкапсидну ліпідомістку оболонку, а тому чутливі до дії органічних розчинників. Віруси нестійкі в середовищі і швидко втрачають свої патогенні властивості при підвищеній температурі, дії ультрафіолетового випромінювання. Вони мають виражені гемаглютинуючі властивості, особливо відносно гусячих еритроцитів.

Арбовіруси здатні зумовлювати в організмі патологічні процеси, що проявляються у вигляді гарячкових станів з болями в м'язах і суглобах або важких уражень мозкових оболонок і мозку – менінгоенцефалітів, чи у вигляді геморагічних гарячок з системним ураженням судин.

Природним резервуаром більшості арбовірусів є дрібні гризуни, дикі тварини і птахи, кліщі і комарі. Людина є випадковим господарем вірусу і лише на короткий проміжок часу потрапляє в ланцюг природної циркуляції вірусу.

Серед арбовірусних інфекцій в Україні найчастіше зустрічаються і найтяжче перебігають кліщовий енцефаліт і гарячка Західного Нілу. Досить часто зустрічаються геморагічна гарячка з нирковим синдромом і Кримська-Конго геморагічна гарячка.

Весняно-літній кліщовий енцефаліт

Вірус російського весняно-літнього енцефаліту має типову будову, властиву родині *Flaviviridae*. Віріони сферичної форми, діаметром 40-50 нм, містять однониткову нефрагментовану РНК, яка заключена в капсиді ікосаедричного типу симетрії. Капсид оточений суперкапсидною ліпідною оболонкою, на поверхні якої розміщені гемаглютиніни. До цієї родини входять також віруси японського енцефаліту, омської геморагічної гарячки, гарячок Денге і Західного Нілу та жовтої гарячки.

Природним резервуаром і переносником вірусу російського весняно-літнього енцефаліту є іксодові кліщі, в яких збудник передається трансваріально. Інфіковані кліщі, паразитуючи на гризунах, диких і свійських тваринах, заражують їх і включають у природний ланцюг циркуляції вірусу.

Людина заражується, потрапляючи у природне вогнище знаходження збудника. Зараження відбувається після укусів інфікованих кліщів або вживання сирого козячого чи коров'ячого молока.

Інкубаційний період триває від 2-х до 14 діб, іноді – до місяця. Вірус розповсюджується гематогенним і лімфогенним шляхами, проникаючи у центральну нервову систему, уражує рухливі нейрони передніх рогів шийного відділу спинного мозку, мозочок і мієлінову оболонку головного мозку.

Лабораторна діагностика. Враховуючи значну небезпеку при роботі з вірусним матеріалом, вірусологічні дослідження проводять виключно у спеціалізованих вірусологічних лабораторіях.

Матеріалом для вірусологічного дослідження в перші дні хвороби служить кров, спинномозкова рідина. Від трупів беруть тканину мозку і внутрішніх органів. Вірус також можна виділити з кліщів, мозку, паренхіматозних органів інфікованих тварин.

Для виявлення вірусу проводять внутрішньомозкове зараження вірусним матеріалом новонароджених мишенят, які гинуть через 6-7 днів, або заражають курячі ембріони. Крім того, для виділення вірусу використовують інфікування культур клітин Vero, KB, HEp-2, клітин нирок ембріона свині. Про наявність вірусу в клітинах свідчить цитопатичний ефект.

Вірус російського весняно-літнього енцефаліту ідентифікують у РН, латекс-аглютинації, РЗК, РГГА, дифузійної преципітації в гелі.

Останнім часом набули вирішального значення методи гібридизації і полімерна ланцюгова реакція, які дозволяють безпосередньо виявити вірус у кліщів і матеріалі від хворого.

Серологічна діагностика базується на дослідженні парних сироваток, взятих з інтервалом 2-3 тижні, за допомогою РН, РЗК, РНГА. Необхідно відзначити, що високою специфічністю відзначається РН на білих мишах або культурах клітин. Рівень антитіл у сироватці хворого корелює зі ступенем пригнічення цитопатичного ефекту або бляшкоутворення. Діагностичним титром вважається 1:10 і вище, що можна зареєструвати вже з 7-10 доби хвороби.

Значну діагностичну цінність має імуноферментний метод, який порівняно простий у виконанні, але дозволяє швидко одержати надійні результати.

Японський енцефаліт

Резервуаром вірусу японського енцефаліту в природі є дикі птахи, велика рогата худоба, коні, свині, гризуни. Переносник – комарі роду *Culex*. Захворювання розповсюджене на сході азіатського континенту: в Японії, Китаї, Кореї, Індії, Приморському краї Росії тощо.

Людина заражується через укуси інфікованого комара. Проникнувши в організм людини, вірус розмножується в нейронах центральної нервової системи, а також в клітинах паренхіматозних органів. При цьому досить часто уражуються ядра гіпоталамуса, стовбурової ділянки головного мозку і шийний відділ спинного мозку.

Лабораторна діагностика. При вірусологічному дослідженні збудник можна виділяти з крові впродовж першого тижня хвороби, протягом двох тижнів із спинномозкової рідини, а також із мозку загиблих.

Інфікованим матеріалом заражують новонароджених мишенят, курячі ембріони і культури клітин: первинні – курячі, гусячі фібробласти, клітини ембріона свині; перещеплювані – ВНК-21, Vero. При зараженні клітин ВНК-21 спостерігається характерний цитопатичний ефект – поява на 3-4 добу багатоядерних клітин, що нагадують симпласт.

Ідентифікацію вірусу проводять в РН або РГГА. Вірусоспецифічний антиген можна теж виявити за допомогою імуноферментного методу і РЗНГА. Вірусну нуклеїнову кислоту ідентифікують в реакції гібридизації і полімеразній ланцюговій реакції.

Серологічна діагностика здійснюється за допомогою РН, РЗК, РГГА, РНГА, імуноферментного методу. При цьому потрібно враховувати зростання титру протівірусних антитіл у парних сироватках.

Гарячка Західного Нілу

Вірус гарячки Західного Нілу за своїми розмірами дещо менший від попередніх флавівірусів, його діаметр – 20-30 нм. Структура вірусу типова для даної родини. Збудник чутливий до підвищеної температури і при 56 °С гине протягом 30 хв. Кип'ятіння інактивує його протягом 2-3 хв. Органічні розчинники і детергенти, руйнуючи ліпіди суперкапсидної оболонки, знешкоджують вірус.

Резервуаром вірусу Західного Нілу в природі є дрібні гризуни і птахи, в тому числі водоплаваючі. Інфікована людина теж може бути джерелом інфекції. Переносниками вірусу є комарі і кліщі.

Людина заражується через укуси комара. Вірус розповсюджується в організмі гематогенним шляхом і зумовлює ураження лімфоїдної тканини, рідше оболонок мозку і самого мозку. Вірус має виражений тропізм до ендотелію судин і нейронів. Після нетривалого інкубаційного періоду (2-8 днів) захворювання розпочинається лихоманкою, появою геморагічної висипки, жовтяницею, болем у суглобах. Можливий розвиток менінгіту і менінгоенцефаліту.

Лабораторна діагностика. Основним матеріалом для вірусологічної діагностики служить кров і спинномозкова рідина, а від осіб, які загинули, лімфоїдна і мозкова тканини. Вірусним матеріалом заражують культури клітин МК-21 і внутрішньомозково лабораторних мишей. Ідентифікацію вірусу Західного Нілу проводять за допомогою прямої імунофлуоресценції, а також полімеразної ланцюгової реакції.

Для серологічної діагностики використовують парні сироватки хворого з наступним дослідженням титру протівірусних антитіл в РЗК, РГГА, РН та ІФА.

Жовта гарячка

Вірус жовтої гарячки – типовий флавівірус, нестійкий у зовнішньому середовищі, швидко втрачає свою активність при підвищеній температурі (60 °С), кислому середовищі, при дії ультрафіолетового проміння, детергентів і органічних розчинників, а також хлормістких дезінфектантів.

Для культивування вірусу використовують мишей, курячі ембріони і різноманітні культури клітин: Детройт-6, ВНК-21, HeLa, KB, фібробласти курячих ембріонів.

Жовта гарячка – особливо небезпечна, карантинна хвороба, яка може розповсюджуватися серед людей у вигляді епідемій. Ареалом вірусу є тропічні райони

Африки, Південної і Центральної Америки, зустрічаються випадки захворювань в країнах Середземноморського регіону: Італії, Іспанії, Португалії, Франції. Існують дві епідемічні форми жовтої гарячки – джунглева і міська. Природним вогнищем вірусу в природі є мавпи, переносником – комарі. При міській формі хвороби джерелом інфекції є хворі люди, а переносником комарі.

При укусі комара віруси по лімфатичних судинах потрапляють у лімфатичні вузли, де розмножуються, і звідти проникають у кров і гематоге́нним шляхом розповсюджуються по всьому організму, уражуючи печінку, селезінку, нирки, кістковий мозок. Інкубаційний період в середньому триває 3-7 діб. Хвороба розвивається швидко, з гарячкою, сильним головним болем, світлобоязню, болем у м'язах, нудотою та блюванням. Характерно виражена гіперемія обличчя, верхньої частини тулуба, ін'єкція склер і кон'юнктиви. На 3-4 добу може розвиватись жовтяниця. Як правило, хворі гинуть в результаті розвитку геморагічного синдрому і печінково-ниркової недостатності.

Діагностика. Вірусологічна діагностика жовтої гарячки проводиться тільки в лабораторіях закритого типу, що мають право працювати із збудниками особливо небезпечних інфекцій.

Матеріалом для виділення вірусу служить кров, яку забирають в перші 5 днів захворювання, а також суспензії шматочків печінки і мозку, взятих від померлих. З цією метою досліджуваний матеріал вводять у мозок мишам або заражують курячі ембріони чи чутливі культури клітин. У заражених дорослих мишей через два тижні розвивається смертельний енцефаліт, а мишенята-сисунці гинуть на 5-6-ий день після зараження з попереднім розвитком атаксії і паралічів.

Ідентифікацію вірусів проводять за допомогою РГГА, РЗК, РН. Проте найчастіше використовують реакцію нейтралізації на білих мишах. У даний час набули застосування ІФА і ПЛР.

Серологічну діагностику здійснюють з використанням ІФА, РЗК, РН з парними сироватками хворого.

Геморагічні гарячки

Основною ознакою цих захворювань є розвиток геморагічного синдрому, що характеризується висипкою і крововиливами на шкірі і слизових оболонках, а також кровотечами різної локалізації (шлунково-кишкові, ниркові, носові тощо). Цей синдром тісно пов'язаний з тропізмом збудників до ендотелію судин. Найчастіше джерелом інфекції є дрібні гризуни.

Кримська-Конго геморагічна гарячка

Вірус належить до родини *Bunyaviridae* і має характерну будову: фрагментовану РНК, упаковану в 3 нуклеокапсиди спірального типу симетрії, які оточені зовнішньою суперкапсидною оболонкою.

Вірус не відзначається резистентністю в зовнішньому середовищі, легко руйнується під дією хімічних і фізичних факторів, чутливий до органічних розчинників ефіру і дезоксихолату натрію. При кип'ятінні гине миттєво. У той же час він здатний тривалий час зберігати свою активність у замороженому стані.

Основним джерелом і переносником вірусу в природі є різноманітні пасовищні кліщі. Існування вірусу у вогнищі забезпечують їжаки і зайці, а також свійські тварини – корови і вівці.

Після укусу кліща або при контакті з інфікованою твариною вірус через мікрошкодження шкіри і слизових оболонок, а також повітряно-краплинним шляхом проникає в кров і розмножується в ендотеліоцитах.

Інкубаційний період хвороби в середньому становить 3-7 діб. Основні симптоми, пов'язані з гарячковим станом і геморагічним синдромом. Під час лихоманки вірус знаходиться в крові в значній концентрації, тому існує велика ймовірність зараження осіб, які надають допомогу хворому при кровотечі.

Лабораторна діагностика. У зв'язку з високою небезпекою зараження всі вірусологічні дослідження повинні проводитись тільки в спеціальних, оснащених необхідним устаткуванням, лабораторіях.

Основним матеріалом, з якого можна виділити вірус, є кров, яку у хворого забирають на висоті гарячкового стану з дотриманням всіх правил санітарної безпеки. Від осіб, які загинули, беруть головний або спинний мозок, внутрішні органи.

Для швидкого нагромадження вірусу матеріал вводять у мозок мишеням-сисунцям і через 4-5 днів суспензією мозку цих тварин заражують інших мишень, щурів або культуру клітин ембріона свиней.

Ідентифікують вірус за допомогою РЗК, РОНГА, ІФА, РІА. Використовуючи метод імунофлуоресценції, можна виявити вірус у мазках-відбитках печінки мишенят, які загинули, а також у культурах клітин.

Серологічна діагностика проводиться за допомогою РЗК, РНГА, РГГА, РН, ІФА. Комплементзв'язуючі антитіла можна виявити в сироватці крові вже на 6-10 добу, максимальний титр яких спостерігається через 60 днів і зберігається до 6 місяців.

Геморагічна гарячка з нирковим синдромом

Вірус відноситься до родини *Bunyaviridae*, роду *Hantavirus*. Його будова характерна для представників цієї родини. Вірус чутливий до дезоксихолату натрію, ефіру, хлороформу, ультрафіолетового проміння, інактивується при рН 5,0 і температурі, вищій 37 °С. При низьких температурах може зберігатись тривалий час.

Вірус добре культивується на клітинах Vero E6 без видимого цитопатичного ефекту, іноді використовують для культивування вірусу 6-7-денні курячі ембріони, заражуючи їх в алантоїсну порожнину або жовтковий мішок.

Геморагічна гарячка з нирковим синдромом – природновогнищева хвороба, осередки якої розповсюджені в лісистій місцевості. Резервуаром збудника в навколишньому середовищі є мишоподібні гризуни, в яких вірус виділяється з се-

чею і фекаліями. Людина заражується від хворих тварин респіраторним, контактним і аліментарним шляхами найчастіше через предмети, продукти, забруднені виділеннями гризунів.

Проникнувши в організм, вірус розмножується в ендотелії судин, клітинах селезінки, нирок, легень. Головними клінічними симптомами є гарячка, інтоксикація, геморагічний і нирковий синдроми. У патогенезі хвороби значне місце займають імунопатологічні процеси в результаті утворення імунних комплексів.

Лабораторна діагностика. Матеріалом для дослідження є кров і сеча, від осіб, що загинули – шматочки тканин нирок, легень. Вірус виділяють шляхом зараження культури клітин Vero E6. Віруси у цих клітинах нагромаджуються у значних титрах без видимого цитопатичного ефекту. Їх виявляють за допомогою непрямой імунофлуоресценції і методу інтерференції.

Суть методу інтерференції полягає в наступному. Після зараження вірусним матеріалом, культури клітин через 3-4 доби повторно заражують вірусом Ньюкасла. Через 48 годин визначають титр гемаглютининів у культуральній рідині і ступінь розвитку цитопатичного ефекту, порівнюючи ці показники з контролем (культури клітин, заражені тільки вірусом хвороби Ньюкасла). Вірус геморагічної гарячки, взаємодіючи з вірусом хвороби Ньюкасла, в значній мірі пригнічує синтез гемаглютининів у досліді і сповільнює розвиток цитопатичного ефекту.

Ідентифікацію вірусу можна здійснити за допомогою РОНГА, ІФА, РІА, РІФ. Як прискорений метод індикації вірусних антигенів, використовують імунну електронну мікроскопію і молекулярно-генетичний метод – ПЛР.

Для серологічної діагностики успішно застосовують метод непрямой імунофлуоресценції. Зрізи легеневої тканини мишей, інфікованих вірусом геморагічної гарячки з нирковим синдромом, обробляють різними розведеннями парних сироваток хворого. Після відмивання надлишку сироватки на препарат наносять флуоресцюючі антитіла до глобуліну людини. Присутність антитіл у досліджуваній сироватці встановлюють за наявністю специфічної флуоресценції в інфікованих клітинах. Крім того, для виявлення приросту титру антитіл у парних сироватках застосовують РГНГА, ІФА і РІА.

Краснуха

Збудником хвороби є вірус краснухи, який належить до роду *Rubivirus* родини *Togaviridae* і не є арбовірусом, тому що його існування не пов'язане з членистоногими.

Віріон має сферичну форму, діаметром 60-70 нм. У центрі віріону розташований ікосаедричний капсид, у середині якого міститься одонитчаста + РНК, зовні капсид вкритий суперкапсидною оболонкою з двома типами глікопротеїнів E1 і E2, які утворюють шипики. Встановлено наявність двох антигенів – внутрішнього і зовнішнього. Внутрішній (нуклеокапсидний) виявляється в РЗК, зовнішній (суперкапсидний) – в РГГА, реакції затримки гемолізу та РН. Вірус має гемаглютинуючу, гемолітичну та слабовиражену нейрамінідазну активність.

Вірус краснухи порівняно нестійкий до дії хімічних і фізичних факторів, не зберігається тривалий час у зовнішньому середовищі. Швидко руйнується під дією органічних розчинників, формаліну, ультрафіолетового проміння.

Вірус культивується у великій кількості різноманітних культур клітин, однак у більшості з них не викликає цитопатичного ефекту. Цитопатичну дію вірусу можна спостерігати на перещеплюваних культурах ВНК-21, Vero, RK-21, а також в первинних культурах клітин, одержаних із тканин ембріона людини.

Джерелом інфекції є хворі люди та особи з безсимптомними формами інфекції. Основний механізм зараження – повітряно-краплинний, хоча відомі випадки передачі збудника через інфіковані предмети.

Проникнувши в організм, вірус уражує епітелій слизової оболонки рота, згодом епітелій верхніх дихальних шляхів, потрапляє в лімфатичні вузли, а звідти в кров. Вірусемія закінчується через 2-3 тижні після зараження при появі в крові специфічних антитіл і висипу на тілі хворого.

Характерним симптомом хвороби є поява висипу, який спочатку виникає на шиї та обличчі, в той же день розповсюджується на тулуб, розгинальні поверхні рук, сідниці, стегна. Його поява супроводжується підвищенням температури до 38 °С. Через 2-3 дні висип блідне й зникає.

Вірус краснухи має ембріотоксичну активність, викликаючи вади розвитку плода (глухоту, катаракту, серцеві аномалії). Тому особливо небезпечним є інфікування вірусом краснухи вагітних у перші 4 тижні вагітності, проте небезпека розвитку таких явищ існує до 16-17 тижня вагітності.

Лабораторна діагностика. Для виділення вірусу в перші дні хвороби використовують змиви із слизової носоглотки, кров і сечу, якими заражують перещеплювані культури клітин ВНК-21, Vero, RK-21, первинні клітини ембріона людини або кроля. При репродукції вірусу в цих клітинах спостерігається характерний цитопатичний ефект. На поверхні моношару появляються клітини з посиленням світлозаломленням, згодом виникають окремі вогнища змінених вакуолізованих клітин, які відпадають від поверхні скла. При зараженні інших культур клітин цитопатична дія вірусу не спостерігається. У такому випадку для індикації вірусу використовують феномен інтерференції, суть якого полягає в тому, що уражені вірусом краснухи клітини не заражуються іншими вірусами, наприклад, ЕСНО-11, вірусом везикулярного стоматиту. Останні віруси завжди спричиняють цитопатичний ефект в інфікованих ними клітинах, за винятком того випадку, коли в цих клітинах знаходиться вірус краснухи. Ідентифікацію вірусу проводять з використанням специфічної сироватки в РГГА, РН, РІФ. Набуває широкого використання ПЛР, яка дозволяє безпосередньо виявити нуклеїнову кислоту вірусу.

До прискорених методів виявлення вірусу краснухи відносяться латекс-аглютинація, ІФА, РІФ.

У практичних лабораторіях значно частіше використовують серологічні методи. Вивлення приросту титру антитіл у парних сироватках проводять у РГГА, РЗК, РН, ІФА. Віруснейтралізуючі антитіла та антигемаглютиніни визначають вже на 4-7 день після появи висипу, комплементзв'язуючі – пізніше (через 2-3 тижні).

Діагностичне значення набуває виявлення в сироватці специфічних IgM, наявність яких вказує про недавно перенесену хворобу або інфекцію в момент дослідження. Знаходження в сироватці крові немовлят специфічних IgM свідчить про перенесену внутрішньоутробну інфекцію краснухи.

Лімфоцитарний хориоменінгіт

Вірус лімфоцитарного хориоменінгіту належить до родини *Arenaviridae*, яка відзначається певними особливостями будови віріону. Віріони сферичної форми, їх діаметр становить 110-140 нм. На поверхні суперкапсиду розміщені великі шипи. Під суперкапсидом знаходяться 2 кільцеподібні нуклеокапсиди, які нагадують намисто і складаються з –РНК і капсомерів. Поряд з нуклеокапсидами чітко прослідковуються гранули – комплекси вірусних протеїнів з рибосомами клітини господаря.

Значна кількість первинних і перещеплюваних культур клітин чутливі до вірусу, проте рідко можна помітити в них деструктивні зміни. Найчастіше для культивування вірусу використовують перещеплювані клітини Vero, ВНК-21 і первинні культури курячих фібробластів.

Збудник хориоменінгіту широко поширений в навколишньому середовищі. Основним резервуаром вірусу є сірі будинкові миші. Основні шляхи зараження людини – повітряно-краплинний та аліментарний при вживанні харчових продуктів, інфікованих виділеннями мишей. Не є винятком можливість проникнення збудника в організм через шкіру, а також трансплацентарна передача.

В організмі вірус уражує оболонки головного мозку і клітини ретикулоендотеліальної системи, викликаючи їх апоптоз.

У людини перебіг хвороби нагадує грип – підвищення температури, головний біль, біль у м'язах, рідше розвиваються симптоми асептичного менінгіту і менінгоенцефаліту. При вродженому лімфоцитарному хориоменінгіті розвиваються гідроцефалія, дитячий церебральний параліч, хоріоретиніт.

Лабораторна діагностика. Матеріалом для дослідження є кров, спинномозкова рідина, мозкова тканина осіб, що загинули. Виділення вірусу проводять шляхом зараження в мозок молодих білих мишей або культури клітин. Ідентифікацію вірусу проводять за допомогою РЗК, РОНГА, РН, ІФА, РІА. Як антиген можна використати культуральну рідину заражених клітин або 10 % суспензію мозкової тканини заражених мишей. Методом імуофлуоресценції досліджують культури клітин або зрізи мозку інфікованих мишей.

Противірусні антитіла можна виявити як у сироватці крові, так і в спинномозковій рідині. З цією метою використовують РЗК, РН, РНГА, ІФА, РІФ, РІА.

Вірусні гепатити

Вірусні гепатити – група інфекційних захворювань, які існують як самостійні нозологічні форми і спричиняються вірусами. Вони характеризуються ураження-

ми печінки людини, мають жовтяничний або безжовтяничний перебіг і загальнотоксичні прояви. Збудниками їх є віруси гепатитів А, В, С, D, E, F, G та інші.

Гепатит А

Збудник епідемічного гепатиту А належать до родини *Picornaviridae*, роду *Hepatovirus*, типу 72. Він має сферичну форму, кубічний тип симетрії, діаметр зрілого віріона – 27-32 нм. У центрі віріона міститься одониткова лінійна плюскитка РНК. Поверхня капсиду створюється 32 окремими капсомерами, поверхневих виступів немає (рис. 94). Віруси мають чотири структурних білки – VP1, VP2, VP3, VP4.

Від інших ентеровірусів вірус гепатиту А відрізняється більш високою резистентністю до дії факторів зовнішнього середовища. Зокрема, він частково зберігає свою інфекційність у культурі клітин при 60 °С протягом 4-12 год, тижнями при кімнатній температурі, протягом кількох місяців при 4 °С. Ультрафіолетове випромінювання знищує його за 1 хв, при автоклавуванні (121 °С) – за 20 хв, дія сухого жару (180 °С) – за одну годину. Вірус чутливий до формаліну, хлораміну, хлорного вапна.

З метою лабораторної діагностики використовують вірусологічні, серологічні та експрес-методи.

Вірусологічна діагностика ґрунтується на виявленні самого збудника, або його антигенів після нагромадження його в спеціальних тест-системах. Матеріалом для такого дослідження є фекалії хворого, які можна використати, починаючи з другого тижня інкубаційного періоду, і протягом 14-21 дня жовтяничного періоду. Їх піддають попередній підготовці, яка полягає в одержанні гомогенізованого у фосфатному буфері 10-40 % фекального екстракту. Під час цього процесу віруси концентрують, використовуючи фільтрування матеріалу через сефарозу, а також центрифугування за градієнтом щільності хлориду цезію.

Одержаним матеріалом заражують культури клітин нирок ембріону макака-резуса (FrhK-4, FrhK-6), первинної гепатоцелюлярної карциноми, лімфобластів людини та інші. Слід відзначити, що вірусам гепатиту А притаманний довгий цикл репродукції, який триває 4-10 тижнів без помітної цитопатичної дії.

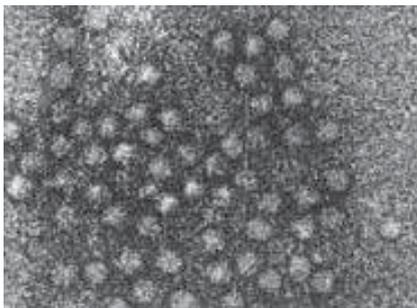


Рис. 94. Вірус гепатиту А (за Хіллеманом).

У заражених клітинах віруси або їх антигени можна виявити за допомогою імунної електронної мікроскопії (ІЕМ), РІФ, РІА, ІФА.

Імунна електронна мікроскопія передбачає змішування суспензії вірусів з відповідною антисироваткою, відділення імунних комплексів з наступним дослідженням останніх під електронним мікроскопом. В умовах негативного контрастування можна виявити агрегати вірусів при концентрації менше 10^6 у 1 г

матеріалу. Однак у зв'язку з великою трудоемністю, цей метод у практичних лабораторіях не використовується.

Реакцію імуофлуоресценції можна використати і при дослідженні біоптатів печінки. При прямій імуофлуоресценції користуються міченим флуоресцеїнізотіоціанатом IgG, виділеним із сироваток реконвалесцентів. Цінність методу полягає в тому, що він дозволяє знайти окремі клітини, які містять антиген.

Радіоімунний та імуоферментний аналізи в твердій фазі. Ці методи найрозповсюдженіші в діагностиці, мають однакову високу чутливість і специфічність. Вони мають один і той же принцип постановки з тією різницею, що в РІА використовують специфічні імуоглобуліни (IgG), мічені ^{125}I , а в ІФА – ферментом пероксидазою.

Наявність вірусів у фекаліях є 100 % підтвердженням діагнозу, однак відсутність їх за даними серологічних реакцій не виключає гепатит А.

У окремих випадках матеріалом від хворого можна заражати лабораторних тварин. Найчастіше у високоспеціалізованих лабораторіях використовують мавп шимпанзе, мармозет, павіанів та інших.

Пізніше в матеріалі від тварин виявляють віруси гепатиту А або його антигени вищеописаними способами.

Експрес-діагностика гепатиту А спрямована на безпосереднє визначення вірусів у випорожненнях хворого. З цією метою використовують сучасні методи імуної електронної мікроскопії, радіоімунний аналіз, реакцію ензиммічених антитіл. Останній є достатньо чутливим і ефективним. Генетичний аналіз базується на ПЛР.

Серологічне дослідження. Одним із способів доказу етіологічної належності виділеного від хворих вірусу є виявлення в парних сироватках крові зростання титру специфічних антитіл. При захворюванні антитіла з'являються рано, їх синтез починається ще в інкубаційному періоді, а титр різко зростає. У зв'язку з пізнім поступленням хворих у стаціонар чотирикратне діагностичне збільшення титру антитіл виявити практично неможливо. Тому цей метод діагностики не знайшов широкого застосування.

Антитіла проти вірусу гепатиту А в інкубаційному періоді й на початку гострої фази захворювання представлені класом IgM. Поступово знижуючись у титрі, вони циркулюють протягом 6-8, а деколи й 12-18 місяців. Анти-ВГА IgM синтезуються у всіх хворих, незалежно від форми інфекції. Знаходження їх – ранній тест діагностики, який дозволяє не тільки підтвердити або заперечити клінічний діагноз, але й виявити стерті, безсимптомні форми хвороби, що має вирішальне значення в епідеміологічних дослідженнях. У подальшому їх заміщує IgG. Імуоглобуліни класу M можна знаходити в крові протягом 3-6 місяців після перенесеного захворювання, в той час як IgG – протягом усього життя. Антитіла виявляють за допомогою РІА або ІФА.

Крім визначення анти-ВГА IgM, для діагностики в гострому періоді захворювання в сироватці виявляють анти-ВГА IgA, які також є ранніми антитілами і

зростають паралельно з IgM, проте зниження їх титру відбувається значно швидше. Секреторні анти-ВГА IgA знайдено також у фекаліях.

Найчастіше для визначення титру антитіл використовують ІФА, РІА, деколи – РЗК.

Гепатит В

Вірус гепатиту В (ВГВ) належить до родини *Hepadnaviridae*. Він представляє собою сферичної форми складноорганізований вірус діаметром до 42 нм (див. вкл., рис. 30). Зовні вірус вкритий білково-ліпідною суперкапсидною оболонкою. Капсид побудований за кубічним типом симетрії, складається з 180 капсомерів. Серцевина вірусу містить ДНК, що складається з 3200 нуклеотидних основ, ковалентно пов'язану з поліпептидом, ДНК-полімерази, протеїнкінази. ДНК має форму кільця, один з ланцюгів якої дефектний. У процесі репродукції вірусів ДНК-полімераза добудовує дефектну ДНК.

ВГВ має декілька антигенів. Поверхневий антиген (HBsAg) високостійкий до дії фізико-хімічних факторів. Його виявляють практично в усіх біологічних рідинах хворих. Серцевинний антиген (HBcAg) входить до складу нуклеокапсиду ВГВ. Цей антиген присутній в ядрах гепатоцитів хворих людей. HBeAg міститься між HBcAg і HBsAg. Його можна виявити в цитоплазмі та ядрах гепатоцитів людей, які інфіковані вірусом. Деякі дослідники висловлюють припущення про існування ще одного антигену – HBxAg, який може мати відношення до ракової трансформації гепатоцитів.

Віруси гепатиту В мають високу резистентність до дії різноманітних факторів зовнішнього середовища. Зокрема, вони витримують кип'ятіння протягом 15-20 хв, а при 60 °С – до декількох годин. Автоклавування при 121 °С інактивує вірус протягом 30 хв, сухий жар (160 °С) – за 60 хв, а при 180 °С – за 40 хв.

У зв'язку з тим, що вірус гепатиту В не репродукується ні в культурах тканин, ні в курячих ембріонах, можна виділити два основних напрямки лабораторних досліджень – серологічну та експрес-діагностику.

Експрес-діагностика спрямована на виявлення у крові хворого антигенів вірусу гепатиту – HBsAg, HBcAg і HBeAg. У рутинній лабораторній практиці найчастіше визначають HBsAg. Він з'являється в крові хворих ще протягом інкубаційного періоду, за декілька тижнів до появи основних клінічних симптомів хвороби і зростання активності печінкових ферментів трансаміназ. Як правило, у сироватці крові поверхневих антигенів у декілька сотень або тисяч разів більше, ніж самих вірусів. Розроблено декілька методів, що дозволяють виявити в сироватці хворої людини або вірусоносія ці антигени: реакція преципітації в гелі, реакція зворотної непрямой гемаглютинації, зустрічний імуоелектрофорез, РІА, ІФА. Останні дві реакції за своєю чутливістю значно перевищують попередні. HBeAg можна виявити за допомогою ІФА, РНГА, РНЗГА, РЗК, а HBcAg – ІФА, РІА та інших.

Серологічні дослідження. З цією метою досліджують сироватку крові хворих на наявність антитіл проти різних антигенів вірусів гепатиту В. Сучасні серо-

логічні методи дозволяють визначити в крові антитіла проти різноманітних вірусних антигенів: анти-НВs, анти-НВс і анти-НВе.

Найзручніші методи, що використовуються, – ІФА, РІА. Однак антитіла проти НВsАg можна знайти ще за допомогою реакції преципітації в гелі, реакції непрямої гемаглютинації тощо.

Визначення взаємозв'язку між вірусними антигенами, що з'являються в крові хворих або вірусоносіїв, та відповідними антитілами ІgМ і ІgG, які нагромаджуються в сироватці крові, є вкрай важливим з діагностичної точки зору, оскільки дозволяє слідкувати за динамікою хвороби та прогнозувати її перебіг. Ці антигени і антитіла названі маркерами вірусного гепатиту В. До них, таким чином, належать у першу чергу НВsАg, НВсАg, НВеАg, анти-НВs, анти-НВе, анти-НВs ІgМ і сумарний пул антитіл проти цього антигену.

НВsАg можна знайти в організмі людини приблизно через 3-5 тижнів після зараження. Про видужання після гострого гепатиту В свідчить повне зникнення НВsАg та поява антитіл (анти-НВs) у сироватці крові. Останні можуть зберігатись протягом всього життя. Однак антитіла проти поверхневого НВsАg з'являються не відразу після його зникнення, а через деякий проміжок часу (від 2-4 тижнів до 1 року). У цей період маркером гепатиту виступають антитіла до НВсАg і, зокрема, ІgМ, а сам цей період називається корівським вікном (від англ. *core* – серцевина). Ці антитіла існують у сироватці не тільки при гострій формі гепатиту, але й при хронічній. Не менш важливим маркером є анти-НВс антитіла, які належать до класу ІgG. Ці імуноглобуліни вторинної імунної відповіді можуть бути знайдені в крові людини протягом всього життя.

Іншим діагностичним маркером гострого періоду хвороби є наявність НВеАg, який може циркулювати у крові до 7 тижнів. Його вважають маркером реплікації ДНК вірусу гепатиту В або антигеном інфекційності, тому що знаходять його найчастіше разом з ДНК-полімеразою і ДНК вірусу гепатиту В. Хоча концентрація цих антигенів у крові нижча, ніж НВsАg, вони є майже у всіх хворих.

При гострому гепатиті В НВеАg можна виявити в крові протягом 6-8 тижнів. Пізніше там нагромаджуються антитіла проти них (анти-НВе), а вони самі зникають. Якщо при відповідних дослідженнях у хворого виявляють НВеАg після 9-10 тижня від початку захворювання, це може розглядатись як свідчення хронізації процесу. У таких випадках цей ензимний антиген циркулює в крові протягом декількох років.

Ретельне вивчення антигенної будови вірусу гепатиту В та системи генів, які його кодують, привернуло увагу до вірусних поліпептидів (антигенів), які кодуються геном епV, зокрема, його зонами пре-S1 та пре-S2. Вважають, що наявність пре-S2 антигену в крові свідчить про її високі інфекційні властивості. У той же час у хворих, які одужали, в крові присутні антитіла до цього антигену. Пре-S1 антигени також засвідчують інфекційність крові, реплікацію вірусів в організмі, а також достатньо високий ризик можливості вертикальної передачі вірусу гепатиту В від матері до дитини.

Гепатит С, Д, Е, G

Вірус гепатиту С належать до родини *Flaviviridae*. Його відносять до складних вірусів. Віріон має діаметр 30-60 нм. У центрі міститься одноланцюгова плюс-РНК, що складається з майже з 9500 нуклеотидних основ. Зверху вірус вкритий суперкапсидною білково-ліпідною оболонкою. Віруси чутливі до ефіру, дезоксихолату натрію, УФ-опромінення, здатні витримувати нагрівання до 50 °С.

Лабораторна діагностика спрямована на виявлення анти-ВГС IgM і IgG за допомогою імуноферментного аналізу. Ці антитіла з'являються в крові приблизно через 1 місяць після інфікування. У той же час розроблені тест-системи для імуноферментного аналізу 1-3-го поколінь з використанням рекомбінантних антигенів вірусів, дозволяють визначати антитіла безпосередньо до антигенів.

Дослідити наявність вірусної РНК у крові хворої людини можна за допомогою полімеразної ланцюгової реакції.

Вірус гепатиту D належить до роду *Deltavirus*. Він круглої форми, діаметром 35-37 нм. У центрі віріона міститься кільцева одониткова РНК, розташована на HDАg. Вірус оточений суперкапсидною оболонкою, представленою HBsAg. Вірус гепатиту D є дефектним, оскільки його реплікація відбувається за рахунок геному ВГВ.

Вірус гепатиту D стійкий до високих температур, ферментів нуклеаз, однак легко руйнується лугами і протеазами.

З метою лабораторної діагностики вірусного гепатиту D проводять визначення таких його маркерів як HDАg, анти-HD IgM і IgG за допомогою РІА та ІФА.

Підтверджує діагноз гепатиту D безпосереднє виявлення ВГД у сироватці крові або в гепатоцитах. HDАg з'являється в ядрах гепатоцитів у кінці інкубаційного періоду і зберігається протягом гострої фази захворювання. Однак методи його концентрування і отримання досить складні, тому доступні тільки для високоспеціалізованих лабораторій.

Серологічна діагностика використовується для визначення у сироватці крові антитіл IgM і IgG проти HDАg. Анти-HD IgM з'являються вже через 2 тижні після інфікування, а пізніше починає зростати титр анти-HD IgG.

Вірус гепатиту Е не знайшов ще свого остаточного положення в класифікаційній системі. Вважалось, що він є представником родини *Caliciviridae*. Збудник має сферичну форму, його діаметр становить 32-34 нм. Геном вірусу представлено одонитковою РНК, оточеною капсидом. Його поверхня має специфічні виступи та невеликі западини.

Достатньо ефективних методів діагностики цієї форми гепатиту ще немає. Є спроби виявити інфекційні агенти у фекаліях хворих за допомогою імуної електронної мікроскопії, ПЛР. Серологічна діагностика спрямована на визначення сумарної кількості антитіл, які можна знайти, використовуючи відповідні системи для ІФА.

Вірус гепатиту G описано зовсім недавно (1995 р.). Це складний вірус, геном якого представлено одонитковою плюс-РНК. Зовні він оточений капсидною та суперкапсидною оболонками.

Основний матеріал для дослідження – кров хворих. У ній можна виявити або вірусну РНК за допомогою ПЛР, або дослідити наявність загального пулу імуноглобулінів проти інфекційного агента. З цією метою можна використати ІФА.

ВІЛ-інфекція

Віруси імунодефіциту людини (ВІЛ) входять до родини *Retroviridae*, роду *Lentivirus*. Виділяють два види збудників синдрому набутого імунодефіциту – ВІЛ-I і ВІЛ-II.

ВІЛ-1 має округлу форму, його розміри – 100-120 нм (рис. 94). Геном складається з двох ідентичних „плюс”-ниток РНК, асоційованих з ревертазою та внутрішніми білками. У геномі міститься 9 генів (3 структурних: *gag*, *pol*, *env*, і 6 неструктурних: *tat*, *rev*, *vif*, *nef*, *vpr*, *vpr*, які кодують внутрішні білки вірусу, ревертазу, ендонуклеазу, протеазу і специфічні білки зовнішньої оболонки). Серцевина віріона оточена білками капсиду й набуває конусоподібної форми. З нею асоційовані білки p7, p9, p24. Вона відділена від зовнішньої оболонки ще одним шаром білків – матриксним (p17). На зовнішній ліпідній оболонці розміщені глікопротеїнові шипики, які складаються з двох субодиниць глікопротеїду (gp 41 і gp 120). У сукупності їх позначають як gp 160. У зв'язку з особливостями структури генома, ВІЛ має значну антигенну мінливість.

При нагріванні до 56 °С протягом 30 хв вірус інактивується. Він чутливий до дії спирту, ефіру, ацетону, іонізуючого й ультрафіолетового випромінювання.

ВІЛ-2 за своєю будовою принципово не відрізняється від ВІЛ-1, однак має певні відмінності в складі геному, білків тощо.

Діагностика СНІДу – складна і відповідальна. Вона ґрунтується на основних клінічних проявах захворювання, а також результатах вірусологічних, серологічних та інших методів дослідження, і вимагає їх комплексної оцінки.

Серологічна діагностика. Сьогодні в Україні розроблена двоетапна система лабораторної діагностики захворювання, яка включає дослідження сироватки крові людини на наявність антитіл проти ВІЛ. Сироватка крові осіб з підозрою на ВІЛ-носійство обстежується за допомогою ІФА. Це відбу-

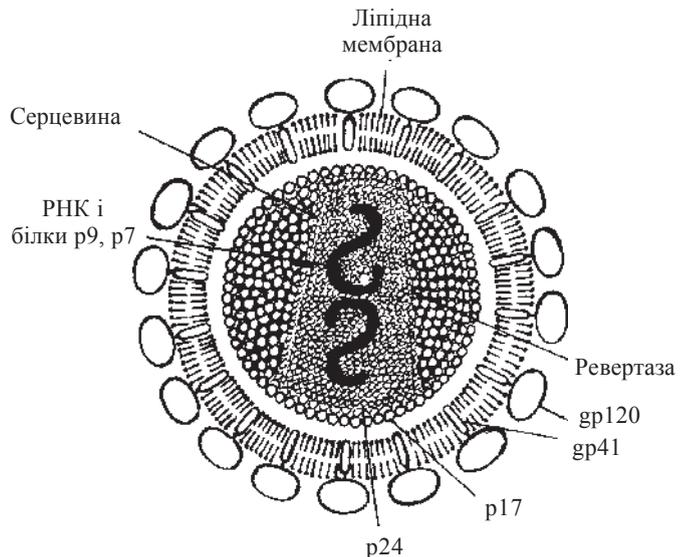


Рис. 94. Вірус імунодефіциту людини (схема).

вається в спеціалізованих лабораторіях з діагностики СНІДу, які розгортаються на базах санепідстанцій, станцій переливання крові, поліклінік, диспансерів, інфекційних лікарень тощо.

Основним матеріалом для дослідження є кров. Її забирають із ліктьової вени в об'ємі 5 мл. Отриману пізніше сироватку можна зберігати при температурі 4 °С протягом 7 днів. Запропоновано також використання способу “сухої краплини”. Він полягає в тому, що за допомогою стерильної голки проколюють палець і декілька крапель крові наносять на стерильний диск, виготовлений з фільтрувального паперу. Висушені диски можуть зберігатись тривалий час (до 6 місяців) у поліетиленових пакетах. У разі потреби за допомогою фосфатного сольового розчину імуноглобуліни переводять у рідкий стан і досліджують.

Доведено, що антитіла проти ВІЛ можна виявити в сльозах, слині, грудному молоці (IgA), спинномозковій рідині (в осіб з енцефалопатіями або неврологічною симптоматикою), навіть у сечі. Допустимим вважається дослідження на наявність антитіл рідини склоподібного тіла в трупів.

ІФА (в основному, непрямий) дозволяє визначити антитіла у будь-якому дослідженому матеріалі. Він є достатньо чутливим методом, що використовується у будь-яких лабораторіях світу. Антигени для цих тест-систем одержують або із заражених тканинних культур, або за допомогою рекомбінантних ДНК. В Україні використовують тест-системи “Антиген”, “Рекомбінант-ВІЛ”, “Скрин-ВІЛ”, “Комбі-ВІЛ”, фірми “Abbott” та інші.

Слід відзначити, що антитіла у крові з'являються не зразу після попадання ВІЛ в організм, а не менш, ніж через 2-3 місяці, а деколи й довше (5-8 міс.), тому слід пам'ятати, що ІФА є малоприматною для діагностики вірусносійства саме в серонегативний період. Одноразовий позитивний результат виявлення антитіл у крові не дає можливості підтвердити діагноз набутого імунодефіциту. Цю реакцію рекомендують повторити тричі. Діагностичними вважаються два позитивних результати в трьох повторях. Така схема постановки реакцій зумовлюється тим, що сучасні тест-системи все ж таки можуть давати як псевдопозитивні, так і псевдонегативні результати.

Зразки крові, які дали два позитивних результати з трьох повторів, направляють у спеціалізовані лабораторії при науково-дослідних інститутах для підтвердження наявності ВІЛ-вірусносійства за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу – вестернблоту або імуноблоту (від англ. *blott* – пляма), реакції непрямой імунофлуоресценції або радіоімунної преципітації. Ці методи дозволяють виявити антитіла до певних вірусних білків.

Метод вестернблоту передбачає попереднє електрофоретичне розділення вірусних білків у поліакриламідному гелі з наступним переносом їх на спеціальні нітроцелюльозні мембрани. Після цього на фільтрах розганяються досліджувані зразки крові з подальшою ідентифікацією їх білків (антитіла проти певних структурних вірусних білків) за допомогою антивидових мічених сироваток. На нітроцелюльозних фільтрах з'являються кольорові смуги, що відповідають комплексам, утвореним вірусними структурними білками та антитілами сироватки віру-

соносія. Про позитивний результат реакції може свідчити наявність антитіл проти вірусних білків p24, p31, gp41, gp120/160.

При негативних результатах на фільтрах не видно характерних зон забарвлення.

Одним із ефективних способів визначення наявності антитіл проти ВІЛ у сироватці крові людини є використання *реакції мікроаглоутації*. Вона подібна до реакції непрямой гемаглоутації, однак замість еритроцитів, сенсibilізованих відповідним антигеном, тут використовують як основу частинки желатину або латексу. У випадку позитивного результату спостерігають за появою специфічного осаду в лунках планшет. Дана реакція дає подібні результати до ІФА, проте значно простіша за методикою постановки, швидше виконується, дає менше псевдопозитивних результатів.

Іншим методом виявлення антитіл проти ВІЛ є реакція *непрямой імуофлуоресценції*. Для постановки цієї реакції використовують антиген, який одержують з перещеплюваних ліній лімфоцитів, заражених вірусами імунодефіциту. З них готують препарати фіксованих клітин, які можна зберігати протягом 2 місяців при температурі -20°C . У разі необхідності скельця з нанесеним антигеном обробляють розведеними досліджуваними сироватками (1:10, 1:100, 1:1000 тощо), а потім люмінесцентною антисироваткою проти імуноглобулінів людини. Препарати додатково контрастують синьою Еванса і вивчають у люмінесцентному мікроскопі.

Більш чутливим є *метод радіоімунопреципітації*. Як і при будь-якій імунологічній реакції в його основі лежить взаємодія антигенів ВІЛ з антитілами проти них. У цій реакції як антигени використовують білки ВІЛ, мічені радіоактивними ізотопами ^{125}I або ^{35}S .

Реакцію проводять у рідкій фазі, змішуючи гомологічні антигени (вірусні білки gp120, gp41, p24, p17, p9 та інші) й антитіла (сироватка вірусносія), внаслідок чого утворюються імунні комплекси. Вони взаємодіють із спеціальною системою, яка складається з білка *A. S. aureus*, з'єданого із сефарозою, внаслідок чого відбувається преципітація. Утворений комплекс за допомогою ультрацентрифугування осаджують у пробірках, видаляють надосадову рідину, залишаючи тільки субстрат антиген-антитіло-білок А-сефароза. На наступному етапі дослідження викликають дисоціацію комплексів додецилсульфатом натрію, піддають їх електрофорезу в поліакриламідному гелі і за допомогою авторадіографії визначають молекулярну масу мічених ізотопами білків. Це дозволяє встановити, які саме вірусні білки знаходяться в імунних комплексах, отже, до яких вірусних білків утворюються антитіла. Цей метод є чутливішим, ніж імуоблот, проте вимагає спеціального обладнання, тому не використовується широко в лабораторній практиці.

Підсумовуючи вищевикладене, можна таким чином підійти до підтвердження діагнозу ВІЛ-носіїства. Одноразовий негативний результат на наявність антитіл, одержаний за допомогою ІФА, дозволяє зробити висновок про відсутність ВІЛ-інфікування. Два позитивних результати з трьох повторних досліджень сироваток не дають змоги встановити діагноз вірусносіїства. Це можна зробити тільки після одержання позитивних результатів про наявність антитіл проти певних вірус-

них структурних білків за допомогою імуноблотингу або інших методів, що його замінюють.

Вірусологічна діагностика. Матеріалом для дослідження може бути кров, спинномозкова рідина, грудне молоко, сперма, біоптати при автопсії тощо. Для виявлення вірусу використовують електронну мікроскопію, зараження культур Т-лімфоцитів (CD₄-клітини). Для ідентифікації вірусів можливе використання високочутливих тест-систем ІФА, реакції непрямої імунофлуоресценції, характерної цитопатичної дії тощо.

Важливим для діагностики СНІДу є визначення провірусу в лімфоцитах, або вірусних нуклеїнових кислот у патологічному матеріалі. З цією метою широко використовують методи *молекулярної гібридизації*. Використання цього методу набуває важливого значення особливо через те, що серонегативний період при СНІДі може тривати декілька місяців. Висока чутливість запропонованого методу дозволяє виявити навіть поодинокі вірусні частинки в крові (0,1-1,0 нг нуклеїнових кислот). Принцип його полягає в тому, що в умовах *in vitro* викликається процес гібридизації між вірусною нуклеїновою кислотою (ДНК, РНК) та спеціальним зондом, який мічений радіоактивним фосфором ³²P. Утворений комплекс достатньо легко можна ідентифікувати за допомогою авторадіографії. Однак використання ³²P-зондів у певній мірі ускладнює цей метод, оскільки вони мають короткий (2 тижні) період напіврозпаду, вимагають дотримання суворих правил техніки безпеки при роботі з радіоактивними ізотопами тощо. Враховуючи це, перспективним напрямком є використання зондів, які можна виявити за допомогою кольорових ферментативних реакцій. Такою міткою є біотин (біотиновий зонд).

Існують різноманітні варіанти молекулярної гібридизації, серед яких найчастіше застосовуються точкова гібридизація, блот-гібридизація, сандвіч-гібридизація, гібридизація *in situ* (в заражених тканинах).

Одним з варіантів молекулярної гібридизації розглядається *полімеразно-ланцюгова реакція*, в основі якої лежить ампліфікація генів. Використання ДНК-полімерази, наприклад, з *Thermophylus aquaticus* дозволяє за кілька циклів ампліфікації значно збільшити кількість досліджуваних нуклеїнових кислот, внаслідок чого їх можна виявити будь-якими відомими методами – ІФА, електрофорез у поліакриламідному гелі тощо. Ця реакція суттєво перевищує чутливість попереднього методу (на декілька порядків), тому може бути використана при дослідженні мікрооб'єктів матеріалу або таких тест-об'єктів, де іншими методами віруси імунодефіциту не виявляються, наприклад, змиви з носоглотки, слина.

Крім описаних методів діагностики, допустимим визнається виявлення антигенемії, яка зумовлена білком р24. Цей р24-антиген можна визначити за допомогою модифікованих методів ІФА.

Одержання позитивного результату при застосуванні одного з наведених методів є достатнім аргументом для встановлення етіологічного діагнозу ВІЛ-інфекції.

Вірусологічна діагностика СНІДу – достатньо складний процес, доступний для виконання тільки у високоспеціалізованих лабораторіях, де створюються всі

необхідні умови для роботи (захист персоналу від зараження під час культивування, очищення та концентрування ВІЛ) і є висококваліфіковані фахівці.

Таким чином, при наявності ВІЛ-інфекції у вірусоносіїв або хворих на СНІД можна виявити такі вірусспецифічні маркери: антитіла до ВІЛ, безпосередньо інфекційний вірус, провірус у ДНК уражених імуніцитів, вірусний антиген у сироватці крові та інфікованих клітинах-мішенях.

Розділ 14 ШПИТАЛЬНІ ІНФЕКЦІЇ

Захворювання мікробної етіології, що виникають у госпіталізованих хворих під час перебування їх у стаціонарах або у медичних працівників під час роботи в них, називаються нозокоміальними або *внутрішньолікарняними (шпитальними) інфекціями*.

Зустрічаються вони в усіх країнах світу і є серйозною проблемою для лікувально-профілактичних закладів охорони здоров'я. Вони, як правило, приєднуються до основного захворювання або вперше виникають у новонароджених

Розрізняють такі основні групи нозокоміальних інфекцій: бактеріемії й септицемії, гнійно-запальні ускладнення ран і опіків, гострі кишкові, респіраторні, уrogenітальні, посттрансфузійні інфекції та захворювання, обумовлені довготривалим лікуванням антибіотиками.

Збудниками цих захворювань можуть бути найрізноманітніші види бактерій, вірусів, грибів і найпростіших. Однак провідна роль належить представникам кокової групи, бактероїдам, клостридіям та численним грамнегативним паличкам. Питома вага грамнегативних бактерій у виникненні шпитальних інфекцій з року в рік зростає.

Мікробіологічна діагностика внутрішньолікарняних інфекцій має свої особливості і труднощі. У зв'язку з великою різноманітністю збудників потрібно застосовувати різні методи дослідження. При бактеріологічній діагностиці гнійно-запальних захворювань часто виділяють мікробні асоціації (стафілококи і грамнегативні бактерії, декілька видів ентеробактерій тощо). Коли ж виділяють умовно-патогенні мікроорганізми, важливо визначати їх кількість у досліджуваному матеріалі. Критична концентрація складає 10^5 - 10^6 клітин в 1 мл. Але кількість мікробів у досліджуваному матеріалі може дуже різнитися. Тому важливо проводити і видову ідентифікацію бактерій та визначати їх потенційні патогенні властивості. Необхідно також ставити відповідні серологічні реакції для виявлення специфічних антигенів у крові хворого, визначати антитіла (особливо наростання їх титру) до автоштамів, і тим самим обґрунтовано підтверджувати діагноз.

Нижче наведені основні методичні прийоми мікробіологічної діагностики окремих госпітальних інфекцій, які найчастіше зустрічаються в лікарняних закладах.

Бактеріємії й септицемії, як одні з тяжких форм назокоміальних інфекцій, можуть спричинити практично майже всі види патогенних мікроорганізмів. Грампозитивні бактеріємії найчастіше викликають золотисті й епідермальні стафілококи та стрептококи, а грамнегативні бактеріємії – ешерихії, клебсієли, псевдомонади, протей, серації, нейсерії. Збудниками септицемії найчастіше є бактероїди та кластридії.

Точний діагноз цих форм назокоміальних інфекцій можна встановити лише після виділення гемокультури. Для проведення мікробіологічного аналізу беруть лише венозну кров (по можливості до прийому або через 12-24 год після останнього прийому антибактеріальних препаратів). При цьому необхідно дотримуватись жорстких правил асептики В місці венепункції шкіру обробляють 70 % спиртом, потім одним із антисептиків (йодоформ, хлоргексидин) і знову спиртом. Оброблена поверхня повинна висохнути і лише через 1-2 хв беруть 10-20 мл крові (у дітей 3-5 мл).

Посіви проводять у 2 флакони (по 5-10 мл) із збагаченими живильними середовищами у співвідношенні 1:10 і швидко надсилають до лабораторії, не допускаючи заморожування Один флакон інкубують у звичайних аеробних умовах, другий – заливають вазеліновим маслом, щоб забезпечити ріст анаеробів Для виділення аеробних бактерій використовують “подвійне середовище” (скошений агар і цукровий бульйон у одному флаконі: посів крові проводять у бульйон і при інкубації періодично зрошують ним скошену частину агару, на якому потім виростають ізольовані колонії). Для анаеробних бактерій використовують тіогліколевий бульйон та середовище Кітта-Тароцці, для грибів – рідке середовище Сабуро.

Мікроскопічне дослідження крові, зазвичай, не проводять, оскільки виявити бактерії у мазках вдається дуже рідко.

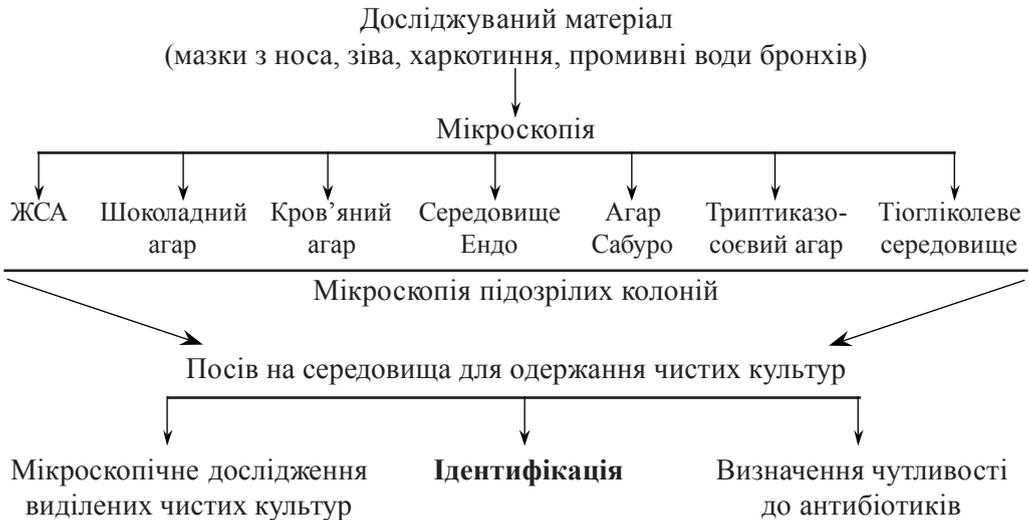
Засіяні середовища у флаконах витримують у термостаті при 37 °С впродовж 7 днів, контролюючи наявність росту макро- і мікроскопічно кожного дня, роблять висіви на відповідні щільні середовища з метою виділення та ідентифікації чистих культур, вивчення їх біологічних властивостей і чутливості до антибіотиків. При відсутності росту протягом тижня проводять повторне дослідження на 14-ий день. Якщо росту немає протягом двох тижнів, результат вважають негативним. При виділенні бактероїдів дослідження може тривати три і більше тижнів.

Для підвищення частоти виявлення бактерій рекомендують брати кров для виділення гемокультури тричі впродовж доби.

Захворювання дихальних шляхів (риніти, фарингіти, бронхіти, пневмонії, абсцеси і гангрені легень та ін.) викликають паличка інфлуенци, пневмококи, мікоплазми, пневмоцисти, а також орто- і параміксовіруси, рино- і коронавіруси, адено- і респіраторно-синцитіальні віруси. Внутрішньолікарняні інфекції дихальних шляхів (особливо пневмонії) домінують серед всіх інших захворювань.

Основним матеріалом для дослідження є мазки з носа, рото- і носоглотки, харкотиння та промивні води бронхів. Порівняно рідко досліджують біоптати ле-

Схема бактеріологічного дослідження при захворюваннях дихальних шляхів



гень, аспірати трахеї. Мазки беруть тампонами натще до чищення зубів, полоскання рота, носа і глотки. Синтетичну гігроскопічну вату для виготовлення тампонів використовувати не слід, оскільки вона містить альгінат натрію, який згубно впливає на мікрофлору. Для кожної ніздрі беруть окремий тампон. При заборі матеріалу з ротоглотки не можна торкатись тампоном до слизової рота і язика. Матеріал із носоглотки беруть спеціальним задньоглотковим тампоном.

Ранкову порцію харкотиння збирають у стерильну банку. Перед цим хворий чистить зуби і прополіскує рот кип'яченою водою для видалення залишків їжі, епітеліальних клітин та мікрофлори ротової порожнини.

Досліджуваний матеріал спочатку мікроскопують у мазках, забарвлених за Грамом, й одночасно проводять посів. Мікроскопія є важливим орієнтиром для вибору оптимальних живильних середовищ.

При перегляді мазків оцінюють загальну картину мікрофлори наявність стафіло-, мікро- і стрептококів, нейсерій, капсульних пневмококів і клебсіел, грамнегативних паличок, міцелію і бластоспор грибів. При гострій інфекції в харкотинні виявляють бактерії, розміщені поблизу лейкоцитів. Мікроорганізми з ротової порожнини розташовуються навколо епітеліальних клітин, їх до уваги не беруть. Скоріше всього вони свідчать про порушення техніки забору. В таких випадках взяття матеріалу необхідно повторити.

Посіви проводять на кров'яний і шоколадний агар, ЖСА, середовища Ендо і Сабуро, які попередньо підігрівають у термостаті. При посіві тампоном матеріал спочатку втирають в середовище на невеликій ділянці (2-3 см²), а потім штрихами по всій поверхні середовища,

Перед посівом харкотиння спочатку виливають у чашку Петрі, вибирають 2-3 гнійні грудочки, тричі відмивають їх від супутньої мікрофлори в стерильному

ізотонічному розчині хлориду натрію і наносять на середовище. Посів проводять стерильним скляним шпателем, рівномірно розтираючи матеріал по поверхні середовища. Через 18-24 год інкубації в термостаті підраховують кількість колоній, виділяють чисті культури та проводять їх ідентифікацію загальноприйнятими методами. Обов'язково визначають їх чутливість до антибактеріальних препаратів

Як додатковий використовують і кількісний метод визначення бактерій у харкотинні. Для цього 1 мл харкотиння гомогенізують в 9 мл бульйону чи пептонної води за допомогою скляних бусинок у колбі протягом 20 хв, або в ступках із стерильним кварцевим піском. Потім із гомогенізованого матеріалу готують серійні розведення від 10^{-1} до 10^{-7} і по 0,1 мл із останніх трьох розведень висівають на кров'яний агар. На середовища Ендо і Сабуро сіють 0,1 мл початкового розведення (1:10) Через 24 год інкубації в термостаті підраховують кількість колоній кожного виду мікроорганізмів. Діагностично значущим є виявлення *S.pneumoniae* і *H.influenzae* в концентрації 10^6 і більше бактерій в 1 мл. Для умовно-патогенних мікроорганізмів така концентрація має значення при 2-3-кратному їх виявленні з інтервалом у 3-5 днів.

Важливе значення має кількісна оцінка колоній і при первинному посіві на щільні середовища. При цьому використовують такі критерії (ступені): перший – ріст поодиноких колоній (до 10); другий – ріст від 10 до 25 колоній; третій – ріст 50 і більше колоній; четвертий – суцільний ріст, колонії не можна підрахувати.

Третій-четвертий ступінь, як правило, свідчить про етіологічну роль даного мікроорганізму, перший і другий – про носійство або контамінацію.

При підозрі на вірусні інфекції дихальних шляхів досліджуваний матеріал направляють до вірусологічної лабораторії, де проводять відповідні вірусологічні дослідження.

Гнійно-запальні, ранові та опікові інфекції. Збудниками ранових і гнійних післяопераційних ускладнень є стафіло- і стрептококи, грамнегативні бактерії, клостридії, бактероїди, фузобактерії та ін. Остеомієліти, мастити, омфаліти, отити найчастіше викликають золотистий і епідермальний стафілококи, апендицити і перитоніти – ешерихії, протей, бактероїди, ентерококи, клібсієли, часто в асоціаціях зі стафілококами. Опікові інфекції спричиняють стафілококи, псевдомонади та інші грамнегативні бактерії, представники нормальної мікрофлори шкіри та слизових оболонок.

Матеріал із рани або поверхні опіків беруть двома стерильними тампонами (один – для виготовлення мазків, другий – для посіву). Гній, шматочки видалених тканин, промивну рідину з дренажів забирають у стерильні пробірки при дотриманні правил асептики і протягом години доставляють до лабораторії. При ураженні зовнішнього вуха проводять спочатку обробку шкіри 70 % спиртом, потім беруть матеріал стерильним ватним тампоном. Якщо запальний процес локалізується в середньому або внутрішньому вусі, досліджують пунктат і матеріал, взятий під час операцій. Матеріал із кон'юнктиви, рогівки і повік беруть бактеріологічною петлею (або маленьким тампоном). Забір матеріалу проводить лікар-окуліст.

Виготовлені для мікроскопії мазки фарбують за Грамом (в разі потреби за Романовським-Гімзою або Цілем-Нільсеном). При виявленні мікроорганізмів описують їх морфологічну характеристику і густину обсіменіння. За результатами мікроскопії вибирають живильні середовища і вносять корективи в хід мікробіологічного дослідження.

Посіви матеріалу роблять на 5 % кров'яний агар, цукровий бульйон та середовище для контролю стерильності. Посів на щільні середовища проводять за методом "тампон-петля". Спочатку тампоном проводять доріжку по діаметру чашки, потім другою стороною тампона засівають ще одну "доріжку" паралельну першій. Після цього матеріал розсівають петлею штрихами, перпендикулярними до "доріжок". Такий посів дає можливість виділити бактерії у вигляді окремих колоній навіть із мікробних асоціацій.

Посіви на щільні та в рідкі середовища інкубують при 37 °С протягом доби. При виявленні росту окремі колонії відсівають на елективні середовища з метою їх ідентифікації. Обов'язково відмічають чи мікроби ростуть у вигляді монокультури, чи в асоціації. При наявності асоціацій відмічають переважний ріст того чи іншого представника асоціації. В ряді випадків рекомендують проводити і кількісні дослідження, визначаючи концентрацію мікробів в 1 мл гною, ексудату чи в 1 г видаленої тканини.

При підозрі на наявність у досліджуваному матеріалі грибів, посів додатково проводять ще й на середовище Сабуро і вирощування здійснюють при температурі 22-25 °С протягом 5 діб. При підозрі на виділення нейсерій посіви проводять на сироватковий агар і тіогліколевий бульйон. Інкубацію проводять при 37 °С в ексикаторі при 5-10 % CO₂.

Виділені чисті культури ідентифікують за морфологічними, культуральними, біохімічними та антигенними їх властивостями, як це описано у відповідних розділах спеціальної мікробіології.

Урогенітальні інфекції. Цистити, уретрити, пієлонефрити, уросепсис та ін. можуть викликати стафіло- і стрептококи, протей, ешерихії, псевдомонади, клебсієли, мікоплазми. При бактеріологічному дослідженні важливо правильно взяти пробу, провести якісне і кількісне визначення мікроорганізмів в 1 мл сечі ще до початку антимікробної терапії.

Безпосередньо перед забором сечі необхідно обмити з милом зовнішні статеві органи. У стерильний посуд беруть 3-5 мл середньої порції сечі і засівають біля ліжка хворого або доставляють до лабораторії протягом 30 хв. У разі неможливого негайного дослідження сечу зберігають у холодильнику не більше 24 год.

Для посіву сечі біля ліжка хворого рекомендують метод "предметного скла". Стерильне предметне скло покривають шаром розтопленого агару і після застигання середовища занурюють у стаканчик із сечею, виймають, дають сечі стекти, інкубують скельце в чашці Петрі 18-24 год при 37 °С. Ізольовані колонії ідентифікують.

З метою кількісного мікробіологічного дослідження сечі найчастіше використовують метод каліброваної петлі, якою проводять секторні посіви (рис. 95).

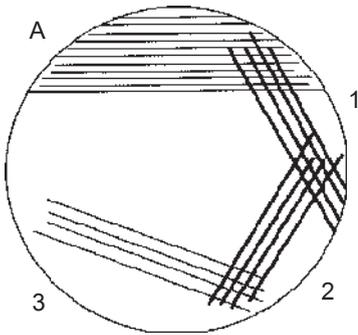


Рис. 95. Схема повторних посівів каліброваною петлею.

Платиною петлею, діаметром 2 мм (ємність 0,005 мл), проводять посів сечі (30-40 штрихів) на агар в секторі А. Петлю стерилізують у полум'ї пальника і проводять нею 4 штрихових посіви з сектора А в сектор 1, із сектору 1 у сектор 2, із сектору 2 в сектор 3. Чашки інкубують протягом доби при 37 °С, після чого підраховують кількість колоній, що виростили в різних секторах. Ступінь бактеріурії визначають за методом Гоулда (табл. 74).

Метод секторних посівів дає можливість не тільки визначати ступінь бактеріурії, а й виділяти збудника в чистій культурі.

В 1 мл сечі здорової людини міститься не більше 10^4 бактерій (критичне число 10^5 мікробів) При виявленні 10^6 - 10^8 і більше бактерій в 1 мл сечі наявність інфікування сечовивідних шляхів вважають безсумнівним.

Для визначення локалізації інфекційного процесу в нирках чи сечовому міхурі проводять катетеризацію останнього. За допомогою катетера випускають всю сечу і промивають сечовий міхур розчином антибіотика (неоміцин), потім тричі з інтервалом 10 хв беруть проби сечі для бактеріологічного дослідження. Якщо інфекційний процес уражує нирки, в усіх трьох пробах сечі будуть знаходитись бактерії, кількість яких зростає в кожній наступній порції. При інфекції тільки сечового міхура сеча залишається стерильною.

Гнійно-запальні процеси жіночих статевих органів (уретрити, вульвовагініти, цервіцити, ендометрити, бартолініти та ін.) можуть викликати як облігатні

Таблиця 74

Визначення інтенсивності бактеріурії за Гоулдом

Кількість колоній в секторах				Кількість бактерій в 1 мл сечі
А	1	2	3	
1-6	-			<1000
8-20	-	-	-	3000
21-30	-	-	-	5000
31-60	-	-	-	10000
70-80	-	-	-	50000
100-150	5-10	-	-	100000
Не підраховуються	20-30	-	-	500000
-"	40-60	-	-	1 млн
-"	100-140	10-20	-	5 млн
-"	не підраховується	30-40	-	10 млн
-"	-"	60-80	поодинокі колонії	100 млн

анаероби (бактероїди, пептострептококи, трепонеми, клостридії, гарднерели), так і факультативні анаероби (ентерококи, стафілококи, ешерихії, клебсієли, протей, псевдомонади, гриби кандиди та ін.).

Основою мікробіологічної діагностики цих захворювань є виділення та ідентифікація мікроорганізмів і встановлення їх етіологічної ролі. Бактеріологічні дослідження мікрофлори жіночих статевих органів мають певні труднощі, оскільки вона часто змінюється в різні періоди життя жінки. Лише порожнина і придатки матки в нормі стерильні.

Взяття матеріалу для дослідження проводить акушер-гінеколог. Взірці матеріалу з уретри беруть ранком до сечовипускання бактеріологічною петлею або ложечкою Фолькмана. З вульви, піхви і шийки матки матеріал забирають ватним тампоном до проведення мануального дослідження. Для взяття матеріалу з порожнини матки використовують пристрої, що можуть розкриватись і закриватись на певній глибині (напр. шприц-аспіратор). При запаленні придатків матки матеріал беруть за допомогою пункції або при оперативному втручанні. Слід пам'ятати, що більшість збудників швидко гине в зовнішньому середовищі. У зв'язку з цим посіви необхідно проводити негайно або вносити проби в тіогліколеве чи гліцеринове середовище.

Одночасно із взяттям матеріалу для посіву готують окремими тампонами 2-3 мазки для мікроскопії, обережно розподіляючи матеріал на стерильних скельцях м'якими рухами, не вживаючи грубого втирання, висушують при кімнатній температурі. Мазки направляють до лабораторії в чашках Петрі або покривають чистими предметними скельцями. При такій техніці виготовлення мазків зберігається справжній розподіл і кількісне співвідношення компонентів досліджуваного матеріалу, дає можливість виявляти внутрішньоклітинне розташування бактерій (нейсерії).

Мазки фарбують за Грамом і мікроскопують під імерсійним об'єктивом. Відмічають кількість епітеліальних клітин, лейкоцитів, характер мікрофлори та визначають ступені чистоти вагінального секрету. Виявлення в мазках трихомонад, мікоплазм, уреоплазм, міцелію або бластоспор грибів має важливе діагностичне значення.

Для виділення факультативних анаеробів посіви проводять тампоном за допомогою штрихового методу на кров'яний агар і середовище Ендо, потім сіють тим же тампоном у цукровий бульйон. При підозрі на наявність анаеробів посіви проводять у тіогліколевий бульйон та середовище Кітта-Тароцці. В разі виявлення міцелію або бластоспор грибів, посіви роблять на агар Сабуро. При дослідженні шматочків тканин їх спочатку розтирають у ступці з піском, додають бульйон або 0,85 % розчин хлориду натрію. По 0,1 мл гомогенату засівають на щільні середовища, а також у цукровий бульйон.

Посіви вирощують у термостаті при 37 °С (на агарі Сабуро при 22-25 °С), щодня перевіряючи наявність росту. Підраховують кількість різних видів колоній та їх співвідношення. При помутнінні бульйону виготовляють мазки й за результатами мікроскопії роблять висіви на щільні середовища (кров'яний агар, Ендо,

ЖСА) Потім виділяють чисті культури, ідентифікують їх і визначають чутливість до антибіотиків.

При дослідженні матеріалу з ділянок, де в нормі вегетує своя мікрофлора, важливе значення має кількісна оцінка різних видів бактерій при первинному посіві. При цьому використовують такі критерії (ступені):

I – дуже слабкий ріст – ріст тільки в рідких середовищах, на щільних середовищах росту немає.

II – слабкий ріст – на щільному агарі ріст до 10 колоній.

III – помірний ріст – на щільному агарі ріст більше 100 колоній.

IV – дуже густий (суцільний) ріст.

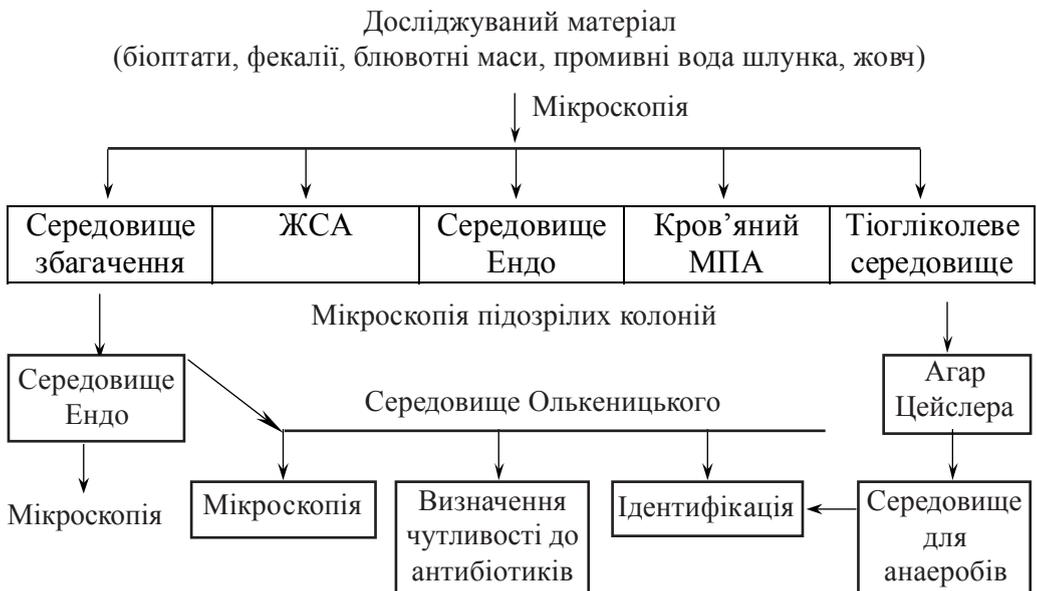
Перший і другий ступені росту вказують частіше на стороннє забруднення, третій і четвертий – на етіологічну роль даного мікроорганізму.

Негативний результат дослідження видають при відсутності росту на всіх середовищах протягом 72 год (на агарі Сабуро – впродовж 5 діб).

Гострі кишечні інфекції. Збудниками харчових інтоксикацій є ентеротоксигенні стафілококи, палички ботулізму та інші види клостридій. Харчові токсикоінфекції здатні викликати численні види ентеробактерій, псевдомонад, вібріонів, бацил, кампілобактерії та ін. Особливо часто виникають внутрішньолікарняні випадки сальмонельозів. Окрім того, їх можуть викликати ротавіруси та криптоспоридії.

Для виявлення збудників захворювань в різних ділянках кишечного тракту використовують переважно бактеріологічний метод дослідження. При ураженні шлунка найоптимальнішим вважають забір біоптатів під час фіброгастроскопії. Взяті проби вміщують у стерильний ізотонічний розчин і направляють до лабора-

Схема бактеріологічного дослідження при кишечних інфекціях



торії. Але найчастіше в якості досліджуваного матеріалу для діагностики кишкових інфекцій забирають фекалії, блювотні маси і промивні води шлунка.

Бактеріологічне дослідження потрібно розпочинати не пізніше 0,5-1 год після взяття матеріалу. Якщо це неможливо, проби слід заморозити і дослідити не пізніше 24 год. Іноді для транспортування доцільно вживати консервуючі рідини (30 % гліцерин, селенітовий бульйон тощо). Промивні води необхідно досліджувати негайно. При великій кількості їх краще центрифугувати і дослідити осад. Жовч беруть за допомогою зондування окремими порціями (А, В, С) у три стерильні пробірки. Взяті проби направляють до лабораторії не пізніше 1-2 год. Матеріал із тонкої кишки відбирають за допомогою фібродуоденоскопії або спеціальним зондом, що відкривається і закривається в заданому місці. Мікроорганізми товстої кишки вивчають при дослідженні фекалій. Мазок із прямої кишки беруть тампоном або трубкою Цімана. При ураженні нижніх відділів товстого кишечника можна взяти матеріал безпосередньо з місця ураження за допомогою ректороманоскопа, але цей метод останнім часом використовують рідко. Частіше для цього застосовують фіброколоноскопію.

Посіви досліджуваного матеріалу проводять на щільні та рідкі елективні середовища, виділяють чисті культури, визначають їх чутливість до антибіотиків.

При оцінці результатів бактеріологічного дослідження необхідно звертати увагу не тільки на видовий склад мікробіоценозу кишечника у даного хворого, а й кількісне співвідношення окремих його співчленів.

Якщо з випорожнень виділяють патогенні ентеробактерії, гемолітичні ешерихії та гемолітичні стафілококи, які у здорових людей відсутні, це має важливе діагностичне значення. Для визнання етіологічної ролі представників нормального мікробіоценозу важливо порівнювати їх титр з концентрацією відповідних мікроорганізмів у здорових дітей і дорослих. При ураженнях, викликаних іншими видами, необхідно проводити дослідження у відповідності з методикою виділення кожного збудника.

Частина V

МІКОЗИ

Захворювання, що викликаються патогенними та умовно-патогенними грибами, називаються мікозами. Для людини хвороботворними є біля ста видів грибів, які входять до семи класів: хітрідіоміцетів, гіфохітрідіоміцетів, ооміцетів, зигоміцетів, аскоміцетів, базидіоміцетів і дейтеромицетів. Розрізняють такі основні групи грибкових захворювань людини:

1. Поверхневі мікози або сапрофітії, при яких уражається роговий шар епідермісу і поверхні волосяних стержнів.

2. Дерматомікози – ураження шкіри, її придатків, волосся і нігтів.

3. Підшкірні мікози – патологічний процес первинно локалізується в тканинах під шкірою, рідко у м'язах, кістках і суглобах.

4. Системні (респіраторні) мікози – первинне вогнище розмноження грибів у легенях, рідше зустрічаються дисеміновані форми з ураженням будь-яких внутрішніх органів (глибокі мікози).

5. Опортуністичні мікози (аспергільози, пеніцильози, кандидози) – виникають у осіб з імунодефіцитами.

Розділ 15

МЕТОДИ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ МІКОЗІВ

Для мікробіологічної діагностики мікозів використовують мікроскопічні, мікологічні (культуральні), імунологічні (серологічні, алергічні та ін.), біологічні та гістологічні методи дослідження. При мікозах уражуються різні тканини і органи: шкіра і слизові оболонки, органи дихання і кишечного тракту, серцево-судинна і нервова системи, органи кровотворення, селезінка й печінка, лімфатична і сечостатева системи та ін. Залежно від клінічних проявів патологічного процесу матеріалом для дослідження може бути гній, харкотиння, зскрібки зі шкіри і нігтів, пунктати лімфовузлів і кісткового мозку, уражене волосся, кров, ліквор, шлунковий сік, жовч, сеча, випорожнення, біоптати тканин та ін.

Забір патологічного матеріалу. Успіх лабораторного дослідження залежить від правильного взяття матеріалу. При ураженні шкіри лусочки з периферії свіжого вогнища ураження беруть скальпелем, а пушкові волоски – пінцетом. При висипках на ступнях і кистях їх верхівки зрізають ножицями чи бритвою. Зскрібки з поверхневих уражень нігтів проводять скальпелем, а стовщені їх ділянки зрізають манікюрними кусачками. Гній із відкритих уражень та виразок беруть ложечкою Фольк-

мана, жолобкуватим зондом, пастерівською піпеткою; із закритих вогнищ, порожнин, абсцесів, лімфатичних вузлів – шприцом. Проби харкотиння, жовчі, випорожнень вміщують у стерильні баночки з притертими пробками. Спинномозкову рідину беруть шляхом пункції шприцом, сечу – катетером при дотриманні правил асептики. Кров беруть із ліктьової вени у кількості 10 мл і вносять у флакони із рідким живильним середовищем. Біоптати вміщують у стерильну чашку Петрі.

Досліджуваний матеріал беруть з таким розрахунком, щоб його вистачило для виготовлення нативних і забарвлених препаратів, посіву в живильні середовища, постановки біопроби та гістологічного дослідження. У направленні до лабораторії вказують прізвище та ініціали хворого, його вік, попередній діагноз, локалізацію уражень, дату. При підозрінні на гістоплазмоз і кокцидіоїдоз матеріал направляють до спеціальних лабораторій.

Мікроскопічне дослідження. Доставлені до лабораторії проби можна вивчати як у нативних (нефарбованих), так і в забарвлених препаратах.

Нативні препарати, виготовлені з лусочок шкіри, зскрібок із нігтів, волосся попередньо просвітлюють у 10-30 % КОН або Na OH, лактофенолі та інших розчинах, бажано з підігріванням над полум'ям пальника. Оброблений таким способом матеріал наносять на предметне скло в краплю гліцерину, накривають покривним скельцем і досліджують під звичайним світловим мікроскопом, використовуючи сухі об'єктиви (8×, 40×). Кращі результати отримують при фазово-контрастній або аноптральній мікроскопії. При дослідженні гною, харкотиння, осаду спинномозкової рідини, жовчі та сечі виготовляють препарат надавленої краплі в ізотонічному розчині хлориду натрію. Дослідження нативних препаратів дає змогу визначити характер розташування спор грибів у волосках, міцелію в уражених шкірних лусочках і зскрібках із нігтів, у деяких випадках навіть родову належність збудника. Остаточне визначення виду грибів можливе лише після виділення та ідентифікації чистих культур.

Виготовлення забарвлених препаратів необхідно при дослідженні виразкового вмісту, виділень із нориць, грануляцій тощо. Такий в'язкий і рідкий матеріал розмазують на предметному склі тонким шаром. Зскрібки із грануляцій попередньо розділяють препарувальними голками. Потім мазки фіксують формаліном, сумішшю Никифорова або Карнуа чи 5 % розчином хромової кислоти, висушують на повітрі й забарвлюють одним із рекомендованих способів залежно від мети дослідження і гаданої форми. Найчастіше використовують методи Грама-Вельша, Романовського-Гімзи, Мак-Мануса, Аравійського, Адамсона та ін. Вони детально описані у спеціальних монографіях і посібниках (див. список літератури в кінці книги). У забарвлених мазках краще виявляють окремі елементи грибів та їх тонкі структури, ніж у нативних препаратах.

У ряді випадків проводять і електронно-мікроскопічні дослідження, особливо коли необхідно дослідити ультраструктуру грибів або механізм дії протигрибкових препаратів.

Мікологічні (культуральні) дослідження спрямовані на виділення чистих культур грибів при посівах патологічного матеріалу на живильні середовища, вив-

чення їх макро- і мікроскопічної будови та родової і видової ідентифікації. Взятий матеріал необхідно якомога швидше посіяти, щоб попередити розвиток у ньому сторонньої мікрофлори. Виключення становлять шкірні лусочки, які краще сіяти через 1-2 дні, коли кокова флора відмирає на їх поверхні. Однак звільнити матеріал від сапрофітних грибів практично неможливо. Для цього необхідно використати спеціальні елективні і селективні середовища.

Найчастіше посіви проводять на рідкі (пробне середовище Сабуро, пивне сусло, м'ясо-пептонний глюкозний бульйон) та щільні середовища (агар Сабуро, сусло-агар, глюкозо-кров'яний агар, картопляний і кукурудзяний агар, середовища Чапека і Френсіса).

Додавання до середовищ антибіотиків (пеніцилін, стрептоміцин, хлорамфенікол по 50-100 ОД/мл) та протигрибкових препаратів дезертomicину і циклогексаміду (відповідно 0,1 і 0,5 мг/мл) робить вказані середовища селективними і є надійним захистом первинних посівів від проростання бактеріями і пліснявою.

Лусочки шкіри, частинки нігтів і волосків при посіві розташовують на агарі в пробірці трьома точками; харкотиння, гній та інший рідкий матеріал сіють точкою або штрихом у пробірках та чашках Петрі. Дуже часто результати посівів залежать від кількості засіяного матеріалу. Як правило, з однієї проби сіють матеріал в 3-4 пробірки або 2 чашки Петрі. Вирощування (інкубацію) посівів проводять у термостаті при порівняно низьких температурах (22-28 °С) протягом 2-3 тижнів.

На рідких середовищах багато видів грибів ростуть у вигляді повстяноподібного утворення спочатку на дні, а потім на стінках пробірки або ж у вигляді суцільної плівки на поверхні бульйону. На щільних середовищах окремі види утворюють різноманітні колонії: блискучі, гладенькі, щільної консистенції, пухнасті, ватоподібні, що погано знімаються петлею, оксамитово-ворсинчасті, гіпсо- та борошноподібні, крупнобугристі, що врастають у товщу агару тощо.

Виділені культури грибів ідентифікують за зовнішнім виглядом і формою колоній, їх консистенцією, кольором та мікроструктурою, тобто характером міцелію, розташуванням конідієносців, спор та іншими ознаками. У деяких видів грибів вивчають і їх ферментативні властивості.

Недавно запропоновано новий метод ідентифікації патогенних грибів, особливо збудників таких системних мікозів як бласто-, крипто-, кокцидіоїдозів, гістоплазмозу шляхом визначення нуклеїнових кислот. Із культури екстрагують РНК і вносять одноланцюгові молекули ДНК, мічені флуоресцеїном. При наявності в культурі одного із вказаних грибів проходить гібридизація відповідної ДНК із РНК збудника з утворенням комплексу, що легко виявляється. Цей метод можна використати в ранні строки культивування грибів (4-5 діб).

Хороші перспективи для швидкого виявлення грибів або їх антигенів у досліджуваному матеріалі відкриває метод полімеразної ланцюгової реакції.

Імунологічні дослідження. У сироватці крові хворих на мікози утворюються аглютиніни, преципітини, комплементзв'язуючі антитіла, гемаглютиніни, реакіни, які виявляють за допомогою реакцій аглютинації, преципітації, зв'язування

комплементу, гемаглютинації та постановки алергічних проб. Імунологічні реакції мають особливо важливе значення у випадках ураження пацієнтів двома і більше видами мікозів. Окрім того, серологічне дослідження виявляється цінним при кандидозах і аспергільозах, коли мікологічний метод може лише виявити кандиди і аспергіли, але неспроможний доказати їх етіологічну роль. Адже ці гриби часто виділяють і у здорових людей. Однак слід пам'ятати, що результати імунологічних реакцій часто можуть бути сумнівними внаслідок перехресного реагування антитіл з антигенами різних видів грибів. У зв'язку з цим жодна із серологічних реакцій не має вирішального значення при діагностиці відповідних мікозів. Виявлення високих титрів антитіл в сироватці крові, особливо методом парних сироваток, дозволяє раніше поставити діагноз, ще до отримання результатів культивування грибів.

Найчастіше використовують реакції латекс-аглютинації, імуофлуоресценції, преципітації (за методом Оухтерлоні або зустрічного імуоелектрофорезу), зв'язування комплементу, непрямой гемаглютинації та імуоферментний аналіз. Методика постановки цих реакцій така сама, як і при діагностиці бактеріальних інфекцій.

Для виявлення мікотичної алергії проводять постановку епікутанних, скарифікаційних і внутрішньошкірних проб з відповідними алергенами (убиті культури грибів, їх фільтрати, білкові або полісахаридні фракції з клітин чи оболонки відповідних збудників). Результати проб враховують через 20 хв (негайні) і через 24-48 год (уповільнені). Вони проявляються у вигляді почервоніння, набряку, рідше – некротизації у місці введення алергену. У окремих осіб можуть виникати нездужання, незначне підвищення температури, зміни з боку крові. Позитивна проба на кокцидіоїдин і гістоплазмін у регіонах, ендемічних відносно кокцидіоїдомікозу, вказує на давно минулу або недавню інфекцію. Однак у країнах, де такі мікози зустрічаються дуже рідко, позитивна алергічна реакція має певну діагностичну цінність.

Алергізацію організму негайного типу до грибів можна виявити і за допомогою імунологічних тестів *in vitro*: реакції дегрануляції тканинних базофілів, базофільний тест Шеллі та ін. Для виявлення гіперчутливості уповільненого типу ставлять реакції бласттрансформації лімфоцитів і гальмування міграції фагоцитів.

Біологічний метод використовується при глибоких і особливо небезпечних мікозах для виділення культури збудника, визначення його патогенності, ідентифікації тканинних форм грибів. При зараженні тварин використовують як патологічний матеріал від хворого, так і виділену культуру. Найбільш придатними тваринами є лінійні білі миші та золотисті хом'ячки. Окрім них, біопробы можна ставити на гвінейських свинках, щурах, кроликах, собаках і котах. Досліджуваний матеріал вводять нашкірно, внутрішньошкірно, підшкірно, внутрішньом'язово, внутрішньоочеревинно, інтраназально, інтратрахеально, інтрацеребрально, через рот. Внутрішньошкірне зараження найчастіше проводять дерматофітами, інтраназальне і внутрішньоочеревинне – особливо небезпечними грибами, інтрацеребральне – при криптококозах, кладоспоріозах, кандидозах. Розроблені також спе-

ціальні експериментальні моделі при легневих, кишкових, ниркових, септичних ураженнях, оніхімікозах тощо. Результати перебігу мікозів у лабораторних тварин враховують за характером утворення тканинних форм грибів, властивостями виділеної культури, даними гістологічних та серологічних досліджень.

Біологічний метод використовують також для виявлення зараженості різних об'єктів зовнішнього середовища грибами та їх спорами.

Гістологічні дослідження дають можливість не тільки виявити збудників мікозів у тканинах, вивчити особливості їх будови, а й оцінити особливості та інтенсивність патологічного процесу. Матеріал для таких досліджень беруть під час оперативних втручань, при біопсіях і автопсіях. Шматочки об'ємом 2-3 см³ фіксують формаліном, заливають у парафін або целоїдин. Гістологічні зрізи забарвлюють генціановим крезильовим фіолетовим, за методом Грама-Вейгерта, Гоморі-Грокотта та ін. Послідовність етапів такого дослідження і особливості структури грибів викладені при описанні лабораторної діагностики окремих мікозів.

Розділ 16

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ОКРЕМИХ МІКОЗІВ

Кандидоз

Кандидоз (кандидомікоз) – опортуністична інфекційна хвороба шкіри, слизових оболонок і внутрішніх органів, яку викликають дріжджоподібні гриби роду *Candida* родини *Cryptococcaceae* класу дейтеромицетів. Основним збудником є *Candida albicans*, значно рідше – *C. tropicales*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*. Від інших грибів вони відрізняються відсутністю справжнього міцелію. Часом утворюють псевдоміцелій – подовжені клітини, що об'єднуються в ланцюжки, які можуть мати термінальні хламідоспори.

Кандидоз зустрічається повсюдно, найчастіше як ускладнення після багатьох інфекційних захворювань, при довготривалому нераціональному лікуванні антибіотиками і антисептиками, які пригнічують нормальну мікрофлору організму, при первинних і вторинних імунодефіцитах. Виділяють чотири основні форми кандидозів:

1. Локальні – ураження шкіри, нігтів, нігтьових валиків, слизових оболонок рота, глотки, вагіни, вульви.
2. Системні – ураження дихальних шляхів, кишечника, сечостатевої та центральної нервової систем.
3. Генералізовані – хронічний гранульоматозний кандидоз, септикопіємія.
4. Вторинні (алергічні) кандидози – на фоні сенсibiliзації організму виникають нові вогнища запалення, в яких збудник відсутній.

Мікробіологічна діагностика кандидозів включає мікроскопію патологічного матеріалу, виділення чистих культур грибів, проведення серологічних реакцій і постановку алергічних проб. При локальних і системних формах захворювання матеріал для дослідження беруть з уражених ділянок – лусочки шкіри, зскрібки з нігтів, слиз, гній, харкотиння, сечу, жовч, ліквор, випорожнення; при генералізованих – кров, пунктати абсцесів, біопсійний матеріал; від трупів – кров із серця, шматочки паренхіматозних органів.

Мікроскопічне дослідження. Під звичайним світловим, фазово-контрастним або аноптральним мікроскопом вивчають нативні (незабарвлені) препарати чи мазки. Щільний патологічний матеріал (шкірні лусочки, зскрібки з нігтів, некротизовані тканини тощо) вносять у краплю 10 % розчину гідроксиду калію або натрію на предметному склі, обережно підігрівають над полум'ям газового пальника протягом 1 хв і накривають покривним скельцем. Матеріал рідкої консистенції досліджують у суміші спирту з гліцерином і водою у співвідношенні 2:1:2, або в розчині Люоголю подвійної концентрації в препаратах надавленої краплі без підігрівання. Мікроскопування проводять спочатку за допомогою об'єктиву 8х, а потім 40х. При наявності в досліджуваному матеріалі кандид у нативних препаратах виявляють круглі або овальні дріжджові клітини, що брунькуються, і псевдоміцелій (рис. 96).

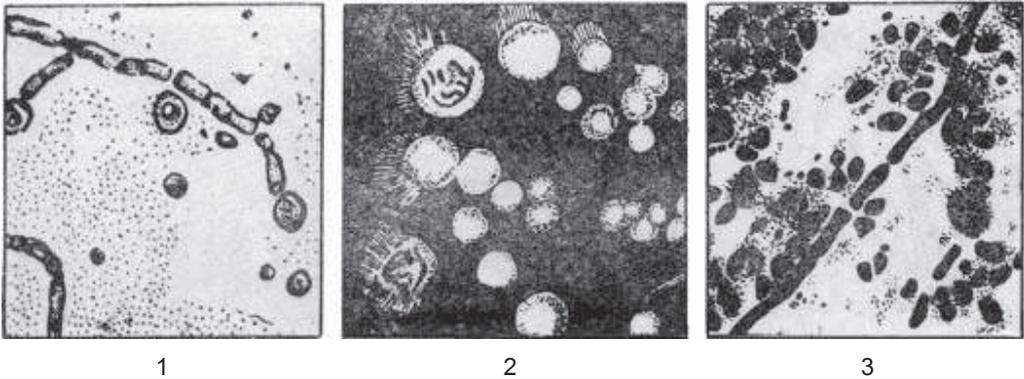


Рис. 96. *C. albicans*: 1 – мазок із матеріалу; 2 – колонії; 3 – псевдоміцелій і хламідоспори (за П.Н. Кашкіним і В.В. Лісіним, 1983).

Гриби кандиди зустрічаються на шкірі, слизових оболонках і у здорових людей, але, як правило, в невеликій кількості. Тому для більш достовірної діагностики кандидозу важливе кількісне визначення кандидат у досліджуваному матеріалі. Виявлення великої їх кількості в патологічних виділеннях (особливо при значних розведеннях) вказує на можливість кандидозу.

Кращі результати дає дослідження забарвлених препаратів. Висушений тонкий мазок на предметному склі фіксують метиловим спиртом або в суміші Никифорова й забарвлюють метиловим синім (1-3 хв), генціановим фіолетовим (2-3 хв), фуксином Пфейфера (1-2 хв). Ще краще фарбувати мазки складними методами. При забарвленні за Грамом кандиди мають темно-фіолетовий колір, за Цілем-

Нільсеном – синій із рожево-жовтуватими включеннями ліпідів, за Романовським-Гімзою – рожево-жовтий із фіолетовими включеннями волютину.

Кандиди можна виявити й при гістологічному дослідженні зрізів із уражених тканин, забарвлених за методом Грама-Вейгерта або Шабадаша. При ранніх строках ураження можна застосувати прямий метод флуоресценції при обробці мазків ізотіоціанатом флуоресцеїну, який дає яскраве золотаво-зелене світіння.

Більш надійно діагноз кандидозу встановлюють за допомогою виділення чистої культури *C. albicans*.

Мікологічне дослідження. Будь-який патологічний матеріал сіють кількісним методом на щільне середовище Сабуро або сусло-агар, а також у глюкозний МПБ. До стерильних середовищ перед посівом додають пеніцилін і стрептоміцин для пригнічення росту супутньої бактеріальної флори. Посіви вирощують при температурі 30 °С. При рості більше 1000 типових колоній з розрахунку на 1 г досліджуваного матеріалу роблять висновок, що кандиди є етіологічним агентом захворювання.

Ізольовані колонії *C. albicans* на агарі Сабуро круглі, білувато-кремові, блискучі, гладенькі, з рівними краями, нагадують краплі майонезу. Вони глибоко врастають у середовище. Для виявлення псевдоміцелію колонії відсівають у одне з рідких середовищ – глюкозний МПБ, картопляну воду або моркв'яно-рисовий відвар. Спочатку з'являється каламуть або осад, рідше – плівка на поверхні середовища. Псевдоміцелій виявляють на 3-5 день або пізніше при мікроскопічному дослідженні надавленої краплі, користуючись об'єктивом 8х.

Диференціально-діагностичні ознаки *C. albicans* мають важливе значення для ідентифікації, оскільки цей вид є основним збудником кандидозу. На термінальних нитках псевдоміцелію *C. albicans* утворюються хламідоспори – двоконтурні круглі структури діаметром 10-20 мкм, бластоспори з'являються в результаті брунькування, розташовуються нерегулярно з обох боків псевдоміцелію.

При культивуванні в сироватці або яєчному білкові при 37 °С через 2-4 год бластоспори утворюють характерні “ростові трубки” або RB – фактор. Ті штами, які за такий короткий строк не набувають “ростових трубок”, як правило, не вірулентні.

Для ідентифікації видів грибів роду *Candida* використовують також їх ферментативну активність. *C. albicans* розкладає глюкозу, мальтозу і галактозу до кислоти й газу, *C. tropicales* – розкладає ті ж вуглеводи і додаткову сахарозу, а *C. krusei* – лише лактозу.

Серологічна діагностика проводиться здебільшого при вісцеральних формах кандидозів. При цьому використовують реакції аглютинації, зв'язування комплекменту, преципітації, непрямой гемаглютинації, зустрічного імуноелектрофорезу та метод ІФА з парними сироватками з використанням загальноприйнятих методик. Результати вважають позитивними при наростанні титру відповідних антитіл у 4 і більше разів. Для постановки реакції аглютинації, преципітації та зв'язування комплекменту краще використовувати антигени з культур, виділених від даного хворого (автоштами). Для більш надійної серологічної діагностики кандидозу краще використовувати не одну з названих реакцій, а дві-три.

Біологічна проба використовується при необхідності визначити патогенність і вірулентність *C. albicans*. Виділену від хворого культуру вводять внутрішньовенно білим мишам або кроликам. Патогенними визнають ті культури, які в дозі 1 млн клітин викликають загибель мишей протягом п'яти діб, а кроликів – через дев'ять діб.

Шкірні алергічні проби проводять шляхом внутрішньошкірного введення кандиди-алергену. В якості алергену можна використовувати полівалентну вакцину, що містить 200 млн клітин в 1 мл. Після нагрівання вакцини при 80 °С протягом 2-х год її вводять в об'ємі 0,1 мл внутрішньошкірно. Позитивну реакцію (гіперемія, набряк, папула) враховують через 24-48 год. Алергічна проба при кандидозах малоспецифічна, оскільки сенсibiliзація до грибкових антигенів зустрічається дуже часто й повсюдно.

Дерматомікози

Грибкові захворювання шкіри, її придатків і підшкірної клітковини мають загальну назву дерматомікози (дерматофітії). Залежно від роду і виду збудників та реакції організму на їх проникнення розрізняють такі види дерматомікозів: епідермофітія, руброфітія, трихофітія, мікроспорія і фавус (парша).

Епідермофітія. За клінічною картиною і найчастішою локалізацією патологічного процесу виділяють дві форми цього захворювання: пахвинна епідермофітія і епідермофітія стопи. Пахвинну форму викликає *Epidermophyton floccosum* (син. *E. inguinale*). Збудником епідермофітії стоп є *Epidermophyton interdigitale* (син. *Trichophyton mentagotophytes*). Обидві форми захворювання зустрічаються лише у людей і поширені в усіх країнах світу.

При пахвинній епідермофітії уражається шкіра пахвинних, міжсідничних і пахвових складок, ділянки шкіри під молочними залозами, інколи й нігтьові пластинки. При епідермофітії стоп у міжпальцевих проміжках злущується епітелій, часто приєднується ураження нігтів.

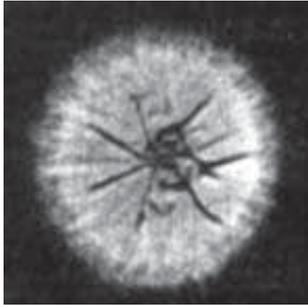
Лабораторна діагностика обох форм епідермофітії подібна. Залежно від локалізації патологічного процесу для дослідження беруть шкірні лусочки, клапти мацерованого епідермісу, кришечки пухирців, зскрібки з нігтьових пластинок.

Для мікроскопічного дослідження патологічний матеріал подрібнюють, вносять у краплю 10 % розчину КОН або NaOH на предметному склі, підігривають до появи парів і залишають на 15 хв, а зскрібки з нігтів – на 1-2 год. При мікроскопії надавленої краплі виявляють короткий (2-4 мкм) переплетений розгалужений міцелій і артроспори прямокутної форми, які розташовані у вигляді ланцюжків.

Мікологічне дослідження дає можливість виділити чисту культуру і визначити рід та вид збудників. Для цього подрібнений патологічний матеріал сіють на щільне середовище Сабуро з антибіотиками в пробірках. На поверхню агару наносять 4-5 шматочків матеріалу в кожену пробірку. Оптимальна температура для культивування становить 27 °С, але хороший, хоч і повільний ріст грибів можливий і при кімнатній температурі.

Колонії *E. floccosum* мають округлу форму, трохи вдавнені в центрі, часто з радіальними складками. Поверхня їх пухнаста, ніби густо припорошена борошном, колір білувато-сірий або жовтувато-зелений. При мікроскопії таких колоній видно септований міцелій з 4-5 – кінцевими веретоподібними структурами, що нагадують грона бананів (рис. 97²).

Колонії *E. interdigitale* ростуть швидше, центр їх куполоподібний, складчастий або бугристий, білого кольору, рідше – жовтувато-рожевого, коричневого; поверхня їх ніби припорошена борошном. При мікроскопії колоній виявляють довгий, розгалужений, септований міцелій, на кінцях якого є завитки та спіралі. Кінцеві розгалуження можуть мати грноподібні структури.



1



2

Рис. 97. *Epidermophyton floccosum*:

1 – колонія, 2 – схема мікроморфології.

Вид збудників епідермофітії визначають на основі структури колоній і даних їх мікроскопії.

Серологічні, біологічні і алергологічні дослідження при поверхневих епідермофітіях не проводять.

Серологічні, біологічні і алергологічні дослідження при поверхневих епідермофітіях не проводять.

Руброфітія (рубромікоз) – хронічне грибкове захворювання з переважним ураженням шкіри стоп і кистей, нігтів, великих складок, пушкових волосків, рідше – шкіри кінцівок і всього тулуба. Збудник – *Trichophyton rubrum*. Уражені ділянки шкіри лущаться, борозняться, розвивається гіперкератоз стоп і долонь, нігті товстішають, кришаться. Хронічний процес загострюється в теплі пори року і може перейти в генералізовану форму.

Для постановки діагнозу важливе значення мають результати мікроскопічного і мікологічного дослідження патологічного матеріалу – шкірних лусочок, пушкових волосків, зскрібків нігтьових пластинок.

На агарі Сабуро виростають спочатку білі пухнасті колонії. Через 1-2 тижні їх основа і пушок забарвлюються у вишнево-червоний колір; пігмент забарвлює і середовище. При мікроскопії колоній видно тонкий білий септований міцелій із грушоподібними, овальними або паличкоподібними мікроконідіями. У старих культурах зустрічаються хламідоспори.

Трихофітія (стригучий лишай) – дерматомікоз, що спричиняється грибами роду *Trichophyton*. Найважливішими з них є антропофіли *Trichophyton tonsurans* і *T. violaceum*. При поверхневій трихофітії уражується шкіра і волосиста частина голови. Волосся при цьому стає коротким (1-2 мм), білуватим, ломким, сухим, інколи виглядає як чорні цяточки. Такі зміни є головною ознакою стригучого ли-

² Цей і наступні рисунки запозичені з посібника П.Н. Кашкина і В.В. Лисина Практическое руководство по медицинской микологии. – М.: Медицина, 1983.

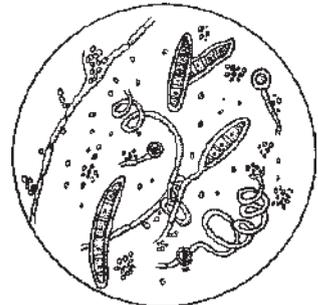
шая. Хронічні форми трихофітії супроводжуються ураженням нігтів, глибоких шарів шкіри і навіть внутрішніх органів.

У лусочках шкіри і нігтьових пластинках збудник знаходиться у вигляді гіллястого міцелію, у волоссі розташовується за типом “ендотрикс”. Спори однакові, крупні, овальні, рідко квадратні, знаходяться всередині волосини у вигляді довгастих ланцюжків.

При посіві на агар Сабуро *T. violaceum* починає рости на 4-5 день у вигляді білого або ледь жовтуватого горбика. Дозріла колонія щільна, суха, порошкоподібна зі складками і тріщинами. У препараті надавленої краплі, виготовленої з колонії, видно прямиий тонкий міцелій із багатьма мікроконідіями овальної та паличкоподібної форми, які часто нагадують гілочки листяних дерев. У старих культурах можуть утворюватись хламідоспори (рис. 98).



1



2

Рис. 98. *Trichophyton tonsurans*:
1-колонії, 2 - схема мікроморфології.

T. violaceum у патологічному матеріалі виглядає

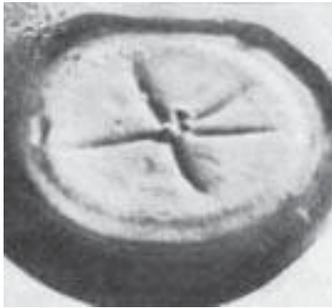
під мікроскопом як і попередній вид. При посіві на середовище Сабуро зрілі колонії появляються через 25-30 днів. Поверхня їх складчаста, матова або масляниста, з чітко окресленими краями блідо-бузкового або фіолетового кольору, рідко безбарвні. При мікроскопії колонії методом надавленої краплі виявляють тонкий, малосептований міцелій з боковими розгалуженнями. Видно також малі й крупні кінцеві та вільні хламідоспори.

Мікроспорія – хронічне захворювання шкіри і волосся, яке викликають дерматофіти роду *Microsporum*. Дуже рідко уражуються нігті. Найчастішими збудниками є антропофільні гриби *Microsporum audouinii*, *M. ferrugineum* і зоофільний – *M. canis*. Всі вони характеризуються високою контагіозністю і викликають захворювання переважно у дітей ясельного та дитсадкового віку, а також у школярів. У місці проникнення збудника на шкірі появляються чітко окреслені запальні плями округлої або овальної форми з характерним висівкоподібним злущуванням. При ураженні волосистої частини голови виникають 1-2 осередки uszkodження, де волосини обламани до 5-8 мм над шкірою і вкриті білим чохлам із спор грибів.

Для лабораторної діагностики мікроспорії використовують мікроскопічні й мікологічні дослідження. При вивченні шкірних лусочок із ураженої ділянки шкіри під мікроскопом гриби мають вигляд тонких розгалужених гіфів з невеликою кількістю чітко окреслених перетинок (септ). Можна зустріти ланцюжки міцелію, що розпадаються на спори. При мікроскопії ураженого волосся видно велику кількість круглих спор, які оточують волосину суцільним шаром. У фолікулярній

частині волосини можна виявити септований міцелій. Уражені пушкові волоски мають спори лише всередині.

При посіві патологічного матеріалу (лусочки, волосся) на агар Сабуро спостерігають повільний ріст круглих, плоских, пухнастих, сіруватих або кремуватих



1



2

Рис. 99. *Microsporium audouinii*:

1 – колонії, 2 – схема мікроморфології.

колоній з радіальними борозенками. При мікроскопії колоній міцелій тонкий, світлий, довгий, розгалужений, септований. Мікроконідії овальні і грушоподібні; хламідоспори, як правило, кінцеві (рис. 99).

Характерною ознакою мікроспорії є голубувато-зелене світіння уражених волосин при люмінесцентному їх освітленні (лампа Вуда) у темній кімнаті.

Фавус (парша) – хронічне грибкове захворювання шкіри, волосся і нігтів. Зустрічається в усіх країнах світу, в Україні останнім часом ресструється дуже рідко. У переважній більшості випадків збудником є антропофіл *Trichophyton schonleini* (*Achorion schonleini*). Найхарактернішою ознакою фавуса є утворення скутул (фавозних щитків) – круглих, плоских або блюдцеподібних структур діаметром 2-3 см, спаяних зі шкірою. Вони мають жовтий колір, крихку консистенцію, складаються з уражених епітеліальних клітин і елементів грибів. Уражені волосини міцно з'єднані в товщі скутули, але залишаються довгими і сухими, набувають сірого кольору.

При мікроскопії лусочок з уражених ділянок шкіри видно розгалужений септований міцелій, часто з артроспорами. Елементи грибів у волоссі розміщені всередені. Це поліморфний (тонкий і більш широкий) септований міцелій із заокругленими або загостреними кінцями. Тут же зустрічаються ланцюжки і купки круглих і багатограних спор, бульки повітря, крапельки жиру.

Виділення чистих культур грибів проводять шляхом посіву на щільне середовище Сабуро. Колонії починають рости з 3-4 дня у вигляді сіруватого горбика. На 10-й день вони досягають розмірів 1-2 см, ще пізніше стають зморшкуваті, ніздрюваті, сухі, подібні на гриб сморж або губку, мають різноманітний колір: білий, жовтий, кремовий, коричневий.

При мікроскопічному дослідженні молодих колоній у препараті надавленої краплі виявляють тонкий, ніжний, чітко сегментований міцелій; пізніше він стає грубшим, на ньому появляються бокові веретеноподібні здуття і розгалуження на кінцях, що нагадують канделябри, роги північних оленів тощо. У великій кількості видно інтеркаларні й кінцеві хламідоспори. Макроконідії множинні (по 5-8 штук), тонкосептовані, їх розміри коливаються від 6-10 мкм до 30-80 мкм.

Глибокі (вісцеральні) мікози

Збудниками глибоких мікозів є гриби, що знаходяться в ґрунті та органічних субстратах лише у певних географічних зонах, де значна частина людей інфікована ними. Початок хвороби має безсимптомний перебіг і лише у небагатьох осіб вона може призвести до розвитку тяжких форм або смерті.

Криптококоз (європейський бластомікоз) – один із мікозів, що має гострий, підгострий або хронічний перебіг, поширений повсюдно, але зустрічається порівняно рідко, переважно в європейських країнах. Збудник – *Cryptococcus neoformans*.

Патологічний процес спочатку локалізується в легенях, пізніше проходить дисемінація збудника в мозок, шкіру, слизові оболонки. Матеріалом для дослідження служить харкотиння, гній із норниць, осад сечі і спинномозкової рідини, шматочки уражених тканин, взятих при біопсії або автопсії. Для серологічних реакцій беруть кров.

Під мікроскопом краще розглядати незабарвлені тушові препарати. При цьому видно елементи гриба, оточені слизовою жовтуватою капсулою. Вони мають округлу або яйцеподібну форму розміром від 3-5 до 10-15 мкм з однією маленькою брунькою. Інколи видно короткий відросток міцелію (рис. 100).

Для забарвлення гістологічних зрізів найчастіше використовують муцикармін або гематоксилін-еозин, за допомогою яких особливо чітко виявляють капсули.

Виділення чистих культур проводять шляхом посіву на агар Сабуро або суло-агар з антибіотиками. Культивують при температурі 37 °С. Колонії на щільних середовищах мають округлу форму, гладенькі, блискучі, куполоподібні, інколи ледь зморшкуваті, дрібнозернисті, сметаноподібної консистенції, тягнуться за петлею. Вони забарвлені в різний колір – від білувато-жовтуватого до бурувато-коричневого. При мікроскопічному їх дослідженні клітини з культур і з патологічного матеріалу виглядають однаково. Найхарактернішою ознакою криптококів є дріжджоподібна форма з наявністю товстої слизової капсули, яка за своїми розмірами в декілька разів перебільшує величину клітин (до 50 мкм).

У ряді випадків для визначення патогенності збудника ставлять біологічні проби на мишах і гвінейських свинках. Тварин заражують інтрацеребрально

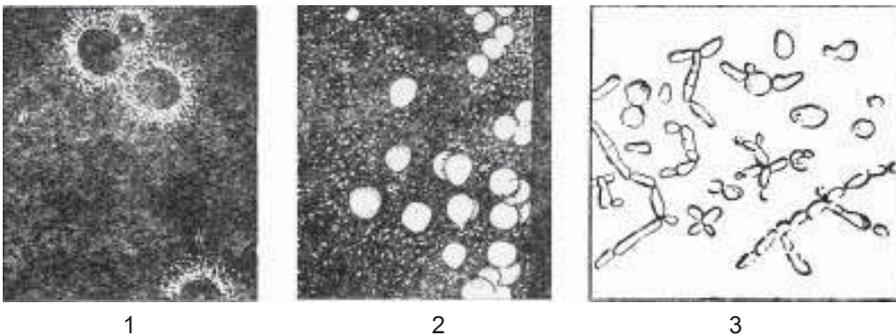


Рис. 100. *Cryptococcus neoformans*:

1 – колонії; 2 – клітини в незабарвленому мазку; 3 – схема мікроформології.

(0,05 мл) або в черевну порожнину (0,5 мл). Двох із заражених мишей досліджують через 2 тижні, а двох інших – через 1-2 місяці. Гомогенізовані шматочки печінки, селезінки і мозку висівають на середовища й ідентифікують виділені культури.

При підозрі на криптококоз проводять також серологічні дослідження, спрямовані як на визначення антигенів збудника, так і антитіл у сироватці крові. Для виявлення антигенів використовують реакцію латекс-аглютинації, імуноелектрофорез та імуноферментний аналіз. Антитіла визначають за допомогою реакції аглютинації, преципітації, непрямой гемаглютинації та зв'язування комплементу. Рідко проводять внутрішньошкірні проби. Серологічні й алергічні реакції мають не вирішальне, а лише допоміжне значення.

Північноамериканський бластомікоз – антропозоофільний мікоз з ураженням шкіри, слизових оболонок, внутрішніх органів і кісток, ендемічний для Канади і США. Збудник – *Blastomyces dermatitides*. Для лабораторної діагностики використовують гній, харкотиння, сечу, спинномозкову рідину, пунктат лімфовузлів, кров для серологічних реакцій. Проводять мікроскопічні, культуральні та імунологічні дослідження.

Доставлений матеріал обробляють 10 % розчином гідроксиду калію, проглядають у нативних препаратах методом надавленої краплі в суміші спирту з гліцерином. Використовують сухі об'єктиви (20×, 40×). Бластоміцети виглядають як крупні (до 20 мкм) дріжджоподібні клітини круглої чи овальної форми з двоконтурною стінкою та однією брунькою, яка зв'язана материнською клітиною широкою основою. Псевдоміцелій відсутній. Це так звана дріжджова фаза гриба. Досліджують також мазки, забарвлені за методом Грама або Романовського-Гімзи.

Для виділення чистої культури патологічний матеріал сіють на щільне середовище Сабуро, сусло-агар і глюкозний МПА. Культивують при кімнатній температурі. При цьому гриби можуть вирости у дріжджовій або міцелярній фазі. Дріжджові колонії мають округлу форму, білуватий колір, сметаноподібну консистенцію. У мазках із таких колоній видно круглі або овальні клітини розміром 8-12 мкм із бруньками.

Колонії з міцелярної форми гриба мають округлу форму, пухнасту поверхню сіруватого кольору. При мікроскопії таких колоній видно клітини з капсулами, розгалужений септований міцелій з товстими стінками та великою кількістю бокових конідій круглої, овальної, рідше грушоподібної форми. У старих культур появляється велика кількість хламідоспор діаметром 10-18 мкм.

Виділити чисту культуру з одночасним визначенням її патогенності можна також шляхом зараження білих мишей з наступним висівом матеріалу з тканин і органів на живильні середовища.

Для досить ефективного серологічного дослідження в пізні періоди захворювання використовують реакції аглютинації, зв'язування комплементу, ІФА. Високої оцінки заслуговує і алергічна проба з алергеном бластоміцином.

Паракокцидіоїдоз (південноамериканський бластомікоз) – хронічний глибокий мікоз, розповсюджений в країнах Південної Америки. Частіше хворіють люди від 30 до 50 років. Збудником є двофазний гриб *Paracoccidioides brasiliensis*.

Уражуються спочатку слизова оболонка рото- і носоглотки, шкіра, особливо навколоанальної зони. Пізніше процес переходить у лімфатичні вузли та внутрішні органи (легені, печінка, шлунок, селезінка). Досліджують гній, харкотиння, грануляції, виділення норичь, біоптати тканин і органів.

Для лабораторної діагностики використовують ті самі методи, що й при північноамериканському бластомікозі. В уражених тканинах гриби мають сферичну або овальну форму дріжджоподібних клітин діаметром 30-60 мкм, які мають двокамерну оболонку з великою кількістю дрібних бруньок на поверхні у вигляді корони, що є важливою диференціальною ознакою збудника (рис. 101).

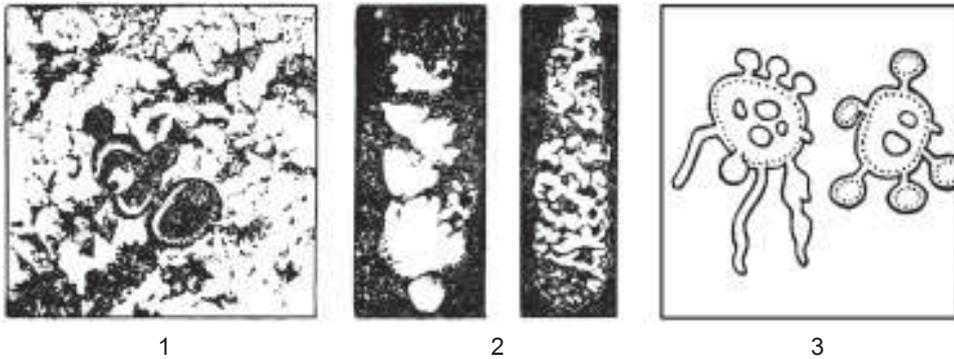


Рис. 101. *Paracoccidioides brasiliensis*: 1 – клітини; 2 – колонії; 3 – старі спори.

Чисті культури виділяють на кров'яному і сироватковому агарі з антибіотиками. *P. brasiliensis* росте повільно. У дріжджоподібній фазі культивують при 37 °С (гладенькі або гірозні колонії). Під мікроскопом видно крупні, овальні або круглі клітини з бруньками або без них.

Міцеллярні форми виростають при кімнатній температурі (колонії складчасті, покриті білувато-сірим або жовтуватим пушком). При мікроскопії виявляють розгалужений міцелій і овальні конідії. З діагностичною метою досліджуваний матеріал вводять у паренхіму яєчок лабораторних тварин, потім виділяють збудника з уражених ділянок.

У пізні строки захворювання досліджують сироватку крові на наявність анти-тіл у реакціях зв'язування комплементу та преципітації в гелі. Алергічну пробу вважають специфічною. Для її постановки використовують алерген із тканинної форми гриба.

Гістоплазмоз – широко розповсюджений хронічний системний мікоз. Збудник американського гістоплазмозу – *Histoplasma capsulatum*, африканського – *H. duboisii*. Гриби мають тканинну (дріжджову) і культуральну (міцеллярну) форми. Тканинна форма розташовується всередині макрофагів, лейкоцитів, гігантських клітин селезінки, печінки, лімфатичних вузлів.

Спочатку процес розвивається в носоглотці, гортані й легенях, пізніше уражуються майже всі тканини і органи.

При лабораторній діагностиці досліджують гній, харкотиння, спинномозкову рідину, сечу, пунктати лімфатичних вузлів і кісткового мозку, біоптати лімфа-

тичних вузлів і органів. Для серологічних реакцій беруть кров. Етіологію гістоплазму встановлюють шляхом мікроскопічного і мікологічного дослідження, постановки біопроби та імунологічних реакцій.

Мікроскопія патологічного матеріалу дає змогу виявити гістоплазми – грам-позитивні овальні або круглі клітини, що брунькуються, оточені капсулою. Характерне їх внутрішньоклітинне розташування. *H. duboisii* можуть виявлятися і позаклітинно. Препарати забарвлюють за методом Грама або Романовського-Гімзи. Для гістологічного дослідження виготовляють препарати-зрізи з уражених тканин і фарбують їх за Грамом-Вейгертом.

Мікологічні (культуральні) дослідження проводять в умовах суворого режиму, прийнятого для особливо небезпечних інфекцій. Клінічний матеріал сіють на середовище Сабуро, сироватковий або кров'яний агар з антибіотиками, а також заражують курячі ембріони. Посіви інкубують при 25-30 °С і 37 °С протягом 2-3-х тижнів. При температурі 25 °С виростає міцелярна форма гриба, при 37 °С – дріжджова.

Колонії міцелярної форми сірувато-білого або коричневого кольору, пухнасті, врастають в агар. При мікроскопії міцелій розгалужений, септований, з боковими мікроконідіями; макроконідії округлої або грушеподібної форми.

Колонії дріжджоподібної форми гладенькі, блискучі або матові, білувато-сірі, м'якої консистенції, містять округлі клітини, що брунькуються, часто розташовані ланцюжками.

Для серологічної діагностики найбільш ефективними вважають реакцію преципітації в гелі та РЗК. Хороші результати дає постановка біологічної проби на білих мишах або золотистих хом'ячках. Патологічний матеріал вводять у черевну порожнину і через місяць від тварин виділяють та ідентифікують чисті культури грибів. Для виявлення алергічного стану ставлять внутрішньошкірну пробу з гістоплазміном. Але останні методи мають лише допоміжне значення.

Кокцидіоїдоз – гострий або хронічний глибокий системний особливо небезпечний мікоз людей і тварин, що викликається *Coccidioides immitis*. Хвороба ендемічна для США і Латинської Америки. Уражуються шкіра, підшкірна клітковина, легені та інші внутрішні органи і кістки. Збудник знаходиться в ґрунті. Зараження відбувається при вдиханні пилу. Від людини до людини цей мікоз не передається. Досліджуванним матеріалом служить харкотиння, гній, ліквор, біопсійний матеріал, взятий під час операції.

Лабораторна діагностика базується на проведенні мікроскопічного, культурального, біологічного та імунологічного дослідження. Патологічний матеріал мікроскопують в нативних препаратах або забарвлених за Грамом-Вейгертом і Мак-Манусом. При цьому виявляють великі (до 200 мкм), округлі, товстостінні сферули, наповнені дрібними спорами.

Виділення чистих культур і всі маніпуляції з ними проводять у лабораторії суворого режиму як із збудниками особливо небезпечних інфекцій. Для цього гриба характерний диморфізм: при 37 °С виростає дріжджоподібна форма (гладенькі без повітряного міцелію колонії), а при 25 °С – міцелярна форма

(плоскі, оксамитово-пухнасті, ніби припорошені борошном колонії, які мають міцелій з великими боковими або кінцевими хламідоспорами). Мікронідії відсутні. Чисту культуру можна легко виділити і при зараженні хом'ячків або самців гвінейських свинок. Патологічний матеріал вводять у паренхіму яєчок або черевну порожнину. В осередках ураження мікроскопічно виявляють тканинну форму гриба – великі сферули.

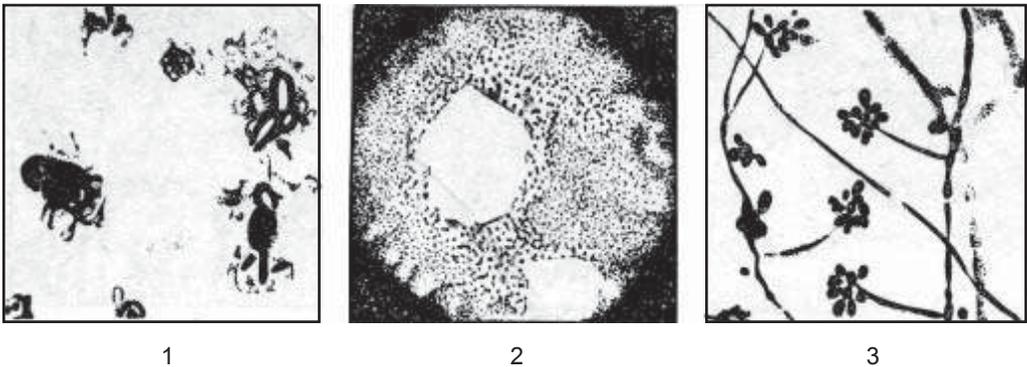
Для серологічної діагностики використовують реакції аглютинації, преципітації, зв'язування комплементу, непрямой гемаглютинації. При значній дисемінації патологічного процесу наростання титру комплементзв'язуючих антитіл свідчить про несприятливий прогноз. Шкірні алергічні проби ставлять із кокцидіоїдним алергеном у розведенні 1:1000. Результат враховують через 48 год. При позитивному ефекті спостерігається гіперемія, припухлість і папула в місці введення препарату.

Споротрихоз (хвороба Шенка) – хронічний глибокий мікоз, що уражує слизові оболонки, мигдалики, шкіру, підшкірну клітковину, лімфовузли, рідше внутрішні органи і кістки. Збудником хвороби є *Sporotrichum schenckii*. Зустрічається в багатьох країнах світу. Хворіють переважно чоловіки у віці 25-40 років, які контактують із рослинами і деревиною.

У лабораторії досліджують гній із виразок і норниць, пунктати з лімфовузлів, кров, харкотиння, біоптати уражених тканин, кров для серологічних реакцій. Діагностика базується на виявленні грибів у патологічному матеріалі й виділенні чистих культур.

Тканнина форма гриба під мікроскопом у забарвлених за Грамом препаратах має вигляд овоїдних, сигароподібних або булавоподібних тілець, що брунькуються. Вони, як правило, знаходяться в макрофагах.

Чисті культури виділяють посівом на агар Сабуро або рідкі середовища. В культурах *S. schenckii* виростає в міцелярній формі (коричневі та чорні пухнасті колонії), або в дріжджовій формі (гладенькі, м'які, жовтуваті колонії, які появляються на 4-й день). Міцелій гіллястий, септований; конідії круглі, овальні, розташовуються парами або у вигляді розетки (рис. 102).



1

2

3

Рис. 102. *Sporotrichum schenckii*:

1 – клітини, що брунькуються; 2 – колонії; 3 – міцелій і розетки.

Для виділення чистих культур використовують також внутрішньоочеревинне або інтратестикулярне зараження гвінейських свинків, хом'ячків, білих мишей і щурів. У тварин виникають гранульоматозні ураження, в яких виявляють типові тільця дріжджоподібних форм.

Із серологічних методів найчастіше ставлять реакції аглютинації (особливо латекс-аглютинації), преципітації і зв'язування комплементу. В усіх реакціях антитіла виявляють у високих титрах. Досить ефективним методом діагностики є постановка алергічних проб із споротрихіном.

Хромомікоз (тропічний бластомікоз) – хронічне захворювання шкіри, підшкірної клітковини і внутрішніх органів, яке супроводжується утворенням бородавчастих, папіломатозних розростань, дрібних і великих абсцесів та гранульоматозних вогнищ. Найчастіше хромомікоз викликає *Phialophora verrucosa*, значно рідше – інші види дейтероміцетів. Даний мікоз зустрічається переважно в країнах із тропічним і субтропічним кліматом; в Україні реєструється рідко.

Лабораторну діагностику хромомікозу проводять за допомогою мікроскопії гною, зскрібків або біоптатів уражених тканин у краплі 10 % КОН або в розчині спирту з гліцериним під покривним скельцем. Досліджують і забарвлені за методом Романовського-Гімзи і Ціля-Нільсена препарати. Тканинні форми гриба мають вигляд великих (5-15 мкм) округлих клітин бурого, зеленуватого або янтарно-жовтого кольору. Цей метод мікроскопічного дослідження дає найдостовірніші результати.

Чисті культури грибів виділяють на середовищі Сабуро, інкубуючи посіви при 25-28 °С. Колонії опуклі, оксамитово-пухнасті, сірувато-оливкового кольору. Міцелій септований, хламідоспори інколи розділені на 2-4 клітини (рис. 103).

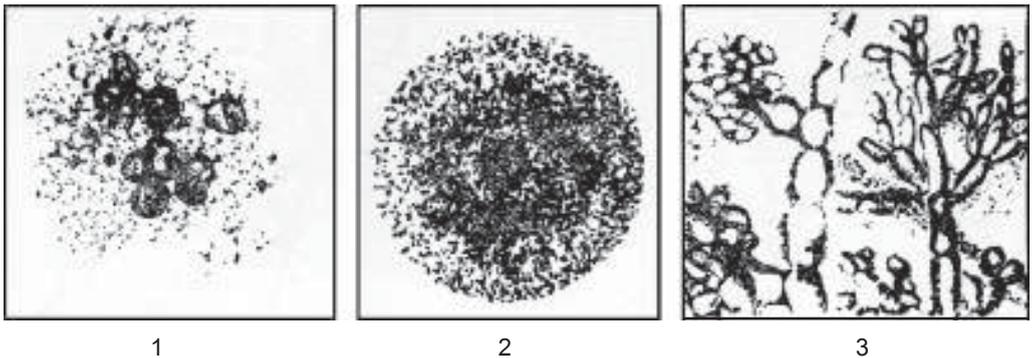


Рис. 103. *Phialophora verrucosa*: 1 – тканинна форма; 2 – колонія; 3 – міцелій.

Ідентифікують виділені культури за морфологічними ознаками колоній і особливостями спороутворення. При потребі чисті культури можна виділити шляхом інтратестикулярного зараження самців гвінейських свинків.

Часом проводять постановку реакцій преципітації та зв'язування комплементу, а також алергічну пробу, але вони не мають суттєвого значення в діагностиці хромомікозу.

Плісняві (цвільові) мікози

До цієї групи мікозів належать різноманітні грибокві захворювання легень, шкіри, нігтів, внутрішніх органів тощо. Залежно від збудника, їх називають аспергільозами, пеніцилінозами, мукорозами та ін. Вони виникають, як правило, у людей з імунодефіцитами або мають професійний характер (борошномели, пивовари, робітники пеніцилінових заводів тощо).

Аспергільоз – мікоз, який викликають різні види грибів роду *Aspergillus*. Основним збудником є *Aspergillus fumigatus*, інші види – *A. niger*, *A. flavus*, *A. nidulans* – зустрічаються рідше. У людей аспергіли уражують шкіру, легені, бронхи, приносіві пазухи, рогівку очей, нігті, зовнішні слухові проходи, внутрішні органи і тканини.

Досліджують харкотиння, гній, пунктати, випорожнення, лусочки шкіри і нігтів, біопсійний матеріал. Використовують мікроскопічний, культуральний, біологічний та імунологічний методи діагностики.

Виявлення аспергіл у закритих вогнищах ураження (інфільтрати, абсцеси), а тим більше виділення з них чистих культур є важливою основою для встановлення діагнозу. Під мікроскопом спостерігають нитки міцелію з характерними органами плодоносіння у вигляді конідиеносців із кінцевим здуттям, стерігмами і ланцюжками конідій.

Молоді колонії *A. fumigatus* на агарі Сабуро округлі, вовнисті, білого кольору. При старінні вони стають порошкоподібними, сизо-зеленуватими або чорними. Мікроскопічне дослідження колоній виявляє септований міцелій з характерними органами плодоносіння (рис. 104).

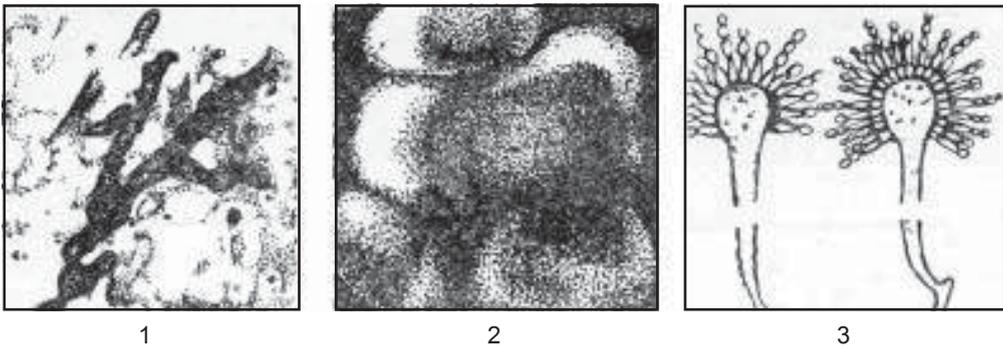


Рис. 104. *Aspergillus fumigatus*: 1 – тканинна форма; 2 – колонії; 3 – міцелій.

Діагностика аспергільозу при відкритих ураженнях часто утруднена. Клітини грибів у харкотинні або промивних водах бронхів у більшості випадків відсутні, або поодинокі. Виділення чистих культур, навіть таких як *A. fumigatus*, не може бути доказом наявності аспергільозу відкритих поверхонь. Адже всі види аспергіл є сапрофітами. У вигляді спор вони розповсюджені в повітрі й люди можуть вдихати їх. Окрім того, аспергіли вегетують на слизових оболонках здорових людей як представники нормальної мікрофлори. Отже, в таких випадках необхідно робити повторні дослідження з обов'язковим посівом для кількісного

визначення збудника в патологічному матеріалі. Ще краще діагностику аспергільозу проводити виключно серологічними методами. Для цього використовують реакції преципітації за Оухтерлоні та зв'язування комплементу. Позитивна реакція на антитіла є специфічною для всіх видів аспергіл, що викликає необхідність повторного тестування з антигенами різних видів грибів цього роду. Діагностичне значення має також виявлення високого титру IgE в сироватці крові хворих. Для уточнення діагнозу має значення постановка внутрішньошкірної або інгаляційної алергічної проби.

Окремі представники аспергіл здатні продукувати афлатоксини, які мають високу отруйність і канцерогенну дію. Виділені культури грибів перевіряють на токсигенність шляхом введення фільтратів бульйонних культур кроликам або гвінейським свинкам.

Пеніциліноз – опортуністичний мікоз, при якому спостерігаються ураження шкіри, нігтів, слизової оболонки ротоглотки, зовнішніх слухових проходів, легень та інших внутрішніх органів, спричинених різними видами грибів роду *Penicillium*: *P. crustosum*, *P. notatum*, *P. glaucum* та ін. Всі вони ще менш патогенні, ніж аспергіли, і тому дуже рідко викликають захворювання, здебільшого у осіб із різними імунodefіцитами.

Лабораторна діагностика пеніцилінозу має значні труднощі, оскільки вказані види грибів широко розповсюджені в бактеріологічних лабораторіях і є звичними контамінантами живильних середовищ у процесі бактеріологічних досліджень.

Патологічним матеріалом служить гній, харкотиння, пунктат закритих вогнищ, лусочки шкіри і нігтів, зскрібки слизових оболонок, вушна сірка.

Беззаперечним для встановлення діагнозу є виділення чистої культури грибів при посіві біопсійного або іншого матеріалу, взятого із закритого вогнища (абсцес, закрита порожнина, уражена тканина), а також гістологічне дослідження забарвлених зрізів уражених тканин.

Досліджуваний матеріал обробляють 10 % КОН або сумішшю спирту з гліцерином і виготовляють препарат надавленої краплі. Під мікроскопом видно короткі розгалужені септовані гіфи та китички пеніцилу з ектоспорами-конідіями.

Культуральний метод діагностики проводять шляхом посіву матеріалу на агар Сабуро з наступним вивченням характеру колоній та їх мікроскопічного дослідження.

P. crustosum утворює плоскі бархатні колонії, китички дво-, три- і багатомутовчасті, конідії круглі або еліпсоподібні. *P. glaucum* має світло-голубі або зелені колонії з радіальними борозенками, конідієносці одиничні, спори круглі й овальні (рис. 105). *P. notatum* росте у вигляді синьо-зелених пластівчастих колоній, китички у них несиметричні, спори овальні.

Серологічні реакції преципітації та зв'язування комплементу з антигенами відповідних видів грибів, а також алергічні проби не мають вирішального діагностичного значення.

Мукороз (фікомікоз) – хронічний глибокий мікоз, що викликається різними видами грибів родини *Mucoraceae*: *Absidia corymbifera*, *Mucor mucedo*, *Rhizopus*

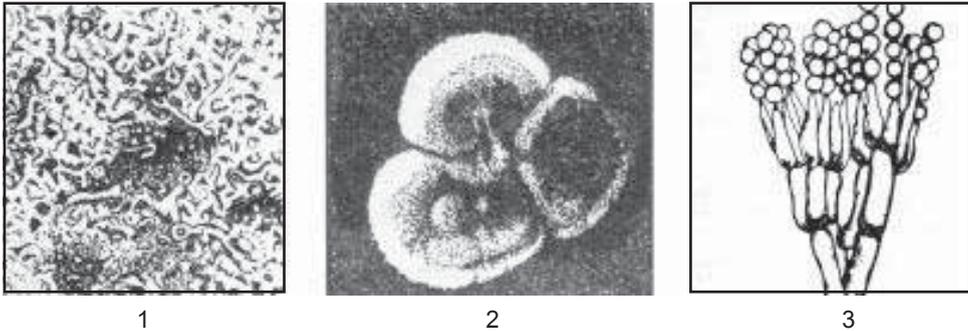


Рис. 105. *Penicillium glaucum*: 1 – тканинна форма; 2 – колонія; 3 – органи плодоносіння.

nigricans. Захворювання супроводжується ураженням шкіри, підшкірної клітковини, органів дихання, вух, очей і центральної нервової системи.

Для лабораторного дослідження направляють харкотиння, слиз із носа, гній, пунктати закритих вогнищ ураження, біопсійні й автопсійні матеріали, лусочки шкіри, навколони́гтьових валиків, виділення із слухових проходів.

Діагностика мукорозу вимагає ретельної оцінки отриманих результатів. У харкотиння і на слизову оболонку носа спори грибів можуть потрапити з повітря й вести себе як сапрофіти. Але можна й при явній клінічній картині не виділити збудника. У таких випадках необхідно дослідити забарвлені гістологічні зрізи уражених тканин.

Звичайно ж у патологічному матеріалі виявляють несептований розгалужений міцелій шириною 15-20 мкм. У харкотинні часто знаходять спорангії діаметром до 60 мкм з овальними ендоспорами.

На середовищі Сабуро *A. corymbifera* росте у вигляді пухнастих, спочатку білих, а потім темніших колоній. Розміри спорангіїв коливаються від 40 до 60 мкм. Спори овальні, безбарвні, гладенькі, рідше шорсткі.

M. tuccedo утворює субстратний міцелій. Спорангієносці закінчуються жовтувато-бурими спорангіями, що наповнені овальними спорами. Спорангії видимі навіть навіть неозброєним оком.

R. nigricans на поверхні агару має химерно переплетений міцелій, від якого пучками відходять спорангії, які спочатку мають коричневий, а пізніше чорний колір. Вони містять еліпсоподібні або неправильної форми шершаві спори.

Для визначення патогенності виділених культур часом проводять інтраназальне або внутрішньоочеревинне зараження гвінейських свинок і курей спорами грибів.

Серологічні та алергічні методи дотепер ще недостатньо розроблені і, як вважають спеціалісти, вони можуть мати лише допоміжне значення.

Пневмоцистоз – класичний опортуністичний мікоз, що супроводжується розвитком інтерстиціальної пневмонії. Збудник захворювання – *Pneumocystis carinii* – донедавна відносили до найпростіших. Тепер встановлено, що він є дріжджовим грибом класу *Blastomyces*. Хвороба розвивається на фоні пригнічення імунологічної реактивності. Особливо часто вона виникає при ВІЛ-інфекції і є

однією з головних причин смерті захворілих. Пневмоцистоз розвивається при довготривалому вживанні імунодепресантів, цитостатиків, кортикостероїдів і антибіотиків.

Основний метод діагностики – мікроскопічний. Збудник не росте на штучних живильних середовищах, але є спроби отримати культури за допомогою легеневої моделі на білих мишах, яким попередньо вводили кортизон.

Найкращим матеріалом для дослідження є легенева тканина, взята при біопсії на відкритих легенях або через бронхи, а також трансторакальні аспірати. Останні особливо рекомендують при діагностиці пневмоцистозу у дітей. Харкотиння менш придатне для дослідження, за винятком ВІЛ-інфекції.

Проби тканин, взятих при відкритій легеневій біопсії, проглядають макроскопічно для виявлення уражених вогнищ. Із ущільнених ділянок відбирають маленькі шматочки й виготовляють “роздавлені мазки” та заморожені гістологічні зрізи. Фрагменти тканин, отриманих при трансбронхіальній біопсії, дуже малі для виготовлення вказаних препаратів. У таких випадках для “роздавлених мазків” необхідно взяти 3-4 біоптати. Бронхоальвеолярний лаваж може бути корисним у хворих на СНІД, у яких *P. carinii* значно більше.

Мазки і гістологічні зрізи найчастіше забарвлюють за методом Грама-Вейгерта або Романовського-Гімзи. Найбільш характерною структурою *P. carinii* в мазках є “розетки”, що складаються з 8 грушоподібних структур, розміром 1-2 мкм. Вони об’єднані в цистоподібну форму діаметром 7-10 мкм. Цисти звичайно круглі, хоч зустрічаються і чашкоподібні. Виявлення типових цист є патогномнічною ознакою пневмоцистної інфекції (рис. 106). Скупчення слизових цист утворюють пінисті структури в легенях, оточені плазматичними клітинами і еозинофілами.

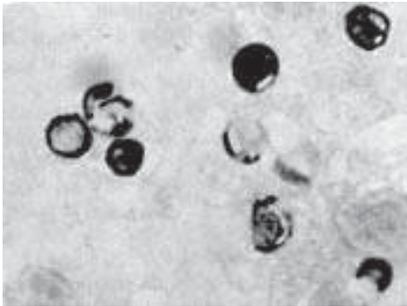


Рис. 106. *Pneumocystis carinii*: цисти в “роздавленому мазку”.

Для виявлення антигенів *P. carinii* розроблені варіанти реакцій імунофлуоресценції та схем імуноферментного аналізу, але відповідні тест-системи практично недоступні для рутинних мікробіологічних лабораторій. З метою серологічної діагностики запропоновані реакції зв’язування комплементу, імунофлуоресценції та ензиммічених антитіл.

Частина VI

ПРОТОЗОЙНІ ІНФЕКЦІЇ

Підцарство найпростіших (*Protozoa*) – досить численна й дуже різноманітна група еукаріотичних одноклітинних мікроорганізмів. Тепер виділяють 4 класи найпростіших: джгутикові (*Zoomastigophora*), саркодові (*Rhizopoda*), споровики (*Sporozoa*) і війкові (*Infusoria*). У людей вони викликають амебіаз, малярію, токсоплазмоз, балантідіаз, лямбліоз, трипаносомоз, криптоспоридіоз, саркоспоридіоз, ізоспороз і трихомоноз. Паразитарні інфекції через масове розповсюдження складають сьогодні проблему глобального значення. Вони завдають великої шкоди здоров'ю людей іносять значні економічні збитки в багатьох країнах світу.

Розділ 17

МЕТОДИ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ

Лабораторні методи діагностики захворювань включають мікроскопічні, культуральні, серологічні, алергічні й біологічні дослідження.

Матеріалом для дослідження може бути кров, харкотиння, випорожнення, сеча, вагінальний вміст, пунктати абсцесів, лімфовузлів і кісткового мозку, зскрібки з інфільтратів шкіри, шматочки тканин, взятих при біопсії й аутопсії тощо.

Мікроскопічний метод. Дослідження під мікроскопом направлено на виявлення збудників у нативних і забарвлених препаратах. Окрім того, їх можна знайти в гістологічних зрізах, виготовлених з уражених тканин. Для забарвлення найпростіших найчастіше використовують метод Романовського-Гімзи.

При лабораторній діагностиці малярії, трипаносомозу і токсоплазмозу досліджують звичайні мазки крові й товсту краплю, яку виготовляють кількома способами:

1. Знежиреним предметним склом торкаються краплі крові, що виступає після проколу м'якоті пальця, і, не відриваючи від неї скла, круговими рухами доводять діаметр до 1-1,5 см.

2. На одному предметному склі готують комбінований препарат – звичайний тонкий мазок і на деякій відстані від нього товсту краплю.

3. На звичайний, ще вологий мазок наносять краплю крові, яка розтікаючись, утворює правильний диск, розмір якого визначає величина краплі, але товщина практично не змінюється. В ній збудники і клітини крові розподіляються рівномірніше, ніж у звичайній товстій краплі (рис. 107).

Звичайні тонкі мазки крові фіксують метанолом (3 хв), етанолом (10-15 хв) або в суміші Никифорова (20 хв). Товсті краплі, незалежно від способу виготов-

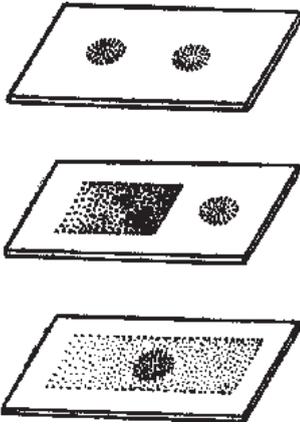


Рис. 107. Різні способи виготовлення товстої краплі.

лення, висушують поступово і не фіксують. Мазки забарвлюють 40-45 хв фарбою Романовського (1 крапля робочого розчину фарби на 1 мл нейтральної (рН 7,0) води, а товсту краплю – 4-5 % водним розчином фарби протягом 20-25 хв. Препарати ретельно промивають водою, висушують у вертикальному положенні й мікроскопують під імерсійним об'єктивом.

Мазки з ліквора і пунктатів готують так само, як і мазки крові, фіксують і забарвлюють за методом Романовського-Гімзи.

Зскрібки з інфільтратів шкіри роблять так: уражену ділянку протирають спиртом, стискають між двома пальцями і гострим скальпелем роблять поверхневий надріз шкіри. Тим же скальпелем роблять зскрібок із дна і країв надрізу, швидко наносять тонким шаром на предметне скло, фіксують у суміші Никифорова й забарвлюють за Романовським-Гімзою.

Забарвлення залізним гематоксиліном за Гейденгаймом використовують для виявлення тонкої структури ядра і цитоплазми найпростіших.

Мазки із вагінального вмісту роблять при підозрі на трихомоноз. Нанесену на предметне скло краплю матеріалу накривають покрівним скельцем і відразу мікроскопують. У такій надавленій краплі виявляють рухливі форми найпростіших. Висушені та фіксовані мазки забарвлюють за методом Грама або Романовського-Гімзи. Останній має переваги, оскільки дає змогу легко ідентифікувати трихомонади.

Для виявлення найпростіших у кишечному тракті готують мазки із дуоденального вмісту і випорожнень. При дуоденальному зондуванні беруть всі три порції (А, В, С) так, щоб не було домішки шлункового соку. Отримані порції окремо виливають у чашки Петрі, відбирають слизові грудочки і готують препарат надавленої краплі. Порції жовчі центрифугують, з осаду роблять мазки, які досліджують спочатку під малим, а потім під великим збільшенням. У дуоденальному вмісті можна виявити вегетативні форми лямблій. Рекомендують проглядати 10-20 препаратів надавленої краплі.

Нативні препарати з фекалій готують так: на предметне скло наносять краплю ізотонічного розчину хлориду натрію і поряд таку ж кількість розчину Люголя. Дерев'яною або скляною паличкою беруть частинку випорожнень і розтирають окремо в обох краплях, які потім накривають покрівними скельцями і розглядають при малому і великому збільшенні мікроскопа. Дуже добрі результати отримують при дослідженні живих найпростіших під фазово-контрастним або аноптральним мікроскопом.

Якщо неможливо негайно дослідити випороження, їх консервують і направляють до лабораторії. Для цього використовують консерванти Барроу або Сафарлієва, налиті у пеніцилінові флакони приблизно до половини. До них додають свіжі фекалії в об'ємі, що складає третину консерванта. При цьому морфологічні

ознаки вегетативних форм і цист найпростіших зберігаються протягом 30 і більше днів. Перед дослідженням консервований матеріал не перемішують, а з придонного осаду краплю переносять піпеткою на предметне скло і ретельно розтирають дерев'яною паличкою до отримання гомогенної емульсії. При використанні консерванта Барроу до матеріалу додають краплю розведеного барвника (трипанований або метиленовий синій, янусовий зелений, нейтральний червоний).

При малій кількості цист найпростіших у досліджуваному матеріалі використовують методи збагачення. Вони базуються на спливанні цист у розчинах із високою щільністю (флотація у сульфаті міді чи цинку) або осіданні їх у рідині з низькою щільністю (формалін-ефірна седиментація).

Виділення чистих культур при діагностиці протозоозів використовують значно рідше, ніж мікроскопічні дослідження. Культивування найпростіших проводять лише у спеціалізованих лабораторіях, інститутах, наукових центрах. Виділяти чисті культури найпростіших у звичайних мікробіологічних лабораторіях не рекомендують. У відповідних центрах на спеціальних середовищах, курячих ембріонах або культурах клітин можна виділяти практично всі види патогенних найпростіших. До живильних середовищ потрібно додавати кров, сироватку, яєчний білок, вуглеводи, амінокислоти, вітаміни. Переважну більшість найпростіших культивують при 37 °С, але лейшманії й трипаносоми краще ростуть при температурі 20-25 °С. Для виявлення останніх сіють кров хворих, пунктати лімфатичних вузлів і кісткового мозку, ліквор, зскрібки з горбків або інфільтратів чи виразок. Види найпростіших, які уражають кишечний тракт (амеби, лямблії, балантидії, кишкові трихомонади) значно легше виявити за допомогою мікроскопії, ніж культуральним методом.

Для швидкої діагностики деяких протозойних інфекцій (малярія, трипаносомоз та ін.) розроблено новий метод виявлення найпростіших – ДНК-зонди з різними мітками. Метод дуже чутливий і високоспецифічний. Він ґрунтується на виявленні в лізованій крові характерних для збудників фрагментів ДНК.

Серологічна діагностика. Антитіла в діагностичних титрах (спочатку IgM, пізніше IgG) pojawiaються в сироватці крові на другому-четвертому тижні хвороби. При різних видах протозоозів використовують реакції аглютинації (особливо латекс-аглютинації), преципітації в гелі, зв'язування комплекменту, прямої й непрямої імунофлуоресценції, імуноелектрофорезу, непрямої гемаглютинації та імуноферментний аналіз. Частіше серологічні реакції ставлять при підозрі на амебіаз, лейшманіоз, трипаносомоз і токсоплазмоз. Однак всі вони мають лише допоміжне діагностичне значення. Набагато ширше серологічні дослідження використовують при вивченні динаміки інфекційного процесу, ефективності проведеного лікування і особливо для виявлення інфікованості донорів з метою попередження посттрансузійної малярії, американського трипаносомозу тощо.

Методика постановки серологічних реакцій при протозоозах така сама, як і при інших інфекційних хворобах. Для виявлення та ідентифікації антитіл використовують антигенні діагностикуми, а для визначення антигенів – еритроцитарні антитільні діагностикуми.

Біологічний метод з діагностичною метою вживають порівняно рідко. Зараження лабораторних тварин (гвінейських свинок, кошенят, цуценят, хом'ячків, білих мишей) здебільшого проводять з метою вивчення наукових проблем, зокрема патогенності найпростіших, вірулентності окремих штамів, виявлення патологоанатомічних змін, лікарської ефективності різних препаратів тощо.

Найпростіший метод зараження лабораторних тварин – згодовування їх досліджуваним матеріалом, який добавляють до корму. Значно рідше цей матеріал вводять парентерально або через зонд у шлунок чи сліпу кишку при лапаротомії та ін. Впродовж 30 днів у тварин мікроскопічно досліджують кров, мазки-відбитки з паренхіматозних органів або гістологічні зрізи з уражених тканин. Останнім часом почали також використовувати зараження курячих ембріонів при діагностиці лейшманіозів і токсоплазмозів та тканинних культур при багатьох протозоозах.

Алергічні проби для діагностики протозойних інфекцій найчастіше використовують при лейшманіозах із лейшманіном та при токсоплазмозі з токсоплазміном. Методика постановки цих проб така сама, як і з іншими алергенами.

Розділ 18

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ОКРЕМИХ ПРОТОЗООЗІВ

Протозойні захворювання людини можуть викликати біля 50 видів патогенних найпростіших. На території України зустрічається 10 нозологічних форм, що спричиняються цими своєрідними мікроорганізмами. Розглянемо методи лабораторної діагностики найголовніших протозоозів.

Малярія

Малярія (пропасниця, болотна лихоманка) – гостра або хронічна ендемічна трансмісивна хвороба, що характеризується приступами гарячки, збільшенням печінки й селезінки, гемолітичною анемією, рецидивуючим перебігом. Захворювання у людей викликають 4 види малярійних плазмодіїв:

1. *Plasmodium vivax* – збудник триденної форми малярії;
2. *Plasmodium ovale* – викликає триденну овале-малярію;
3. *Plasmodium malariae* – збудник чотириденної форми малярії;
4. *Plasmodium falciparum* – викликає тропічну малярію.

Захворювання через укуси передають самиці комарів роду *Anopheles*. Окрім того, певне епідеміологічне значення має трансфузійна малярія, що виникає після переливання крові від донора-паразитоносія або при маніпуляції інструментами, забрудненими зараженою кров'ю.

У процесі своєї життєдіяльності плазмодії проходять складний цикл розвитку зі зміною хазяїна. Він складається з двох фаз: статевої (спорогонії), яка проходить у тілі самиці комара, і безстатевої (шизогонії), що відбувається в організмі людини. Спочатку плазмодії проникають у клітини печінки (тканинна шизогонія), пізніше – в еритроцити (еритроцитарна шизогонія). Успішна лабораторна діагностика малярії можлива саме в період еритроцитарної шизогонії.

Мікроскопічне дослідження товстої краплі і мазків крові є найпоширенішим і найважливішим методом діагностики захворювання. Кров від хворих треба брати до початку лікування й кілька разів повторювати під час лікування. Плазмодіїв у крові більше на висоті гарячки, особливо після 2-3-го приступу, хоч їх можна виявити і в період апірексії. Для дослідження крові від кожного хворого після проколу м'якоти пальця готують 4-8 препаратів (мазки і товсті краплі), які забарвлюють за методом Романовського-Гімзи. Ядра паразитів фарбуються в червоний, а цитоплазма – у синьо-голубий колір.

При наявності збудників в еритроцитах виявляють різні стадії їх розвитку: 1) кільцеподібні трофозоїти виникають після проникнення їх в еритроцити; вузенький обідок цитоплазми оточує вакуоль, яка витискає ядро до периферії і паразит за формою нагадує перстень (кільце); 2) амебоподібні трофозоїти (дорослі форми); 3) зрілі трофозоїти (шизонти), які діляться на 6-24 еритроцитарних мерозоїтів. При руйнуванні еритроцитів вони потрапляють у плазму крові. Частина мерозоїтів в еритроцитах перетворюється у незрілі чоловічі та жіночі статеві клітини – мікро- і макрогаметоцити.

Для визначення виду малярійних плазмодіїв необхідно вміти диференціювати їх морфологічні особливості. Спочатку проглядають товсті краплі. Якщо в них плазмодіїв не виявляють, тонкі мазки крові взагалі не досліджують. І лише при наявності паразитів у товстій краплі, особливості їх будови вивчають у мазках.

Морфологічна диференціація збудників малярії

P. vivax у товстій краплі. Голубі кільця збудника часто розірвані, шматочки цитоплазми набувають форми коми або пропелера. Амебоїдні шизонти мають вигляд окремих грудочок цитоплазми, серед яких виявляють червоне ядро і зерна пігменту. До морули входять 16-18 мерозоїтів. Гаметоцити мають круглу або овальну форму, забарвлені у блідо-рожевий колір, із невеликим ексцентрично розміщеним ядром. Найхарактерніша ознака цього виду плазмодіїв – поява напівпрозорої строми еритроцитів із збудником. У кожному полі зору видно велику кількість паразитів.

P. vivax у мазку крові. Як правило, виявляють усі стадії розвитку збудника. На стадії кільця він займає третину еритроцита, в якому зрідка може бути 2-3 паразити. На стадії шизонта вони набувають амебоїдної форми з появою вакуолі, а також бурого чи золотистого пігменту. При поділі зрілого шизонта утворюється від 4 до 20 ядер. Гаметоцити великі, мають округлу або довгасту форму. Уражені збудником еритроцити збільшуються в діаметрі й містять характерну зернистість Шюффнера червоного або фіолетового кольору (див. вкл., рис. 31).

***P. ovale* у товстій краплі.** Кільцеподібні трофозоїти мають цілий, а інколи й розірваний вигляд, загалом нагадують такі ж структури, як у *P. vivax*, але мають ядра трохи більших розмірів. Дозрілі шизонти числом від 6 до 12 розташовуються безладно навколо частинок пігменту. Гаметоцити такі самі, як у *P. vivax*.

***P. ovale* у мазку крові.** Інвазовані еритроцити збільшені в розмірах і мають овальну форму. Кільця і шизонти за розміром такі самі, як у *P. vivax*, але ядра паразитів набувають більших розмірів. Псевдоподії й вакуолі на цій стадії розвитку збудника не утворюються. Частинки пігменту темно-бурого кольору розташовані безладно по всій цитоплазмі (зернистість Джеймса). У морулі розміщені 6-12 мерозоїтів. На цій стадії розвитку пігмент вже збирається в купки, які розміщені ексцентрично. Навколо них безладно розташовані мерозоїти. Гаметоцити такі самі, як у збудника триденної малярії (див. вкл., рис. 32).

***P. malariae* у товстій краплі.** Вигляд кільця такий самий, як у *P. vivax*. Шизонти частіше мають округлу форму і значно рідше довгасту. Цитоплазма наповнена великою кількістю темних пігментних грудочок. На стадії морули утворюється від 6 до 12 мерозоїтів. Гаметоцити такі ж, як у *P. vivax*, їх діаметр не перебільшує розмірів нормального еритроцита. Строма інвазованих еритроцитів у товстій краплі не проглядається.

***P. malariae* у мазку крові.** На стадії кільця в еритроциті є лише один паразит, який має неправильну форму, займає 1/3-1/4 діаметра еритроцита і дуже подібний до кільця *P. vivax*. Шизонти правильної круглої форми і лише невелика частина з них набуває вигляду стрічки, тоді паразит витягується впоперек еритроцита. З одного боку його знаходиться довгасте ядро, з другого – зерна пігменту у вигляді грубих темних грудочок (зернистість Цимана). Морула найчастіше складається з 8 мерозоїтів. Гаметоцити за своєю формою подібні до аналогічних структур у *P. vivax*, але дещо менші за розмірами. У тонких мазках крові вони взагалі виявляються в малій кількості, переважно на 2-3-й тиждень хвороби (див. вкл., рис. 33).

***P. falciparum* у товстій краплі.** У перші дні хвороби виявляються лише характерні дрібні кільця або кільця і гаметоцити. Інколи цитоплазма кілець розривається і розташовується з обох боків від ядра (“крила ластівки”). Досить часто спостерігаються і розриви ядер. Якщо у препараті дуже мала кількість паразитів, необхідно повторити аналіз через 12-24 год. Важливо пам’ятати, що шизонти можна виявити лише при тяжких перебігах захворювання. Гаметоцити *P. falciparum* мають характерну півмісячну форму, особливо якщо вони розташовані по периферії краплі або в найтонших її ділянках. Саме за морфологічними особливостями гаметоцитів найімовірніше можна поставити діагноз тропічної малярії.

***P. falciparum* у мазку крові.** У периферичній крові знаходяться лише кільця. Вони мають найменші розміри. Діаметр кілець становить всього 1/8 розміру еритроцитів. Ядро виглядає маленьким, круглим, навколо нього є дуже тоненький обідок цитоплазми. Більш дорослі кільцеподібні трофозоїти мають дещо більші розміри (1/3 діаметра еритроцита), товстіший обідок цитоплазми, який різко звужується біля ядра. Такі морфологічні особливості збудника тропічної малярії утруднюють його диференціацію від інших видів. У еритроцитах із кільцевими трофозоїтами

при забарвленні протягом більше години часом виявляють невелику кількість азурофільних пігментних часточок (зернистість Мауера). Шизонти в тонких мазках практично не виявляються. Вони зустрічаються лише при розвитку коматового стану, що є загрозливою прогностичною ознакою. Ці форми паразитів також малі за розміром, а за формою подібні до шизонтів *P. malariae*. У них швидко зникають вакуолі, а грудочки пігменту інтенсивно забарвлені в чорний колір. Морула містить 12-24 дрібних мерозоїтів, які розташовані безладно (див. вкл., рис. 34).

Гаметоцити *P. falciparum* мають бананоподібну форму з центрально розташованим ядром. Вони майже цілком заповнюють еритроцити й деформують їх. У тонких мазках гаметоцити можуть розташовуватись і вільно між клітинами крові. Строк розвитку гаметоцитів в декілька разів перевищує тривалість шизогонії. Вони появляються в периферичній крові на 8-10-й день після виявлення кільцеподібних трофозоїтів і продовжують поступати в кров протягом кількох тижнів, навіть після зникнення клінічних симптомів хвороби. Досить часто при тропічній малярії в тонких мазках крові можуть зустрічатися тільки самі гаметоцити.

Морфологічні особливості основних збудників малярії у тонких мазках крові представлені в таблиці 75.

Під час мікроскопічного дослідження необхідно також оцінювати масивність інвазії, тобто визначати кількість плазмодіїв в 1 мл крові. Це особливо важливо при підозрінні на хлорокінрезистентну малярію, коли кількісне визначення паразитів у крові проводять до початку і в процесі лікування. Таке дослідження проводять за допомогою методу товстої краплі. Підраховують загальну кількість лейкоцитів і плазмодіїв у одному й тому ж полі зору. Потім вираховують загальне число паразитів, що припадає на 200 лейкоцитів, складають відповідну пропорцію з урахуванням вмісту лейкоцитів в 1 мл при визначенні формених елементів крові.

Дослідження крові на лейкоцитоз і кількісне визначення плазмодіїв малярії слід проводити синхронно, інакше результати будуть недостовірними.

За допомогою методу товстої краплі можна виявити збудників малярії при їх концентрації 10 тис. екземплярів в 1 мл крові.

Серологічне дослідження використовують, в основному, для виключення діагнозу малярії у хворих з гарячкою серед донорів та при епідеміологічному обстеженні неблагополучних щодо малярії регіонів. Наявність протиплазмодійних антитіл у високих титрах у жителів неендемичних або звільнених від малярії регіонів може бути доказом інфікування відповідним збудником.

У лабораторну практику впроваджені серологічні реакції непрямой гемаглютинації (РНГА), імуофлуоресценції (РІФ) та метод імуоферментного аналізу (ІФА). Для постановки РІФ як антиген використовують зрілі еритроцитарні шизонти плазмодіїв людини або мавп, а для ІФА – розчинені антигени еритроцитарних паразитів, адсорбовані на твердій фазі. Для епідеміологічного обстеження найбільш придатна непряма РІФ, яка дозволяє виявити антиген у мазках крові.

Розроблено і впроваджено новий метод діагностики з використанням ДНК-зондів з різними мітками. Метод дуже чутливий. Він базується на виявленні у лізованій крові високоспецифічних для збудників фрагментів ДНК.

Диференціальні ознаки малярійних плазмодіїв

Форми паразитів, еритроцити	<i>P. vivax</i>	<i>P. ovale</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. falciparum</i>
Молоді шизонти (кільця)	Кільця неправильної форми, займають 1/3-1/4 діаметра еритроцита	Такі самі за розмірами, як і в <i>P. vivax</i> , але з більшим ядром	Такі самі, як і в <i>P. vivax</i>	Дрібні кільця займають 1/8 діаметра еритроцита, часто по 2-3 кільця в еритроциті
Дорослі (амебоїдні) шизонти	Мають добре виражені псевдоподії	Псевдоподії нечіткі, частина шизонтів стрічкоподібної форми	Такі самі, як і в <i>P. ovale</i>	У периферичній крові, як правило, не виявляють
Морула	12-18 мерозоїтів, розташованих навколо пігмента	6-12 великих мерозоїтів, ядра крупніші	6-12, частіше 8 мерозоїтів, розташованих у вигляді розетки	12-24, частіше 16 дрібних мерозоїтів, розташованих безладно навколо пігмента
Гамонти	Круглої або овальної форми, за розміром більші від нормального еритроцита	Такі самі, як і в <i>P. vivax</i>	Меншого розміру, ніж у <i>P. vivax</i> , не більше від нормального еритроцита	Бананоподібної форми, цитоплазма синьо-бузкова, компактне ядро
Еритроцити	Збільшені і знебарвлені, азурофільні елементи у вигляді точок (зернистість Шюффнера)	25 % еритроцитів збільшені, овальної, інші неправильної форми, азурофільні елементи у вигляді великих зерен (зернистість Джеймса)	Нормальних розмірів, азурофільні елементи у вигляді дрібних пилинок (зернистість Цимана)	Нормальних розмірів, азурофільні елементи у вигляді плям (плямистість Маурера)

Токсоплазмоз

Токсоплазмоз – хронічна паразитарна хвороба, що характеризується ураженням нервової й лімфатичної систем, скелетних м'язів, міокарда, очей, печінки, селезінки, кишечного тракту. Розрізняють набутий і уроджений токсоплазмоз.

Збудником хвороби є *Toxoplasma gondii*, яка належить до родини *Eimeriidae*, класу *Sporozoa*. Найчастіше джерелом інфекції є коти, собаки, свині, рідше – інші домашні тварини і гризуни. Зараження відбувається переважно аліментарним шляхом при вживанні в їжу недостатньо термічно обробленого м'яса або через руки, забруднені екскрементами котів. Можлива й трансплацентарна передача збудника від матері до плода.

Діагностувати токсоплазмоз за клінічними симптомами досить важко. Тому лабораторні паразитологічні дослідження мають дуже важливе значення. Матеріалом для виявлення збудника може бути пунктат лімфовузлів, кісткового мозку, кров, спинномозкова рідина, біоптати тканин, від трупів – шматочки головного мозку, печінки, селезінки, легень; при патологічній вагітності – зскрібки із порожнини матки і плаценти та навколоплідна рідина. Доставлений матеріал підлягає мікроскопічному, культуральному, біологічному і серологічному дослідженню. Використовують також і алергічну пробу.

Мікроскопічне дослідження. З доставлених клінічних матеріалів виготовляють мазки, відбитки або гістологічні зрізи, які фіксують етанолом (метанолом) і забарвлюють за методом Романовського-Гімзи. За своєю формою токсоплазми нагадують дольку апельсина завдовжки 4-7 мкм, завширшки 2-4 мкм. Один кінець збудника загострений, другий злегка заокруглений. Цитоплазма забарвлюється в голубий колір, має вигляд однорідної маси з дрібними гранулами. Вакуолі, як правило, відсутні, або мають маленькі розміри. Полюси клітини забарвлюються більш інтенсивно. Ядро має рубіново-червоний колір, розташоване в центрі або трохи ближче до одного з полюсів (рис. 108).

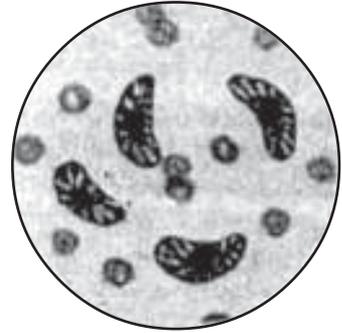


Рис. 108. *Toxoplasma gondii*: мазок крові.

Крім поодиноких паразитів у препаратах можуть спостерігатись і скупчення токсоплазм – псевдоцисти і цисти. Псевдоцисти утворюються при розмноженні збудника в клітинах хазяїна. Вони не мають своєї власної оболонки, а лише оболонку клітини. Після багатократних поділів клітина руйнується і токсоплазми вивільняються, проникають в нові клітини і цикл розмноження повторюється знову. Таку мікроскопічну картину – наявність псевдоцист і вільних токсоплазм – виявляють у гострий період хвороби.

У хронічній або латентній стадії інфекції токсоплазми виявляють переважно в тканинах макроорганізму (скелетні м'язи, тканини ока, головний мозок, міокард, легені, матка) у вигляді справжніх цист, що мають оболонку, утворену самими паразитами. Розміри цист коливаються від 20 до 100 мкм.

Виявлення вільних токсоплазм, псевдоцист і справжніх цист має беззаперечне діагностичне значення, хоч позитивні результати цей метод дає не так уже й часто. До того ж, часом за токсоплазми вважають дріжджові та інші клітини.

Біологічне дослідження. Для постановки біопроби з досліджуваного матеріалу, взятого у хворого або після його смерті, виготовляють гомогенат і вводять по 1,0 мл у черевну порожнину або головний мозок білих мишей чи золотистих хом'яків. Через 7-14 днів (рідше через місяць) після загибелі і розтину тварин у перитонеальній ексудаті мікроскопічно виявляють токсоплазми. Можна також досліджувати печінку, селезінку й легені загиблих тварин. У головному мозку появляються справжні цисти. Для їх виявлення шматочки мозкової тканини раздавлюють між предметним і покрівним скельцями, мікроскопують при малому збільшенні. Можна

також робити мазки-відбитки з мозкової тканини, фіксувати їх метанолом і фарбувати за Романовським-Гімзою.

Якщо інфіковані тварини не гинуть, за ними спостерігають протягом 6 тижнів, після чого ставлять серологічні реакції для виявлення специфічних антитіл. Для біологічної проби останнім часом використовують 7-8-денні курячі ембріони, які найчастіше заражають у хоріон-алантоїсну оболонку. Можна культивувати токсоплазми і в культурі клітин HeLa та ін.

Серологічні дослідження в сучасній діагностиці токсоплазмозу використовують найчастіше при раціональному та комбінованому застосуванні різних імунологічних реакцій, мають високу цінність. Специфічні антитіла до токсоплазм можна виявити за допомогою реакцій імунофлуоресценції, зв'язування комплекменту, непрямой гемаглютинації та латекс-аглютинації. Високочутлива й специфічна проба Себіна-Фельдмана.

Реакцію імунофлуоресценції використовують у непрямому варіанті. Антигеном для неї служить суспензія убитих токсоплазм, яку випускають централізовано. Спочатку до антигену додають сироватку хворого, потім утворений комплекс антиген-антитіло обробляють міченою флуорохромом антиглобуліновою сироваткою. Діагностичне значення має титр 1:80 і вище. За допомогою цієї реакції виявляють антитіла до токсоплазм уже в кінці першого тижня хвороби.

Для діагностики вродженого токсоплазмозу ставлять варіант цієї реакції – РІФ-IgM (тест Ремінгтона). Він виявляє антитіла класу IgM, які не проходять через плаценту, а, отже, наявність їх свідчить про інфікування новонародженого.

Реакцію зв'язування комплекменту ставлять, починаючи з третього тижня хвороби, за класичною схемою реакції Борде-Жангу. Антиген для РЗК виготовляють із перитонеального ексудату заражених токсоплазмами білих мишей або гвінейських свинків. Рекомендують ставити реакцію повторно, що дає змогу виявити наростання титру комплекменту зв'язуючих антитіл.

З діагностичною метою використовують також реакцію непрямой гемаглютинації (РНГА). Принцип її полягає в тому, що танізовані еритроцити легко адсорбують на собі лізований антиген токсоплазм. При наступному додаванні сироватки хворого, в разі наявності в ній антитіл, такий еритроцитарний діагностикум аглютинується.

Необхідно пам'ятати, що всі ці серологічні реакції при хронічному токсоплазмозі можуть бути негативними.

Широкого практичного використання для діагностики та масових епідеміологічних обстежень набула серологічна реакція з барвником Себіна-Фельдмана. Вона стає позитивною вже в кінці першого тижня хвороби. Механізм цієї реакції полягає в тому, що при дії специфічних антитіл на мембрану живих токсоплазм останні стають непроникними для барвника (метиленового синього), а отже, не забарвлюються і не втрачають своєї серпоподібної форми. Токсоплазми, оброблені нормальною сироваткою, при додаванні метиленового синього забарвлюються повністю і перетворюються із серпоподібних у круглі форми. Реакцію вважають позитивною, якщо не забарвлюються більше 50 % токсоплазм, при цьому враховують тільки позаклітинно розміщені паразити. Діагностичний титр становить

1:64 і вище. До впровадження в лабораторну практику флуоресцентних методів проба Себіна-Фельдмана вважалась найнадійнішим методом серологічної діагностики токсоплазмозу. Недоліком реакції є те, що для її постановки необхідно мати свіжий штам токсоплазм, вона технічно складна й не зовсім безпечна.

Останнім часом її поступово витісняють такі високоспецифічні методи, як імуноферментний та радіоімунний. Зокрема для ІФА використовують розчинний стандартний антиген токсоплазм і антитіла до імуноглобуліну людини, мічені пероксидазою або фосфатазою.

Алергічна проба. Найбільш доступним методом діагностики токсоплазмозу є внутрішньошкірна проба з токсоплазміном. Вона стає позитивною з 4-го тижня хвороби і зберігається протягом багатьох років. Техніка її постановки така сама, як і реакції Манту.

Облік реакції проводять через 24-48 год. При позитивному результаті в місці введення токсоплазміну виникає набряк і почервоніння шкіри. Проба дає можливість виявити сенсibiliзацію організму в результаті інфікування токсоплазмами, але не дає змоги судити про активність процесу.

Для правильної комплексної оцінки результатів лабораторних досліджень і алергічної проби потрібно паралельно використовувати 2 серологічні реакції та внутрішньошкірну пробу. Лише в такий спосіб можна поставити або відкинути діагноз на основі збігу (або навпаки) цих реакцій, особливо динаміки наростання титру антитіл. Це також вирішує питання, чи є у хворого недавно набутий токсоплазмоз, чи вже давно перенесене захворювання.

Трипаносомоз

Трипаносомози – протозойні трансмісивні хвороби людей і тварин, які викликають джгутикові найпростіші – трипаносоми. У людей зустрічаються дві форми трипаносомозів: африканський (сонна хвороба) і американський (хвороба Шагаса-Крузе).

Збудниками африканського трипаносомозу є *Trypanosoma gambiense* і більш вірулентна *Trypanosoma rhodesiense*. Захворювання характеризується гарячкою, висипаннями на шкірі, набряками, збільшенням лімфатичних вузлів, ураженням центральної нервової системи (сонливість) і другими симптомами. Джерелом інфекції в природі є людина (*T. gambiense*) і антилопа гну (*T. rhodesiense*), переносник – муха цеце.

Збудником американського трипаносомозу є *Trypanosoma cruzi*. Хвороба характеризується гарячкою, первинним афектом на шкірі, ураженням кишечника (мегаколон), серця, печінки, селезінки й центральної нервової системи; у дітей має гострий перебіг, у дорослих – переважно хронічний. Резервуар інфекції – хворі люди, щури, кішки, собаки, броненосці, переносник – триатомові (поцілункові) клопи. Всі три види трипаносом морфологічно подібні між собою.

Матеріалом для дослідження служить кров, спинномозкова рідина, пунктати кісткового мозку й лімфовузлів, шматочки уражених тканин. Для лабораторної діагностики використовують мікроскопічний, біологічний та серологічний методи.

Важливо зробити люмбальну пункцію для виявлення трипаносом у лікворі та розпізнавання природи уражень центральної нервової системи. В початковій стадії хвороби збудника можна виявити в крові та місці укусів (*T. rhodesiense*) або в шийних лімфатичних вузлах (*T. gambiense*).

Мікроскопічне дослідження. З крові виготовляють нативний препарат на давленій краплі, тонкий мазок і товсту краплю. У всіх препаратах легко побачити трипаносоми, які розташовуються позаклітинно. В нативному препараті при зменшенні інтенсивності освітлення видно рухливі паразити. У фіксованих мазках, забарвлених за методом Романовського-Гімзи, чітко видно голубу цитоплазму і продовгувато-овальне червоно-фіолетове ядро, розташоване в центрі збудника. Розміри трипаносом становлять 17-30 мкм у довжину і 1,5-2,0 мкм в ширину. На задньому кінці тіла видно блефаропласт, від якого відходить джгутик, що хвилеподібно звивається біля зовнішньої оболонки трипаносоми і спрямовується до її переднього кінця, де він трохи вільно виступає. Між тілом трипаносоми і джгутиком розташована ундулююча мембрана (рис. 109).

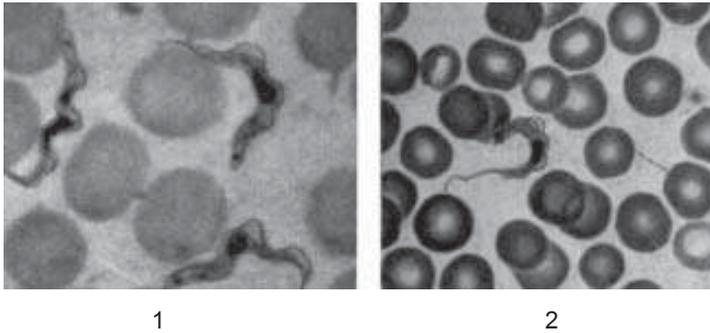


Рис. 109. *Trypanosoma gambiense* (1) і *Trypanosoma cruzi* (2) у мазку крові.

Якщо в досліджуваному матеріалі трипаносом не виявляють, вживають метод збагачення. Для цього 10 мл цитратної крові центрифугують 10 хв при 1500 об/хв, відсмоктують плазму, а з осаду готують препарати, які досліджують у нативному й забарвленому стані. Плазму

повторно центрифугують протягом 20 хв і з осаду готують мазки, фіксують метанолом і фарбують за методом Романовського-Гімзи. Так само забарвлюють мазки із ліквору, пунктатів лімфовузлів і кісткового мозку. Слід пам'ятати, що при ураженні центральної нервової системи трипаносоми в крові й пунктатах лімфатичних вузлів не виявляються.

У хворих на гостру форму американського трипаносомозу паразити досить легко виявляють у нативних і забарвлених препаратах. При хронічних формах захворювання трипаносоми в периферичній крові або зовсім не знаходять, або їх виявляють поодинокими дуже рідко при перегляді багатьох полів зору. Частіше їх можна побачити при застосуванні методу збагачення, як і при сонній хворобі.

У деяких випадках найефективнішим методом виявлення *T. cruzi* є ксенодіагностика. Декілька вирощених у лабораторії триатомових клопів, вільних від трипаносом, висаджують на шкіру хворого, щоб вони насмоктались крові з паразитами. Потім через 5 днів трипаносоми легко виявляють шляхом мікроскопії екскрементів інфікованих клопів.

Паразитологічне й біологічне дослідження. Патогенні трипаносоми всіх трьох видів можна культивувати на штучних живильних середовищах для найпростіших. Щоб виділити чисті культури трипаносом від хворих, роблять посіви крові або пунктів лімфатичних вузлів чи кісткового мозку. Для цього найчастіше використовують агар NNN (Novy-Neal-Nicolle), що містить дефібриновану кров кролика, середовище Веймана (кров'яний агар з цитратною плазмою крові людини) та ін. Посіви інкубують при температурі 22-26 °С. Характерні маленькі й прозорі колонії виростають на 3-4-й день після посіву.

Чисті культури трипаносом отримують також у курячих ембріонах (інокулюючи матеріал у хоріоналантоїсну оболонку), або в культурах ембріональних тканин щурів чи клітин HeLa. Культуральний метод діагностики використовують рідко, за винятком хвороби Шагаса-Крузі.

Для діагностики трипаносомозів можна використовувати постановку біологічної проби на різних експериментальних тваринах. При американському варіанті хвороби вводять 5-10 мл крові інтраперитонеально гвінейським свинкам, кошенятам або цуценятам. Через декілька днів у крові заражених тварин появляються трипаносоми. До *T. gambiense* особливо чутливі мавпочки роду *Erythrocebus*, а до *T. rhodesiense* – білі миші та щури.

При діагностиці африканського трипаносомозу важливо не тільки встановити вид збудника, а й стадію хвороби. Для цього досліджують спинномозкову рідину на вміст білка і кількість лімфоцитів. До першої (ранньої) стадії відносять ті випадки, коли кількість білка не перевищує 250 мг/мл, а число клітин не більше 3-х у 1 мл. Більш високий вміст білка й лімфоцитів свідчить про тяжке ураження центральної нервової системи, а, отже, про другу (пізню) стадію хвороби.

Серологічні реакції більш детально розроблені для діагностики американського трипаносомозу. Але тепер вже запропоновані методи визначення антитіл класів IgM та IgG в діагностичних титрах у всіх хворих на трипаносомоз. Для цієї мети використовують реакції преципітації, аглютинації, імунофлуоресценції та зв'язування комплементу. Антигеном для їх постановки служить екстракт із серцевих м'язів інвазованих тварин або живих трипаносом. Реакції аглютинації та преципітації використовують при гострих формах хвороби, а РЗК – при хронічних. Результати реакцій краще оцінювати при постановці методом парних сироваток.

Останнім часом розроблено специфічний і чутливий метод діагностики за допомогою ензимічених антитіл. Антигеном для ІФА служать лізати трипаносом від заражених тварин або лабораторних культур.

Лейшманіози

Лейшманіози – група хронічних антропонозних трансмісивних хвороб, які викликаються лейшманіями і передаються москітами; поширені серед населення тропічних і субтропічних країн.

Розрізняють шкірний лейшманіоз, який викликається *Leishmania tropica* і характеризується ураженням шкіри; шкірно-слизовий лейшманіоз, збудником якого

є *Leishmania brasiliensis*, супроводжується ураженням шкіри і слизових оболонок; вісцеральний лейшманіоз, що викликається *Leishmania donovani*, характеризується переважним ураженням внутрішніх органів. Кожен із трьох видів лейшманіозів реєструється в певних ендемічних регіонах планети.

Всі три види лейшманій відносяться до родини *Trypanosomatidae*, класу *Mastigophora* і мають ідентичні морфологічні властивості. Життєвий цикл цих паразитів складається з двох стадій: безджгутикової (амастиготної) – в організмі людини і джгутикової (промастиготної) – в тілі москіта. Безджгутикові форми є внутрішньоклітинними паразитами системи мононуклеарних фагоцитів, мають овальну форму, розміри 3-5 мкм у довжину і 1-3 мкм у ширину. Джгутикові форми більші за розміром (10-15×4-6 мкм), монотрихи, активно рухливі, добре культивуються на живильних середовищах.

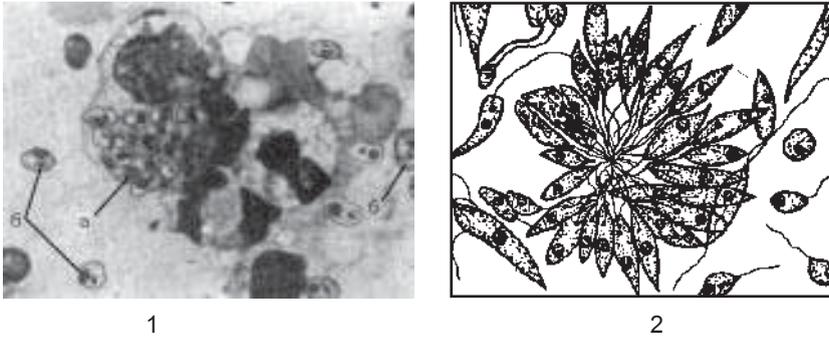
Джерелом і резервуаром інфекції в природі є домашні й дикі тварини (собаки, лисиці, шакали) та гризуни.

Матеріалом для лабораторної діагностики лейшманіозів шкіри і слизових оболонок служить вміст виразок і крайового інфільтрату, біоптати уражених тканин, пунктати лімфовузлів, кірочки слизової оболонки. Для збільшення частоти виявлення лейшманій важливо правильно взяти матеріал. Ділянку шкіри, де є горбик або крайовий інфільтрат навколо виразки, стискають між великим і вказівним пальцем лівої руки для знекровлення, потім скальпелем роблять поверхневий надріз епідермісу, зскрібають шматочки тканин з стінок і дна розрізу. Зскрібок разом з краплею рідини використовують для виготовлення мазка. У хворих на вісцеральний лейшманіоз беруть кров, пунктати кісткового мозку, печінки, селезінки, лімфатичних вузлів. Проводять мікроскопічні, культуральні, біологічні та серологічні дослідження, а також постановку алергічних проб.

Мікроскопічне дослідження є найбільш інформативним і поширеним методом діагностики всіх видів лейшманіозів. Виготовлені мазки фіксують етанолом, метанолом або сумішшю Никифорова, забарвлюють за методом Романовського-Гімзи, мікроскопують під імерсійним об'єктивом. Цитоплазма амастиготів і промастиготів фарбується в голубий, а ядро, кінетопласт і джгутики – у червоний або рожево-фіолетовий колір.

При вісцеральній формі хвороби лейшманії виявляють у пунктатах кісткового мозку або селезінки у 95-100 % випадків, а в пунктатах лімфатичних вузлів – у 40-75 %. Іноді паразитів можна побачити і в мазках крові (при індійському вісцеральному лейшманіозі майже завжди). У хворих на шкірну і слизову форми лейшманіозу в крові збудників практично не виявляють; у мазках із виразок і уражених тканин їх також мало. Тому необхідно повторювати дослідження декілька разів.

Безджгутикові форми лейшманій (амастиготи) розташовуються переважно в цитоплазмі гістофагоцитарних клітин. При виготовленні мазків ці клітини часто руйнуються і паразити можуть знаходитись і поза клітинами. Вони мають кулясту або овальну форму, містять ядро, паличкоподібний кінетопласт, але джгутики відсутні. Наявність чітко окресленого ядра і кінетопласта дозволяє відрізнити лейшманій від інших утворів, що зустрічаються в мазках (рис. 110).

Рис. 110. *Leishmania tropica*:

1 – безджгутикові форми в макрофагах (а) і позаклітинні (б); 2 – джгутикові форми.

Культуральні й біологічні дослідження. Якщо мікроскопічний метод дає негативні або сумнівні результати, проводять посіви взятих проб на NNN-агар. Одержати культури лейшманій при посівах крові вдається рідко, особливо у хворих на шкірну форму. Посіви інкубують при температурі 22 °С протягом 2-10 днів, щодня перевіряючи ріст за допомогою мікроскопії колоній під об'єктивом 40х. Для цього виготовляють нагивний препарат за методом надавленої краплі. У мазках із культур лейшманії набувають видовженої, веретеноподібної форми, розміри їх досягають 10-20 мкм завдовжки і 5-6 мкм завширшки. Вони обов'язково мають джгутики (промастиготи), часто розміщуються клубками (рис. 116). Якщо протягом 40 днів збудник не виявлено, видають негативний результат, але це не дає права виключити діагноз лейшманіозу. Лейшманії можна також вирощувати на хоріон-алантоїсній оболонці курячого зародка або в культурі клітин.

Порівняно рідко з діагностичною метою ставлять біологічну пробу. Для цього використовують білих мишей, ховрахів, золотистих хом'ячків. Тварин заражують внутрішньовенно або внутрішньоочеревинно пунктатами кісткового мозку, лімфатичних вузлів, рідше кров'ю хворих.

Серологічні дослідження широко використовують для проведення епідеміологічних обстежень населення в ендемічних регіонах, але для практичної діагностики захворювання вони мають допоміжне значення. Найчастіше ставлять реакції непрямой гемаглютинації з еритроцитарним діагностикомом, зв'язування комплементу та імунофлуоресценції. В якості антигену для них використовують 15-30-денні культури *L. donovani*. Однак всі ці реакції недостатньо специфічні й можуть давати позитивний результат при трипаносомозах.

Останнім часом для діагностики вісцерального лейшманіозу розроблена тест-система для проведення імуноферментного аналізу, в якій антигеном служить нерозведений екстракт із культур *L. donovani*. Метод ІФА виявився більш чутливим, специфічним і економічним, ніж навіть непряма реакція імунофлуоресценції. Діагностичний титр становить 1:400 і більше.

Алергічна проба. З метою ретроспективної діагностики, а також при масових епідеміологічних обстеженнях населення ендемічних регіонів широко проводять постановку внутрішньошкірної проби з лейшманіном (реакція Монтенегро).

Антигеном для неї служить поверхнева рідина або суспензія лейшманій, убитих нагріванням чи формаліном. Його вводять в об'ємі 0,1-0,2 мл. При позитивній реакції через 6-10 год на місці ін'єкції виникає гіперемія, набряк та інфільтрація. Максимум реакції настає через 48 год.

Амебіаз

Амебіаз (син.: амебна дизентерія) – протозойна інфекційна хвороба, що характеризується виразковим ураженням товстого кишечника, схильністю до рецидивуючого перебігу і позакишковими ускладненнями (абсцеси легень, печінки, головного мозку).

Збудник захворювання – *Entamoeba histolytica* – належить до класу саркодових. В організмі людини патогенна амеба може існувати у 4-х формах:

1. Велика вегетативна або тканинна форма (*forma magna*) має розмір 30-60 мкм, швидко пересувається за допомогою псевдоподій і здатна фагоцитувати еритроцити. Вона має кругле ядро, яке у свіжих нативних препаратах видиме лише при фазово-контрастній мікроскопії. Здатність фагоцитувати є характерною ознакою, що дає змогу відрізнити її від інших видів амеб кишечника.

2. Мала вегетативна або просвітна форма (*forma minuta*) має розмір 15-25 мкм, яка фагоцитуює бактерії та гриби і не пожирає еритроцити.

3. Вегетативна предцистна форма (*forma praecystica*) має розмір 10-20 мкм. Включення (мікроорганізми, еритроцити) в цитоплазмі відсутні.

4. Цистна форма (*forma cystica*) має правильну кулясту форму, розміром 8-15 мкм, не містить бактерій та інших харчових включень.

Основним джерелом інфекції є хворі на гостру і хронічну форму амебіазу, реконвалесценти та носії. Виділення цист може продовжуватись роками. Одна людина може щодоби виділяти близько 500 млн цист. Механізм зараження – фекально-оральний, цисти потрапляють в організм здорової людини разом із питною некип'яченою водою, харчовими продуктами, через брудні руки і предмети вжитку.

Для лабораторної діагностики амебіазу використовують мікроскопічні, культуральні, біологічні та серологічні дослідження. Матеріалом для мікробіологічного аналізу служать випорожнення, аспірати й біоптати, отримані при колонофіброскопії та ректороманоскопії, харкотиння, гній з уражених органів, кров для серологічних реакцій. При пересилці випорожнень до лабораторії, в якості консерванта використовують полівініловий спирт.

Мікроскопічне дослідження. Вирішальним у діагностиці амебіазу є дані паразитологічних досліджень. Великі тканинні форми з еритроцитами є патогномонічною ознакою гістолітичної амеби. Дуже важливим є також знаходження характерних чотириядерних цист.

Мікроскопують 5-6 препаратів “надавленої краплі” із свіжовиділеного калу (не пізніше 10 хв після випорожнення), а також мазки, забарвлені розчином Люголя, сумішшю Сафарлієва або залізним гематоксилином за Гейденгайном.

У нативних препаратах тканинна форма дизентерійної амеби має вигляд великих клітин, що активно рухаються. Ендоплазма і ектоплазма різко відрізняються між собою. Ендоплазма темніша, зерниста, в ній розташовані вакуолі з фагоцитованими еритроцитами або без них та мало помітне ядро, яке краще виявляється під фазово-контрастним мікроскопом. Ектоплазма більш світла й прозора, нерівномірної товщини. Мала просвітна форма менших розмірів має такий самий вигляд, але без фагоцитованих еритроцитів. Інколи в цитоплазмі можна виявити невелику кількість бактерій та грибів. Це основна форма існування гістолітичної амеби, яку виявляють при хронічному амєбіазі або у реконвалесцентів. При гострому перебігу хвороби та у носіїв її не знаходять. Цисти в нативних препаратах мають вигляд блискучих світлозаломлюючих кульок, розміром 8-15 мкм, їх внутрішній вміст мало помітний.

При використанні консерванта Сафарлієва цитоплазма дизентерійної амеби забарвлюється в голубий колір, ядро – в інтенсивно-синій, харчові й глікогенові вакуолі залишаються безбарвними. Цей метод дозволяє відрізнити *E. histolytica* від *Entamoeba coli*, у якої каріолема розташована ексцентрично, а грудочки хроматину різні за величиною.

У мазках, забарвлених за Гейденгайном, великі тканинні форми гістолітичної амеби чітко видимі на фоні багатьох еритроцитів, поодиноких лейкоцитів та бактерій. Цитоплазма амеби має чіткий поділ на світлу гомогенну безбарвну ектоплазму і темну дрібнозернисту ендоплазму темно-сірого кольору, в якій видно забарвлені в чорний колір еритроцити. Вони мають різну величину і форму залежно від ступеня їх перетравлення. В ендоплазмі амеби видно ядро розміром 3-5 мкм з тонкою оболонкою, під якою знаходяться дрібні зерна периферійного хроматину. Центр ядра займає п'ятикутна каріосома, також забарвлена в чорний колір (рис. 111). У мазках можуть зустрічатись дегенеративно змінені амеби, в яких видно інтенсивну вакуолізацію цитоплазми і пікноз ядра.

Цисти дизентерійних амеб мають правильну круглу форму, рідше – овальну, з гладенькою двоконтурною оболонкою. У цитоплазмі цист зрілого віку видно 4 ядра, у незрілих – 1-2 ядра. Під оболонкою ядер знаходяться серпоподібні зерна хроматину, в центрі – каріосома. У незрілих цист можна виявити вакуолі, що містять глікоген.

При забарвленні розчином Люголя великі тканинні й просвітні форми мають типову морфологічну структуру, але втрачають рухливість. Цисти мають форму кілець із п'ятикутною каріосомою в центрі. Незрілі цисти мають краплю глікогену, що фарбується в червоний колір.

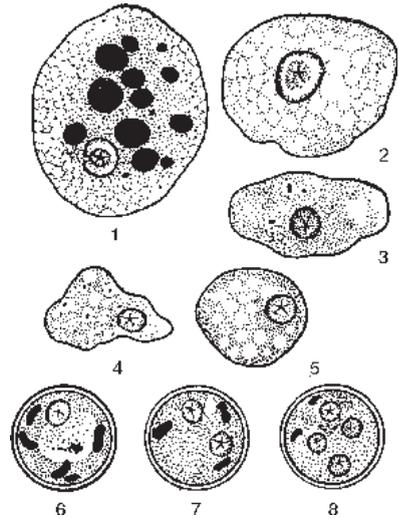


Рис. 111. Різні форми дизентерійної амеби: *E. histolytica* f. *magna* з еритроцитами (1) і без них (2); *E. histolytica* f. *minuta* (3-5); одно-, дво- і чотирядерні цисти (6-8).

Методика мікроскопічного дослідження слизу, гною, біоптатів, харкотиння така сама, як і при мікроскопії випорожнень, але позитивні результати отримати важко.

Культуральні й біологічні дослідження. Якщо виявити гістолітичні амеби при мікроскопії нативних і пофарбованих препаратів не вдається, роблять посіви досліджуваного матеріалу на середовище Робінзона або Павлової, до складу яких входить печінковий екстракт, виділяють та ідентифікують чисті культури. Але такий паразитологічний метод практичні лабораторії використовують дуже рідко.

У деяких випадках можна застосовувати постановку біологічної проби. Досліджуваним матеріалом заражають кошенят, хом'ячків та інших лабораторних тварин. Так, при введенні випорожнень хворих, що містять дизентерійні амеби, у пряму кишку кошенят, у них розвивається геморагічний коліт. У фекаліях заражених тварин збудника легко виявити при мікроскопії нативних препаратів.

Серологічні дослідження при амебіазі також проводять рідко, здебільшого для діагностики його позакишкових форм. При цьому використовують реакції непрямой гемаглютинації з антигеном із зруйнованих ультразвуком дизентерійних амеб, латекс-аглютинації, зв'язування комплементу, непрямой імуофлуоресценції, зустрічного імуоелектрофорезу та метод ІФА. Серологічні реакції випадають позитивними у 60-70 % хворих на кишковий амебіаз і в 90-95 % – при амебному абсцесі печінки, легень чи головного мозку.

Балантидіаз

Балантидіаз (син.: інфузорна дизентерія) – інфекційна протозойна хвороба, що характеризується гарячкою, болями в животі, проносом, виразковим ураженням товстої кишки і значним схудненням.

Збудник – *Balantidium coli* – належить до родини *Bursaryidae*, типу *Ciliophora*. Це найбільший за розміром представник найпростіших (до 500 мкм), що паразитують в організмі людини. Його легко виявити під малим збільшенням мікроскопа. Тіло балантидії несиметричне, має овальну форму, вкрите війками. Передній кінець дещо загострений, задній – більш овальний. Спереду і трохи збоку знаходиться ротова щілина (цистосом), позаду – анальна пора (цитопрокт). Розрізняють 2 форми балантидій – вегетативну і цистну.

Джерелом інфекції є інвазована людина, а також домашні та дикі свині, біля 80 % яких містять у кишечнику непатогенні для них балантидії. Спосіб інфікування фекально-оральний, найчастіше через воду, ґрунт, гній, предмети догляду за тваринами.

Лабораторна діагностика балантидіазу базується на мікроскопічному дослідженні свіжих випорожнень. Вегетативні форми паразита практично завжди можна виявити в рідких, а цисти (рідше) в оформлених випорожненнях. Краще всього матеріал для дослідження брати при сигмоїдоскопії або ректороманоскопії.

Мікроскопічне дослідження. Свіжі фекалії або слиз розводять теплим ізотонічним розчином хлориду натрію, виготовляють препарат надавленої або висячої

краплі й розглядають спочатку під малим, а потім під середнім збільшенням мікроскопа, використовуючи нагрівальний столик. Він дає змогу тривалий час спостерігати швидкий рух балантидіїв. Змінюючи інтенсивність освітлення, можна побачити миготливі війки, органи їди живлення і виділення. Ядро живих паразитів залишається непомітним. У травних вакуолях і ендоплазмі видно багато еритроцитів, грибів, бактерій та зерен крохмалю (рис. 112).

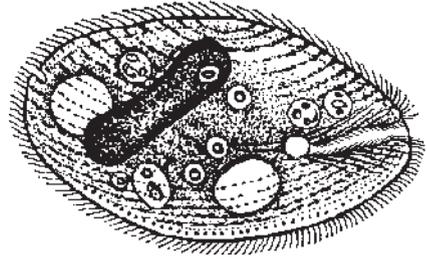


Рис. 112. *Balantidium coli*.
Вегетативна форма.

Якщо в нативних препаратах не виявляють живих паразитів, досліджують забарвлені. Для фарбування використовують слабкі розчини (1:1000-1:10000) метиленового синього або нейтрального червоного. При цьому балантидії не сприймають барвник і стають чітко видимими на голубому чи рожевому фоні вмісту кишечника.

Для забарвлення мертвих балантидіїв у фіксованих мазках краще всього використовувати залізниий гематоксилін з додаванням фуксину або карміну. При цьому стають добре видимі ряди війок, чорного кольору ядро, травні вакуолі з еритроцитами, мікроорганізмами та іншими клітинами.

Цисти в кишечнику людини утворюються рідко. Щоб їх виявити, потрібно взяти невеличку частинку фекалій або слизу і проемульгувати їх на предметному склі в краплі розчину Люголя, накрити покрівним скельцем, витримати 5-10 хв і мікроскопувати. Цисти мають кулясту або овальну форму, діаметром 40-60 мкм, жовто-коричневого кольору з двоконтурною оболонкою. При забарвленні гематоксиліном всередині цист добре видно бобоподібне ядро чорного кольору. Однак, останнім часом виявленню цист не надають великого діагностичного значення.

B. coli можна культивувати *in vitro* в різних середовищах для найпростіших. Зокрема, добрі результати отримують при посіві фекалій на середовище Ріса (МПБ, розведений 1:5 ізотонічним розчином хлориду натрію, до якого додають кінську сироватку і рисовий відвар). Додавання до середовища антибіотиків пригнічує розвиток супутньої мікрофлори і дає змогу надійніше виділяти чисті культури балантидіїв. Однак у практичних лабораторіях з діагностичною метою чисті культури виділяють дуже рідко.

Серологічні дослідження і алергічні проби також не проводять.

Лямбліоз

Лямбліоз (син.: гіардіоз) – протозойна інфекційна хвороба, що характеризується ураженням верхнього відділу тонкої кишки (дуоденіт) і жовчного міхура (холецистит). У більшості людей лямбліозна інвазія має безсимптомний перебіг або супроводжується лише дисфункцією кишечника. Збудником захворювання є *Lambliia intestinalis* (*Giardia intestinalis*) з родини *Hexamitidae*, класу *Zoomastigophora*.

Джерелом зараження є хворі люди або паразитоносії. В організмі людини лямблії розмножуються у величезній кількості. Протягом доби одна людина може виділити з випорожненнями до 18 млрд цист цього збудника. Лямбліоз зустрічається повсюдно. *L. intestinalis* виявляють у 10-12 % дорослих людей і у 50-80 % дітей дошкільного віку.

Механізм інвазії – фекально-оральний, факторами передачі є вода, їжа, іграшки, предмети вжитку, забруднені руки. Інвазивні лише цисти лямблій, які досить стійкі у зовнішньому середовищі.

Матеріалом для проведення лабораторної діагностики є випорожнення і дуоденальний вміст, отриманий при зондуванні, кров для серологічних реакцій.

Мікроскопічне дослідження. Із доставлених проб виготовляють нативні препарати надавленої краплі й мазки для забарвлення. Діагноз ставиться при виявленні вегетативних форм лямблій у дуоденальному вмісті або рідких випорожненнях, а також цист у оформлених фекаліях.

У нативних препаратах вегетативна форма лямблій виглядає плоскою, грушоподібною, з переднім заокругленим і заднім вузьким, загостреним краєм, загнутим у бік дорзальної поверхні. Паразит має білатеральну симетрію, його розміри в довжину 18-28 мкм, ширина у верхній частині тіла – 8-12 мкм. Спереду на черевній стороні знаходиться світла, округла заглибина – присмоктуючий диск (рис. 113). Це своєрідний присосок, за допомогою якого лямблія присмоктується до еритроцитів слизової оболонки кишечника.

У надавленій краплі можна спостерігати досить характерний коливальний або танцювальний рух, що нагадує політ листка, що падає.

Крім вегетативних форм лямблій у препаратах і мазках виявляють також цисти. Вони мають правильну овальну форму. Розміри цист становлять 8-17 мкм у довжину і 4-8 мкм у ширину.

При забарвленні мазків залізним гематоксиліном за Гайденгайном у лямблій легко виявити два округлих ядра і чотири пари джгутиків: одна пара відходить від заднього кінця тіла, решта – спереду, з боків і знизу. Від базальних тілець, що розташовані поблизу ядер, відходять дві паралельні нитки – аксостилі. На межі між передньою і середньою частиною лямблій розташовані одне-два парабазальних тіла, які мають трикутну або серпоподібну форму.

Цисти лямблій, забарвлені розчином Люголя, мають жовто-коричневий колір, правильну овальну форму, гладеньку тонку двоконтурну оболонку. Біля переднього кінця цист розташовані слабоконтуровані ядра – два в незрілих і чотири – в зрілих цистах. В середині цитоплазми можна виявити скручені джгутики. Більш демонстративно виглядають цисти в мазках, забарвлених залізним гематоксиліном. Ядра мають вигляд очок із темними центральними каріосомами, оточеними світлим незабарвленим обідком.

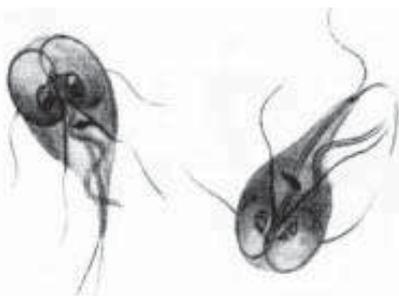


Рис. 113. *Lamblia intestinalis*.

Лямблії можна виростити на штучних живильних середовищах, до складу яких додають екстракти дріжджоподібних грибів, але культуральний метод діагностики захворювання не проводять.

Дуже рідко з діагностичною метою використовують серологічні дослідження, в основному, реакції непрямой гемаглютинації та непрямой імуофлуоресценції. Титри протилямбліозних антитіл випадають більшими при клінічно добре вираженому перебігу захворювання. Були також запропоновані алергічні внутрішньошкірні проби, але й вони не набули широкого використання.

Отже, основним методом лабораторної діагностики лямбліозу і паразитозів цих найпростіших є мікроскопічне дослідження дуоденального вмісту і випорожнень.

Трихомоноз

Трихомоноз (трихомоніаз) – протозойна, виключно антропоозна, хронічна хвороба урогенітального тракту, що найчастіше передається статевим шляхом. У жінок уражаються піхва, уретра, шийка матки, вульва, рідко – пряма кишка; у чоловіків – уретра, передміхурова залоза, придатки яєчок. Захворювання викликає *Trichomonas vaginalis* із родини *Trichomonadidae* класу *Zoomastigophora*. В організмі людини паразитують ще два види трихомонад: *T. tenax* – коменсал ротової порожнини і *T. intestinalis* – мешканець тонкого і товстого кишечника. Ротова і кишечна трихомонади дуже рідко спричиняють запальні процеси, переважно при дисбактеріозах. Найбільше значення в патології людини відіграє *T. vaginalis*. Джерелом інфекції є хворі люди або безсимптомні носії трихомонад. Захворювання найчастіше зустрічається у жінок дітородного віку.

Матеріалом для лабораторного дослідження на трихомоноз у жінок служать виділення з вагіни (особливо заднього склепіння), каналу шийки матки, уретри і парауретральних ходів. Його беруть за допомогою ложечки Фолькмана, жолобкуватого зонда або катетера. Найчастіше трихомонади виявляють у передменструальний період або в перші дні після закінчення менструацій.

У чоловіків досліджують зскрібки з уретри або виділення після масажу передньої уретри, сік простати, отриманий після її масажу, сперму та осад сечі після центрифугування. Дослідження проводять не пізніше, ніж через годину після взяття матеріалу. Виконують мікроскопічні й культуральні дослідження.

Метод мікроскопії. Вагінальні трихомонади легко виявляють при вивченні як нативних, так і забарвлених препаратів. Нативний мазок виготовляють шляхом внесення клінічного матеріалу в краплю теплої ізотонічної розчину хлориду натрію на підігрітому предметному склі. Суміш накривають покривним скельцем і досліджують під мікроскопом (об'єктив 40×, окуляр 10×). Особливо результативна фазово-контрастна мікроскопія, яка дає змогу спостерігати коливальний, обертовий та поштовхоподібний рух живих трихомонад. У нативному препараті *T. vaginalis* має грушоподібну, округлу або овальну форму з середнім розміром 13-20 мкм, інколи до 30 мкм (вдвічі більша за лейкоцит). Кількість джгутиків –

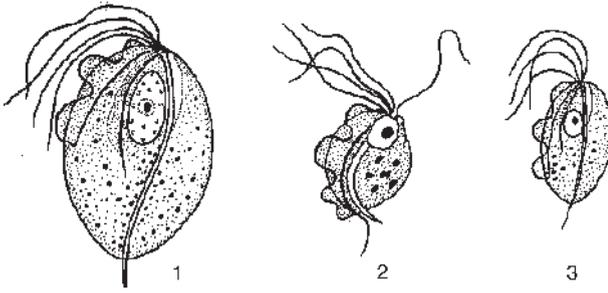


Рис. 114. Трихомонади людини:
1 – піхвова; 2 – кишкова; 3 – ротова.

чотири, один з них проходить уздовж тіла, утворюючи разом із складкою плазмолемі ундулюючу мембрану. Вона коротша за довжину тіла, тоді як у *T. intestinalis* – значно довша і закінчується вільним джгутиком (рис. 114). Трихомонади не утворюють цист.

Для виготовлення забарвлених препаратів з клінічного матеріалу готують тонкі мазки, висушують на повітрі, фіксують етанолом, метанолом або сумішшю Никифорова й фарбують за методом Романовського-Гімзи, Грама або метиленовим синім. Після забарвлення 5 % розчином азур-еозину протягом 60 хв цитоплазма джгутиків та ундулююча мембрана видимі дуже чітко. Ядро фарбується у темно-фіолетовий колір. Воно, як правило, розташоване ексцентрично, має подовжену, часто ромбоподібну форму (кісточка сливи). Це одна з основних ознак трихомонад, розташованих всередині епітеліальних клітин. Спереду від ядра розміщені блефаропласти, від яких беруть початок джгутики, ундулююча мембрана і аксостиль, що трохи виступає на задньому кінці тіла.

При фарбуванні за методом Грама мазок має оранжево-червоне забарвлення на тонких місцях мазка і темно-фіолетове – на товстих. Вагінальні трихомонади забарвлюються блідо. Оболонка їх має вигляд тонкої смужки, сітчаста цитоплазма набуває оранжево-червоного кольору, ядро – фіолетового. Джгутики та ундулююча мембрана не помітні.

При забарвленні метиленовим синім продовгувате ядро трихомонад набуває темно-синього кольору. Добре проглядається пінистість голубої цитоплазми. На поверхні епітеліальних клітин видно велику кількість лейкоцитів.

Негативні результати мікроскопічного дослідження не слід оцінювати як остаточні. Обстеження необхідно повторити через 2-3 тижні.

Метод виділення культур. Клінічний матеріал сіють у спеціальне рідке середовище, яке містить гідролізат казеїну, дріжджовий автолізат, сироватку коней, мальтозу, солі натрію, калію, кальцію, пеніцилін і стрептоміцин (по 1000 ОД/мл). Перед посівом середовище заливають вазеліновим маслом. Через 3-5 днів після інкубації посівів при 35-37 °С проглядають пробірки на виявлення росту. Піхвові трихомонади на цьому середовищі дають придонний ріст з утворенням компактного білого осаду. Взятий пастерівською піпеткою осад досліджують мікроскопічно в препараті надавленої краплі. Трихомонади в полі зору можуть розміщуватись поодиночі або великими скупченнями. Вони активно рухаються.

При негативному результаті посіви витримують у термостаті 9-17 діб, перевіряючи наявність росту мікроскопічно.

Культуральний метод особливо цінний при діагностиці трихомонозу у чоловіків, а також для перевірки ефективності проведеного лікування.

Криптоспоридіоз, ізоспороз

Останнім часом, переважно як індикаторні протозоози при ВІЛ-інфекції, описують криптоспоридіози та ізоспорози.

Криптоспоридіоз – протозойна кишкова інфекція, яку викликає *Cryptosporidium tezze* з родини кокцидій. Джерелом зараження є молоді телята, ягнята, кошенята, цуценята, у яких спостерігається діарея. Захворювання раніше розглядали як рідкісну, безсимптомну інфекцію у працівників тваринницьких ферм та сільського населення. Тепер воно частіше виникає у осіб з імунодефіцитами, особливо у хворих на ВІЛ-інфекцію, має затяжний або рецидивуючий характер. За умов глибокого імунодефіциту криптоспоридіоз може уражувати легені, жовчеві шляхи, жовчевий міхур.

Основним методом діагностики є мікроскопія мазків з випорожнень, в яких виявляють ооцисти криптоспоридіїв. Препарати забарвлюють за методом Ціля-Нільсена з додаванням до карболового фуксину диметилсульфоксиду. Ооцисти мають вигляд яскраво-червоних або яскраво-оранжевих дуг. Із серологічних методів діагностики перевагу віддають реакції імунофлуоресценції.

Ізоспороз – протозойна кишкова інфекція, яка може виникати як у тварин, так і в людей. Збудником хвороби є *Isospora belli* з родини кокцидій. За своїми епідеміологічними особливостями і патогенезом це захворювання подібне до криптоспоридіозу. Лабораторна діагностика базується на мікроскопії мазків-відбитків із фекалій. Необхідно пам'ятати, що концентрація ізоспор у фекаліях значно менша, ніж криптоспоридіїв, у зв'язку з чим необхідно використовувати методи збагачення шляхом седиментації або флотатії. Після збагачення мазки забарвлюють за Цілем-Нільсеном.

Література

1. Антибиотики. Смирнов В.В., Василевская И.А., Резник С.Р. – К.: Вища школа, 1985. – 191 с.
2. Антисептики у профілактиці й лікуванні інфекцій / Кол. авторів; за ред. Палія Г.К. – К.: Здоров'я, 1997. – 201 с.
3. Бактерии рода *Pseudomonas* / Смирнов В.В., Киприанова Е.А.; Отв. ред. Айзенман Б.Е. – К.: Наукова думка, 1990. – 264 с.
4. Бактерийные, сывороточные и вирусные лечебно-профилактические препараты. Аллергены. Дезинфекционно-стерилизационные режимы поликлиник /Под ред. Н.А. Озерецковского, Г.И. Останина. – СПб: Фолиант, 1998. – 420 с.
5. Белозеров Е.С., Змушко Е.И. ВИЧ – инфекция. 2-е изд. – СПб: Питер, 2003 – 386 с.
6. Борисов Л.Б., Козьмин-Соколов Б.Н., Фрейдлин И.С. Руководство к лабораторным занятиям по медицинской микробиологии, вирусологии, иммунологии / Под ред. Борисова Л.И. – М.: Медицина, 1993. – 232 с.
7. Букринская. Вирусология. – М.: Медицина, 1986. - 336 с.
8. Вершигора А.Е. Общая иммунология: Учеб. пособие. – К.: Вища шк., 1990. – 736 с.
9. Гайдаш І.С., Флегонтова В.В. Медична вірологія: Підручник. – Луганськ, 2002. – 257 с.
10. Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология: Учебник. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Изд-во МГУ, 1992. – 448 с.
11. Джавец Э., Мельник Дж. Л., Эйдельберг Э. А. Руководство по медицинской микробиологии. В 3-х т. Пер. с англ. – М.: Медицина, 1982.
12. Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология. – М.: Медиц. информац. агентство, 2003. – 604 с.
13. Дранник Г.М., Гриневич Ю.Я., Дизик Г.М. Імуноотропні препарати. – К.: Здоров'я, 1994. – 288 с.
14. Кашкин П.Н., Лисин В.В. Практическое руководство по медицинской микологии. – М.: Медицина, 1983. – 321 с.
15. Кротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология. – СПб.: 1998. – 580 с.
16. Клиническая иммунология и аллергология: В 3-х т. Пер. с нем. / Под ред. Йегера Л. – М.: Медицина, 1990.
17. Красильников А.П. Справочник по антисептике. – Мн.: Высшая школа, 1995. – 367 с.
18. Медицинская микробиология / Гл. ред. В.И. Покровский, О.К. Поздеев – М.: Геотар Мед., 1998. – 1200 с.
19. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: Учебник /Борисов Л.Б., Смирнова А.М., Фрейдлин И.С. и др.; Под ред. Борисова Л.Б., Смирновой А.М. – М.: Медицина, 1994. – 528 с.
20. Навашин С.М., Фомина И.П. Рациональная антибиотикотерапия (справочник). – М.: Медицина, 1982. – 496 с.
21. Пяткін К.Д., Кривошеїн Ю.С. Мікробіологія з вірусологією та імунологією: Підручник / Пер. з рос. – К.: Вища школа, 1992. – 431 с.

22. Общая вирусология: Руководство. В 2-х т. / Под ред. Жданова В.М., Гайдамович С.Я. – М.: Медицина, 1982.
23. Поздеев О.К. медицинская микробиология: Учебник / Под ред. В.И. Покровского. – М.: Геотар Мед., 2001. – 768 с.
24. Посібник з медичної вірусології / Гирін В.М., Порохницький В.Г., Вороненко С.Г та ін.; За ред. Гиріна В.М. – К.: Здоров'я, 1995. – 386 с.
25. Ройт А. Основы иммунологии. Пер. с англ. – М.: Мир, 1991. – 328 с.
26. Руководство к практическим занятиям по медицинской микробиологии и лабораторной диагностике инфекционных болезней / Под ред. проф. Кривошеина Ю.С. – К.: Вища школа, 1986. – 376 с.
27. СПИД – синдром приобретенного иммунодефицита / Под ред. Широбокова В.П. – К.: Здоров'я, 1988. – 232 с.
28. Тимаков В.Д., Левашов В.С., Борисов Л.Б. Микробиология. – М.: Медицина, 1983. – 511 с.
29. Фролов А.Ф. Персистенция вирусов (Механизмы и клиноэпидемиологические аспекты). – В.: Изд-во Винницкого медицинского университета им. Н.И. Пирогова, 1995. – 233 с.
30. Фролов А.Ф., Шевченко Л.Ф., Широбоков В.П. Практическая вирусология. – К.: Здоров'я, 1989. – 246 с.
31. Хаитов Р.М., Игнатъева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология: Учебник. – М.: Медицина, 2000. – 432 с.
32. Шлегель Г. Общая микробиология: Пер. с нем. – М.: Мир, 1987. – 567 с.
33. Энтеробактерии. Руководство для врачей / Под ред. Покровского В.И. – М.: Медицина, 1985. – 320 с.
34. De Almeida A.F. Antibiotics in Clinical Practice. – Basel, RECOM. – Publishers, 1991. – 141 p.
35. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2 / Ed. J. Holt. – Baltimore: Williams A. Wilcins, 1986.
36. Principles of bacteriology, virology and immunity. Vol 3. Bacterial diseases / Ed. G.R. Smith. – London, 1983-1984. – 610 p.

Зміст

Передмова	3
Список умовних скорочень	4
Частина I. ЗАГАЛЬНА МІКРОБІОЛОГІЯ.....	5
<i>Розділ 1. ОРГАНІЗАЦІЯ, УСТАТКУВАННЯ, РЕЖИМ РОБОТИ БАКТЕРІОЛОГІЧНИХ, ІМУНОЛОГІЧНИХ І ВІРУСОЛОГІЧНИХ ЛАБОРАТОРІЙ (І.О. Ситник)</i>	<i>5</i>
<i>Розділ 2. МЕТОДИ ЛАБОРАТОРНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ (І.О. Ситник)</i>	<i>10</i>
Мікроскопічні методи дослідження мікроорганізмів	11
<i>Розділ 3. МОРФОЛОГІЯ МІКРООРГАНІЗМІВ (І.О. Ситник)</i>	<i>19</i>
Виготовлення мазків і методи їх забарвлення	19
Прості способи забарвлення бактерій	23
Феноловий фуксин Циля	23
Фуксин Пфейфера	24
Насичений спиртовий розчин метиленової синьки	24
Метиленова синька за Леффлером	24
Водно-спиртовий розчин метиленової синьки	24
Особливості морфології інших груп мікроорганізмів	27
Складні методи забарвлення бактерій	32
Забарвлення окремих структур мікробної клітини	35
Мікроскопічне дослідження живих мікробів	42
<i>Розділ 4. ФІЗІОЛОГІЯ БАКТЕРІЙ (С.І. Климнюк)</i>	<i>45</i>
Культивування мікроорганізмів	45
Основні методи стерилізації	50
Бактеріологічне дослідження	59
Методи виділення чистих культур, засновані на механічному принципі	61
Методи виділення чистих культур, засновані на біологічному принципі	62
Етапи виділення чистих культур мікроорганізмів та їх ідентифікація	64
Виділення чистої культури анаеробних бактерій	71
Виділення та ідентифікація анаеробних мікроорганізмів	73
Середовища для культивування анаеробних мікроорганізмів	75
Ідентифікація мікроорганізмів за допомогою бактеріофагів	75
Визначення бактеріоциногенності мікроорганізмів	76
Молекулярно-генетичні методи	77
<i>Розділ 5. ЕКОЛОГІЯ МІКРООРГАНІЗМІВ (І.О. Ситник)</i>	<i>78</i>
Мікробіологічне дослідження води	78
Дослідження мікрофлори повітря	85

Мікробіологічне дослідження ґрунту	88
Мікробіологічні дослідження змивів із рук та предметів	90
Мікробіологічні дослідження харчових продуктів	91
Дослідження мікрофлори людини	94
Розділ 6. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ІНФЕКЦІЯ. ВИКОРИСТАННЯ ТВАРИН В ЛАБОРАТОРНИХ ДОСЛІДЖЕННЯХ (І.О. Ситник)	100
Способи зараження експериментальних тварин	102
Мікробіологічне дослідження трупа	107
Визначення вірулентності мікроорганізмів, смертельної дії екзотоксинів та ендотоксинів	109
Розділ 7. ГЕНЕТИКА БАКТЕРІЙ (С.І. Климнюк)	111
Розділ 8. ВИЗНАЧЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ БАКТЕРІЙ ДО АНТИБІОТИКІВ (С.І. Климнюк)	113
Частина II. ІМУНОЛОГІЯ	125
Розділ 9. ІМУНОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ ІНФЕКЦІЙНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ (М.С. Творко)	125
Реакція аглютинації (РА)	126
Реакція преципітації (РП)	137
Реакція лізису	140
Реакція імунофлуоресценції (РІФ)	145
Імуноферментні методи (ІФА)	146
Радіоіmunні методи (РІМ)	148
Імуноблотинг	149
Дослідження імунного статусу організму	151
Оцінка стану В-системи імунітету	152
Оцінка клітинного імунітету – стану Т-системи	154
Визначення стану системи фагоцитозу	156
Визначення активності системи комплементу	157
Розділ 10. ІМУНОПРОФІЛАКТИКА ТА ІМУНОТЕРАПІЯ ІНФЕКЦІЙНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ (М.С. Творко)	160
Показання і протипоказання до проведення профілактичних щеплень	166
Серотерапія і серопротекція	167
Частина III. СПЕЦІАЛЬНА МІКРОБІОЛОГІЯ	172
Розділ 11. МІКРОБІОЛОГІЧНА ДІАГНОСТИКА ОКРЕМИХ ІНФЕКЦІЙНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ (І.О. Ситник)	172
Стафілококові інфекції	172
Стрептококові інфекції	177

Менінгококові інфекції	183
Гонококові інфекції	186
Ешерихіози	190
Захворювання, спричиненні умовно-патогенними ентеробактеріями	194
Черевний тиф і паратифи	199
Сальмонельози (харчові токсикоінфекції)	206
Дизентерія (шигеліоз)	209
Клебсіельози	212
Холера	214
Кампілобактеріози і гелікобактеріози	221
Чума	223
Псевдотуберкульоз	227
Кишечний ієрсиніоз	228
Туляремія	229
Бруцельоз	232
Сап і меліюїдоз	237
Сибірка (злоякісний карбункул)	239
Мікробіологічна діагностика анаеробних інфекцій	243
Ботулізм	243
Правець	247
Ранова анаеробна газова інфекція	249
Бактероїдози	253
Дифтерія	257
Коклюш і паракклюш	263
Псевдомонадні інфекції	265
Інфекції, викликані гемофільними бактеріями	267
Легіонельози	269
Лістеріоз	270
Туберкульоз	272
Лепра (проказа)	279
Мікобактеріози	280
Актиномікоз	282
Нокардіоз	283
Сифіліс та інші трепонематози	284
Ендемічні побутові трепонематози	290
Лептоспіроз	292
Бореліози	295
Епідемічний поворотний тиф	296
Ендемічний поворотний тиф	297
Бореліоз Лайма	298
Рикетсіози	299
Епідемічний висипний тиф	299
Ендемічний висипний тиф	301

Ку-гарячка	302
Північноазіатський рикетсіоз	303
Гарячка цуцугамуші	304
Пароксизмальний рикетсіоз	305
Хламідіози	306
Трахома	306
Орнітоз	308
Респіраторний хламідіоз	309
Сечостатевий хламідіоз	310
Мікоплазмоси	312
Частина IV. ВІРУСОЛОГІЯ	316
<i>Розділ 12. БУДОВА І КЛАСИФІКАЦІЯ ВІРУСІВ (В.П. Ширококов)</i>	<i>316</i>
Методи лабораторної діагностики вірусних інфекцій	321
Методи ідентифікації вірусів	329
Виділення та титрування бактеріофагів	335
<i>Розділ 13. ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ВІРУСНИХ</i>	
<i>ІНФЕКЦІЙ (В.П. Ширококов)</i>	<i>339</i>
Грип	339
Параміксовірусні інфекції	344
Парагрип	344
Епідемічний паротит	346
Кір	347
Респіраторно-синцитіальні інфекції	348
Ентеровірусні інфекції	349
Ротавірусні гастроентерити	352
Герпесвірусні інфекції	354
Простий герпес	354
Вітряна віспа – оперізуючий герпес	355
Цитомегалія	356
Аденовірусні інфекції	357
Коронавірусні інфекції	358
Сказ	360
Гарячки Марбург і Ебола	361
Арбовірусні інфекції	362
Весняно-літній кліщовий енцефаліт	362
Японський енцефаліт	363
Гарячка Західного Нілу	364
Жовта гарячка	364
Геморагічні гарячки	365
Кримська-Конго геморагічна гарячка	365
Геморагічна гарячка з нирковим синдромом	366

Краснуха	367
Лімфоцитарний хориоменінгіт	369
Вірусні гепатити	369
Гепатит А	370
Гепатит В	372
Гепатит С, Д, Е, G	374
ВІЛ-інфекція	375
<i>Розділ 14. ШПИТАЛЬНІ ІНФЕКЦІЇ (І.О. Ситник)</i>	<i>379</i>
Частина V. МІКОЗИ	388
<i>Розділ 15. МЕТОДИ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ</i>	
МІКОЗІВ (І.О. Ситник)	388
<i>Розділ 16. ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ОКРЕМИХ</i>	
МІКОЗІВ (І.О. Ситник)	392
Кандидоз	392
Дерматомікози	395
Глибокi (вісцеральні) мікози	399
Плісняві (цвільові) мікози	405
Частина VI. ПРОТОЗОЙНІ ІНФЕКЦІЇ	409
<i>Розділ 17. МЕТОДИ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ (І.О. Ситник)</i>	<i>409</i>
<i>Розділ 18. ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ОКРЕМИХ</i>	
ПРОТОЗООЗІВ (І.О. Ситник)	412
Малярія	412
Морфологічна диференціація збудників малярії	413
Токсоплазмоз	416
Трипаносомоз	419
Лейшманіози	421
Амебіаз	424
Балантидіаз	426
Лямбліоз	427
Трихомоноз	429
Криптоспоридіоз, ізоспоров	431
Література	432

Посібник

Климнюк Сергій Іванович,
Ситник Іван Олександрович,
Творко Михайло Стефанович,
Широбоков Володимир Павлович

ПРАКТИЧНА МІКРОБІОЛОГІЯ

Редактор	<i>Ольга Котульська</i>
Оформлення обкладинки	<i>Павло Кушик</i>
Технічний редактор	<i>Світлана Демчишин</i>
Коректор	<i>Леся Капкаєва</i>
Комп'ютерна верстка	<i>Наталія Нижегородова</i>

Підписано до друку 5.02.2004. Формат 70×100/16. Гарнітура Times.
Друк офсетний. Ум. др. арк. 35,75. Обл.-вид. арк. 37,95. Папір офсетний.
Наклад 2000. Зам. № 54.

Оригінал-макет підготовлено у відділі комп'ютерної верстки
видавництва “Укрмедкнига”
Тернопільської державної медичної академії ім. І.Я. Горбачевського.
Майдан Волі, 1, м. Тернопіль, 46001, Україна.

Надруковано у друкарні видавництва “Укрмедкнига”
Тернопільської державної медичної академії ім. І.Я. Горбачевського.
Майдан Волі, 1, м. Тернопіль, 46001, Україна.

Свідоцтво про внесення до державного реєстру суб'єктів видавничої справи
ДК № 348 від 02.03.2001 р.