

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА МИКРОБИОЛОГИИ, ВИРУСОЛОГИИ, ИММУНОЛОГИИ

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В МИКРОБИОЛОГИИ

Учебно-методическое пособие



Минск БГМУ 2010

УДК 576.8.073.3 (075.8)
ББК 52.64 я 73
М 54

Рекомендовано Научно-методическим советом университета в качестве учебно-методического пособия 24.03.2010 г., протокол № 8

А в т о р ы: канд. мед. наук, доц. Ж. Г. Шабан; канд. мед. наук, доц. В. В. Слизень; канд. мед. наук, доц. Т. А. Канашкова; канд. мед. наук, доц. И. А. Крылов

Р е ц е н з е н т ы: канд. мед. наук, доц. Э. В. Бутвиловский; канд. мед. наук, доц. А. М. Близнюк

Методы исследования в микробиологии : учеб.-метод. пособие / Ж. Г. Шабан
М 54 [и др.]. – Минск : БГМУ, 2010. – 124 с.

ISBN 978–985–528–216–8.

Рассматриваются особенности применения современных микробиологических методов исследования. Описаны виды биоматериалов и методы их забора для микробиологических исследований, техника выполнения методов, приведены критерии интерпретации результатов, контроль качества и стандартизация процедур, указаны преимущества и недостатки методов, изложены вопросы организации проведения микробиологического исследования.

Предназначено для студентов 2-го курса всех факультетов.

УДК 576.8.073.3 (075.8)
ББК 52.64 я 73

ISBN 978–985–528–216–8

© Оформление. Белорусский государственный
медицинский университет, 2010

Список сокращений

- Аг — антиген
АЛМИ — аллергологический метод исследования
Ат — антитело
БЛМИ — бактериологический метод исследования
БСМИ — бактериоскопический метод исследования
ВИЧ — вирус иммунодефицита человека
ГЗТ — гиперчувствительность замедленного типа
ГНТ — гиперчувствительность немедленного типа
ИФА — иммуноферментный анализ
КОЕ — колониеобразующая единица
МБК — минимальная бактерицидная концентрация
МИК — минимальная ингибирующая (подавляющая) концентрация
ООИ — особо опасные инфекции
п. о. — пара олигонуклеотидов
ПДАФ — полиморфизм длины амплифицированных фрагментов
ПП-ПЦР — полимеразная цепная реакция с использованием произвольных праймеров
ПЦР — полимеразная цепная реакция
ПЦР-ПДРФ — полиморфизм длины рестрикционных фрагментов
РА — реакция агглютинации
РИА — радиоиммунный анализ
РИФ — реакция иммунофлюоресценции
РН — реакция нейтрализации
РП — реакция преципитации
РПГА — реакция пассивной гемагглютинации
РСК — реакция связывания комплемента
РТГА — реакция торможения гемагглютинации
РТГАдс — реакция торможения гемадсорбции
СЛМИ — серологический метод исследования
УПМ — условно-патогенные микроорганизмы
ЭМ — электронная микроскопия
ЭМИ — экспериментальный метод исследования

Техника безопасности при работе с биологическим материалом

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

Биологическая безопасность — порядок осуществления лабораторных исследований и специальное оснащение микробиологических лабораторий, которые защищают персонал лабораторий и окружающую среду при работе с потенциально инфекционными микроорганизмами.

Уровень биобезопасности — уровень мер предосторожности, необходимых при работе с потенциально опасными биологическими агентами. Различают четыре уровня биобезопасности (табл. 1). В зарубежных странах более высокий номер уровня биобезопасности означает возрастающий риск при выполнении лабораторных исследований.

В Республике Беларусь и России по степени опасности для человека и окружающей среды также выделено **четыре группы возбудителей инфекционных заболеваний**, однако, наоборот, более низкий номер группы означает возрастающий риск при выполнении лабораторных исследований:

– I группа — возбудители ООИ: чумы, натуральной оспы, геморрагических лихорадок (Ласса, Эбола и др.);

– II группа — возбудители высококонтагиозных бактериальных, грибковых и вирусных инфекций: сибирской язвы, бруцеллеза, туляремии, холеры, сыпного тифа, бластомикоза, бешенства, СПИДа, гепатитов В и С и др., ботулотоксины и столбнячный токсин;

– III группа — возбудители других инфекций: коклюша, столбняка, ботулизма, туберкулёза, трихомониаза, малярии, лейшманиоза, гриппа, полиомиелита, герпесвирусы и др.;

– IV группа — условно-патогенные (возбудители газовой гангрены, клебсиеллы, стафилококки, стрептококки, синегнойная палочка, некоторые кандиды и аспергиллы, амёбы, аденовирусы, ротавирусы, энтеровирусы и др.) и непатогенные микроорганизмы.

Аттенуированные штаммы возбудителей I–II групп относятся к микроорганизмам III группы патогенности, а аттенуированные штаммы III–IV групп — к IV группе патогенности.

Работа с материалом, содержащим микроорганизмы I–II групп патогенности, требует соблюдения строгих мер безопасности для предупреждения случаев внутрилабораторного заражения, выноса инфекции за пределы лаборатории и предупреждения контаминации окружающей среды, поэтому исследования проводятся в специально оборудованных режимных микробиологических лабораториях специально обученным и вакцинированным персоналом (если существуют вакцины).

Характеристика уровней биобезопасности

Уровень биобезопасности	Описание	Оснащение лабораторий	Микроорганизмы
Первый (наиболее низкий)	Биологические агенты, которые представляют минимальную опасность для персонала и окружающей среды	Специальное оснащение не требуется. Должны быть приспособления для мытья рук, легко обеззараживаемые рабочие поверхности, прочная мебель, окна с противомоскитными сетками, отсутствие автоматической вентиляции, личная защитная одежда (перчатки, халаты), автоматические дозаторы, защита глаз и лица, автоклавы, безопасные центрифуги	Agrobacterium radiobacter, Bacillus thuringiensis, Escherichia coli K12, Lactobacillus acidophilus, Micrococcus leuteus, Pseudomonas fluorescens, Serratia marcescens, Aspergillus niger
Второй	Биологические агенты, представляющие потенциальную опасность для персонала и окружающей среды. Часто вызывают серьёзные заболевания, эффективное лечение и профилактика которых доступны	Оснащение соответствует классу 1. Требуются строгие меры предосторожности во время проведения процедур, при которых могут создаваться инфекционный аэрозоль или брызги. Особые меры предосторожности применяют в отношении острых и режущих предметов	Bacillus subtilis, Borrelia burgdorferi, Clostridium difficile, Mycobacterium (не M. tuberculosis), Salmonella, Staphylococcus aureus (MRSA и VRSA), Streptococcus pneumoniae; вирусы: гепатитов А, В, С, иммунодефицита человека, гриппа А, кори, эпидемического паротита; прионы, генетически модифицированные организмы
Третий	Биологические агенты, которые могут вызывать серьёзные или потенциально летальные заболевания в результате ингаляционного заражения, в отношении которых существуют вакцины и способы лечения	Боксы безопасности 2-го класса	Bacillus anthracis, Coxiella burnetii, Mycobacterium tuberculosis, Rickettsia rickettsii, Salmonella typhi; вирусы: атипичной пневмонии (SARS), венесуэльского лошадиного энцефаломиелита, жёлтой лихорадки, лихорадки долины Рифт, лихорадки Западного Нила, лихорадки Пятнистых гор, натуральной оспы; Plasmodium falciparum, Trypanosoma cruzi

Уровень биобезопасности	Описание	Оснащение лабораторий	Микроорганизмы
Четвертый (наиболее высокий)	Опасные и экзотические агенты, вызывающие тяжёлые заболевания, в отношении которых не разработаны вакцины и способы лечения	Боксы безопасности 3-го класса или «костюмы космонавтов» с автономной системой подачи воздуха	Y. pestis; вирусы геморрагических лихорадок (крымской геморрагической лихорадки (вирус Конго), Ласса, лихорадки Денге, Марбург, Мачупо, Хунин, Эбола, Хантавирусы), вирус птичьего гриппа (H5N1)

Работа с материалом, содержащим микроорганизмы III–IV групп патогенности, регламентируется Санитарными правилами «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности и гельминтами», которые приняты к исполнению на территории Республики Беларусь Постановлением Главного государственного санитарного врача № 40 от 27.07.2000 г. Исследования проводятся в бактериологических лабораториях при лечебно-профилактических учреждениях и при центрах гигиены и эпидемиологии.

В зависимости от выполняемых исследований микробиологические лаборатории подразделяют на диагностические, производственные и научно-исследовательские. В соответствии с типами микроорганизмов, изучаемых в микробиологических лабораториях, выделяют бактериологические, вирусологические, микологические и протозоологические лаборатории.

В зависимости от уровня безопасности работы с микроорганизмами микробиологические лаборатории подразделяют на четыре группы риска:

- I группа — лаборатории особого режима (максимально изолированные) с высоким индивидуальным и общественным риском;
- II группа — режимные лаборатории (изолированные) с высоким индивидуальным и низким общественным риском;
- III группа — базовые (основные) лаборатории с умеренным индивидуальным и ограниченным общественным риском;
- IV группа — базовые (основные) лаборатории с низким индивидуальным и общественным риском.

На практических занятиях студенты работают с микроорганизмами IV группы патогенности. Учебный практикум кафедры микробиологии считается учебной микробиологической лабораторией, где **необходимо соблюдать следующие правила:**

1. В помещение бактериологической лаборатории нельзя входить без специальной одежды — медицинского халата и шапочки, запрещается приносить в практикум верхнюю одежду. Запрещается посещение студен-

тов, работающих в лаборатории, посторонними лицами. Каждый студент должен работать на закреплённом за ним рабочем месте. Во время работы в лаборатории следует соблюдать тишину, порядок и чистоту.

2. В помещении бактериологической лаборатории категорически **запрещается** принимать пищу, курить, использовать косметические средства. Ежедневная тщательная уборка помещения производится влажным путём с применением дезинфицирующих жидкостей.

3. В каждой группе назначается постоянный дежурный студент, который осуществляет контроль за поддержанием чистоты и порядка студентами группы на рабочих местах.

4. Всё необходимое для работы на занятии (чашки, пробирки, пипетки, бактериальные петли) студенты берут на специальном столе, туда же ставится выполненная на занятии работа. Пробирки и чашки с инфицированным материалом обязательно подписывают (характер материала, название культуры, дата, № группы, Ф.И.О. исследователя). После окончания работы рабочее место должно быть приведено в полный порядок.

5. Перед выполнением работ и после завершения необходимо вымыть руки с мылом. Весь материал, поступающий в лабораторию, должен рассматриваться как инфицированный.

Работа с биоматериалами проводится в резиновых перчатках. **Запрещается прикасаться к биоматериалу и микробным культурам руками.**

Если контакт с кровью или другими биологическими жидкостями произошел с нарушением целостности кожных покровов (укол, порез), пострадавший должен:

- снять перчатки рабочей поверхностью внутрь;
- выдавить кровь из раны;
- обработать повреждённое место (70%-ным спиртом, или 5%-ным йодом, или 3%-ным раствором перекиси водорода, или другим разрешенным антисептиком);
- руки вымыть под проточной водой с мылом;
- на рану наложить пластырь;
- надеть напальчник;
- при необходимости продолжить работу, надев новые перчатки.

При отсасывании жидкого материала необходимо пользоваться резиновыми грушами, при этом пипетки должны быть закрыты ватными тампонами. **Пипетирование ртом строго запрещено!**

6. Посевы проводят у спиртовки, **обязательно** фламбируя при этом края пробирок, петли, шпатели.

Запрещается оставлять без присмотра работающие спиртовки и держать вблизи них легковоспламеняющиеся материалы и вещества. Перед зажиганием спиртовки необходимо удостовериться, что её корпус исправен, фитиль выпущен на нужную высоту и распущен, а горловина и держа-

тель фитиля сухие. Фитиль должен плотно входить в направляющую трубку держателя (иначе возможна вспышка паров внутри спиртовки и взрыв). **Нельзя** переносить зажжённую спиртовку с места на место, **а также** зажигать одну спиртовку от другой. Гасить спиртовку нужно, накрывая пламя фитиля колпачком, если это невозможно — залить водой. Задувать пламя **запрещается**.

7. При работе с биоматериалами необходимо пользоваться инструментами (петлями, шпателями, пинцетами, иглами). Инструменты, имевшие контакт с инфицированным материалом, фламбируются в пламени спиртовки или полностью погружаются в емкости с дезраствором.

По окончании работы использованная стеклянная посуда и ватно-марлевые пробки сбрасывается в отдельные биксы. Ежедневно посуда, в которой содержался инфицированный материал, поступает в мойку после предварительного автоклавирования.

8. Окрашивание препаратов проводится в специально отведённых местах. Отработанные предметные стёкла помещаются в эксикатор.

9. Микроскоп — точный оптический прибор, требующий строгого соблюдения правил работы с ним. При микроскопии выполняют следующие действия:

- поднимают конденсор до уровня предметного столика;
- открывают диафрагму;
- регулируют яркость встроенного осветителя или освещают поле зрения при помощи зеркала (при малой освещенности используют вогнутое зеркало, при достаточной — плоское);
- на предметное стекло с окрашенным препаратом наносят каплю иммерсионного масла, в которую под визуальным контролем осторожно погружают объектив;
- поднимая тубус, смотрят в окуляр и вначале макро-, а потом микровинтом устанавливают чёткое изображение объекта;
- по окончании работы поднимают тубус, снимают препарат, марлевой салфеткой удаляют иммерсионное масло с фронтальной линзы объектива;
- микроскоп ставят в шкаф.

10. При повреждении лабораторной посуды, содержащей инфицированный материал, или проливания жидкого инфицированного материала надо сообщить преподавателю. Немедленно проводится дезинфекция контаминированных поверхностей и предметов:

- осколки стекла помещают в бикс;
- на место попадания инфицированного материала наносят дезраствор, время экспозиции 5–10 мин;
- затем дезраствор вытирают влагопоглощающей тканью.

Для антисептической обработки контаминированные части тела моют с мылом.

11. При работе с электрооборудованием и электроприборами запрещается проверять наличие напряжения пальцами, переносить включённые приборы, находящиеся под напряжением, пользоваться неисправным электрооборудованием и электропроводкой. При нарушении правил работы с электрооборудованием и электроприборами возможно поражение людей электрическим током и возникновение пожара.

12. В начале каждого семестра преподаватель проводит инструктаж по технике безопасности при работе с микробными культурами, биоматериалами, спиртовками и электроприборами. Инструктаж фиксируется в журнале личной подписью студента и заверяется подписью преподавателя.

ВНИМАНИЕ! С целью профилактики внутрибольничных инфекций *запрещается* посещение занятий на клинических базах в халате, в котором студент работал в микробиологической лаборатории!

Забор, хранение и транспортировка материала для микробиологического исследования

Вид исследуемого материала зависит от цели исследования. При микробиологической диагностике клинический материал забирается из организма больного и/или носителя, при проведении эпидемиологического анализа — дополнительно исследуются пробы из объектов внешней среды (воды, воздуха, почвы, продуктов питания, смывы с предметов, инвентаря).

Для качественного проведения лабораторной диагностики важное значение имеет правильное взятие материала, правильное приготовление мазков и производство посева. Посев от каждого больного должен сопровождаться одновременно приготовлением двух мазков из того же очага, откуда сделан посев. Качество окраски мазков в значительной степени зависит и от их приготовления: материал в мазках должен быть расположен равномерным, тонким слоем, но в то же время содержать достаточно материала для исследования.

Наибольшее количество возбудителя содержат **выделения, жидкости и ткани организма** (гной, мокрота, кровь, испражнения, рвотные массы, моча, содержимое полостей зева и носа, промывные воды бронхов и желудка, ликвор, выделения из половых органов, трупный материал). В каждом случае учитывают особенности предполагаемой инфекции, место максимальной локализации возбудителя и пути его выделения в окружающую среду. Материал для исследования берут, соблюдая правила асептики. Для повышения качества лабораторной диагностики необходимым условием является взятие материала до начала антимикробной терапии или после 1–2-суточного перерыва в ней. Игнорирование этого обстоятельства может обусловить отрицательные результаты исследования.

Гной, серозно-гнойный экссудат (внеклеточную жидкость, накапливающуюся в тканях или серозных полостях), **некротические массы** берут из закрытых очагов пункцией шприцем, из открытых — пипеткой, шприцем, сухим тампоном, ложечкой Фолькмана, желательнее из глубины патологического очага, после очистки от поверхностных масс. Гной лучше брать в пробирку с мясопептонным бульоном, можно просто в стерильную пробирку, в количестве 1 мл (при подозрении на анаэробную инфекцию желательнее взять 8–15 мл). Из гноя сразу же делается мазок и посев во избежание лизиса бактерий.

Слизь из зева и носа исследуют при подозрении на дифтерию, менингококковую инфекцию, ангину, коклюш или другие респираторные заболевания. Материал берут стерильным тампоном.

Мазок из зева берут натошак или не ранее чем через 2 часа после полоскания, питья или еды под визуальным контролем с использованием шпателя. Корень языка придавливают книзу и кпереди шпателем, находящимся в левой руке, а правой — осторожно вводят в ротовую полость тампон и, не касаясь последним слизистых оболочек рта, языка, зубов, снимают налёт. Лучше всего снять налёт или слизь на границе поражённого участка, где возбудителей больше и жизнеспособность их выше.

Перед взятием слизи из носа необходимо предложить больному высморкаться или очистить нос сухим ватным фитилем и удалить корки. Тампон вводят в каждую ноздрю, плотно прикасаясь всеми сторонами его к стенкам и перегородке носа. Полученный материал с тампона немедленно высевают на плотные питательные среды, а также наносят на предметное стекло, подсушивают и направляют в лабораторию.

Мокроту забирают на раннем этапе болезни, утром, натошак. Если мокроты выделяется мало, секрецию её можно усилить ингаляцией тёплого гипертонического или щелочного раствора, назначением бронхолитиков. Для снижения контаминации мокроты микрофлорой глотки и полости рта их многократно прополаскивают стерильной водой или физраствором. После этого больной откашливает мокроту в стерильную банку и сразу же закрывает её стерильной крышкой.

При поступлении мокроты на исследование особое внимание следует обратить на оценку качества доставленного образца. Критериями пригодности мокроты для бактериологического исследования является наличие более 25 сегментоядерных лейкоцитов и не более 10 эпителиальных клеток в поле зрения при просмотре, как минимум, 20 полей зрения мазка, окрашенного по Граму.

Промывные воды бронхов (бронхоальвеолярный лаваж) забирают (при отсутствии мокроты или параллельно с ней) специально или в сочетании с лечебными процедурами. Больной тщательно ополаскивает глотку

и полость рта стерильной водой или физраствором. Под контролем гортанного зеркала в дыхательные пути вводят 4 мл физраствора. Откашливаемое содержимое собирают в стерильные широкогорлые банки.

Кровь исследуют при отсутствии или неясности локальных очагов, исследование лучше проводить в начале или в разгаре болезни. При транзиторной бактериемии выявить возбудителя в крови с помощью бакпосева иногда не удаётся. Для повышения выявляемости возбудителя кровь следует брать во время озноба или на высоте лихорадки. Следует помнить, что озноб и лихорадка — наиболее частые явления, побуждающие к выделению гемокультуры, — обычно запаздывают на 30–90 мин по отношению к эпизоду бактериемии, поэтому исследование должно проводиться неоднократно.

Чтобы избежать влияния бактерицидных свойств крови, её необходимо разводить большим количеством среды, примерно в соотношении 1:10. Обычно берут 10 мл крови и засевают в 90 мл жидкой среды (сахарный, сывороточный или желчный бульон). Среда выбирается в зависимости от биологических особенностей возбудителя предполагаемой инфекции. Переливать кровь из шприца во флакон с питательной средой надо над пламенем спиртовки, предварительно сняв иглу. Посев отправляют в лабораторию, вечером и ночью его помещают в термостат. При отсутствии питательной среды кровь берут в стерильную пробирку с соблюдением тех же правил.

Сыворотка или плазма крови для серологического исследования берется натощак. Накануне взятия крови необходимо исключить физические нагрузки, приём алкоголя, жирной пищи и психологические стрессы. За час до взятия крови исключается курение. Во время взятия обследуемый должен находиться в положении сидя или лёжа.

Для серологического исследования достаточно 1 мл сыворотки (плазмы) или 2 мл крови.

Кровь берут в чистую, сухую, пластмассовую или стеклянную пробирку. При необходимости транспортировки отделяют сыворотку или плазму, которые тотчас замораживают. При постановке серологических реакций возможны повторные замораживания и оттаивания (дефростации) сывороток до 3 раз при хранении их при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. После размораживания сыворотку или плазму следует тщательно перемешать.

При работе с кровью следует строго соблюдать рекомендации по предотвращению заражения ВИЧ и парентеральными вирусными гепатитами !!!

Ликвор (8–10 мл) берут при спинномозговой пункции в две пробирки: для биохимического анализа и для бактериологического исследования при подозрении на менингит, нейросифилис.

Рвотные массы собирают в стерильные банки с притёртыми крышками и нейтрализуют 10%-ным раствором Na_2CO_3 .

Промывные воды желудка (20–50 мл) собираются в стерильную ёмкость после промывания желудка стерильным физраствором без добавления антисептиков (натрия гидрокарбоната, калия перманганата и др.).

Испражнения исследуют при подозрении на кишечные инфекции (брюшной тиф, паратифы А и В, дизентерию, сальмонеллёзы, эшерихиозы и др.). Испражнения (2–3 г) берут стерильным деревянным шпателем или стеклянной палочкой из судна, горшка или непосредственно из прямой кишки с помощью ватных тампонов, металлических петель или через трубку ректоскопа. Судно или горшок необходимо тщательно промыть горячей водой, чтобы не осталось следов дезинфектанта. Нужно стремиться взять слизь, гной, фибринные плёнки и избегать примесей крови в связи с её бактерицидным действием. Взятие материала из *rectum* не зависит от числа дефекаций и может быть проведено в любой момент. Больного просят лечь на бок с приведёнными к животу бёдрами и ладонями развести ягодицы. Петля или тампон осторожным движением вводится в задний проход на глубину 5–6 см и также осторожно вынимается. Лучше всего сразу же сделать посев материала на питательную среду. Если это невозможно, материал с петли или тампона смывают в пробирку со стерильным физраствором и отправляют в лабораторию.

Желчь (10–20 мл) забирают во время дуоденального зондирования. В отдельные пробирки собирают все три порции желчи (А, В и С). Конец зонда предварительно обрабатывают спиртом, затем после выделения 1–2 мл желчи (эту порцию для исследования не используют) наполняют пробирки непосредственно через зонд или с помощью стерильного шприца. При наличии кислой реакции (примеси желудочного сока), хлопьев, белесоватого оттенка жидкости материал считается непригодным.

Мочу (20–30 мл) собирают в стерильную, плотно закрывающуюся посуду при помощи стерильного катетера после предварительного обмывания половых органов с мылом и ополаскивания их стерильным физраствором.

У мужчин допустим сбор мочи при естественном мочеиспускании после туалета наружных половых органов. Для посева используется вторая порция мочи. Мочу, взятую при естественном мочеиспускании, засевают только на элективные среды.

Выделения из половых органов. У мужчин исследуют отделяемое уретры (выделения из мочеиспускательного канала и парауретральных ходов), а также центрифугат свежевыпущенной первой порции мочи.

Перед взятием материала из мочеиспускательного канала больной не должен мочиться в течение 4–5 ч для накопления в уретре достаточного количества отделяемого слизистой оболочки. Головку полового члена

в области наружного отверстия уретры протирают стерильным ватным тампоном, смоченным стерильным изотоническим раствором хлорида натрия. Так как в свободно стекающей капле из уретры возбудителей можно обнаружить не всегда, первые капли свободно стекающих выделений, появляющихся при надавливании на уретру, удаляют, а последующие наносят на предметные стекла и делают мазки или используют для посева на питательную среду. При скудных выделениях или при их отсутствии предварительно проводят массаж уретры, а затем — соскоб со слизистой её переднебоковых стенок с помощью ложки Фолькмана, тупой ушной ложки или желобоватого зонда, а для посева — с помощью бактериологической петли. Для этого дистальная часть полового члена берётся между третьим и четвёртым пальцами левой руки, указательным и большим той же руки раздвигаются губки наружного отверстия уретры. Тупая ложка или петля вводится в мочеиспускательный канал примерно на 3–4 см и лёгким покашливанием берётся соскоб. Материал из парауретральных ходов (при их поражении) получают при надавливании на них.

У женщин исследуют соскобы со стенок влагалища в области заднего свода, переднебоковых стенок уретры, отделяемое шейки матки (цервикального канала). Из парауретральных ходов и больших вестибулярных желез материал забирают по показаниям.

Перед взятием мазков область уретры и парауретральных ходов вытирают сухим стерильным тампоном. Затем уретру массируют пальцем со стороны влагалища, прижимая её к лобковой кости. Ложку Фолькмана, тупую ушную ложку или желобоватый зонд вводят вглубь уретры на 1,5–2 см, стараясь получить отделяемое лёгким покашливанием передней и боковых стенок уретры. Манипуляцию проводят осторожно, чтобы не поранить слизистую.

После того, как шейка матки открыта в зеркалах и протерта сухим ватным тампоном, отделяемое забирают длинным гинекологическим пинцетом, вводя его в цервикальный канал на глубину 1 см и захватывая отделяемое со стенок канала.

Если при надавливании на переднюю часть уретры появится отделяемое из парауретральных ходов, его собирают ложечкой Фолькмана и делают мазки. Секрет для изготовления мазков из большой вестибулярной железы осторожно выдавливают пальцами, один из которых введен во влагалище, а другой располагается снаружи на нижней трети большой половой губы.

Во второй половине беременности материал из цервикального канала берут без ввода пинцета в канал.

У девочек исследуют отделяемое слизистой оболочки уретры, влагалища и прямой кишки. Методика взятия материала та же, что и у женщин,

только материал из влагалища берут осторожно, без зеркал, ушной ложкой или желобоватым зондом через гименальное отверстие.

Значительно повышают выявляемость возбудителей урогенитальных инфекций повторные анализы, особенно с использованием провокаций, а также применение культурального метода в комплексе с другими методами исследования. Обследование женщин лучше проводить во время менструации, или за 2–3 дня до её начала, или через 2–3 дня после её окончания, так как менструация является физиологической провокацией и вероятность обнаружения возбудителей в этот период возрастает.

При хронических воспалительных процессах необходимо делать мазок-соскоб со слизистых мочеполового тракта (для исследования на хламидии, микоплазмы, уреаплазмы). Мазки, в которых обнаружены возбудители, должны сохраняться в лаборатории 3 месяца.

При показаниях (указание на ректальногенитальный или орогенитальный контакт) исследуют материал из прямой кишки, глотки и миндалин. Из анального канала прямой кишки материал для лабораторного исследования берут путём соскоба со слизистой оболочки и её складок с помощью тупой ложки Фолькмана. Можно использовать и метод промывных вод: через катетер с двойным током, введенный на глубину 4–6 см, нижний отдел прямой кишки промывают водой комнатной температуры или изотоническим раствором натрия хлорида (60–80 мл). Из воды вылавливают комочки гноя и слизи, которые затем наносят на одно предметное стекло и растирают другим либо производят посев.

Биоптаты тканей. Их исследование актуально при гранулематозном воспалении, связанном, например, с туберкулёзом или бластомикозом.

Трупный материал забирается при вскрытии, вид его определяется нозологической формой. Поверхность внутренних органов прижигают раскалённым пинцетом, затем вырезают кусочки органов 1–2 см³. Взятие и транспортировку материала при подозрении на ООИ (холера, чума и др.) производят по специальной инструкции.

Особенности взятия материала при подозрении на анаэробную инфекцию.

Этиологическую роль облигатных анаэробов предполагают при наличии следующих признаков:

1) неприятный запах отделяемого вследствие продукции анаэробами летучих жирных кислот (описывают как фекальный, для клостридий характерен запах прогорклого масла);

2) гнилостный характер поражения (мёртвые ткани в виде бесструктурного детрита серого или серо-зелёного цвета);

3) экссудат серо-зелёный или чёрный, содержит маленькие капельки жира;

4) наличие газа в тканях (синдром крепитации);

- 5) развитие инфекции на фоне лечения аминогликозидами;
- 6) близость очага к местам естественного обитания анаэробов.

При подозрении на анаэробную инфекцию следует учитывать, что неправильное взятие материала приведёт к искажению результата исследования. Материал лучше брать **до начала химиотерапии, во время вскрытия или дренирования очага**. Vegetативные формы анаэробов погибают при доступе кислорода, поэтому биологический материал берут в строго анаэробных условиях, **исключительно из пораженных инфекционным процессом зон**. Содержимое замкнутых полостей пунктируют стерильным шприцем и 3–5 мл материала вносят путём прокола резиновой пробки во флакон с бескислородной газовой смесью (80 % азота, 10 % водорода, 10 % углекислого газа) либо в специальную транспортную среду для анаэробов. При отсутствии транспортных флаконов материал забирают в большем количестве, например, гной берут в объёме 8–15 мл, немедленно доставляют в лабораторию и сразу же исследуют.

При подозрении на анаэробную бактериемию на высоте лихорадки берут 8–10 мл крови и, прокалывая резиновую пробку, вносят в 80–100 мл среды для анаэробов.

Неприемлемыми для анаэробного культивирования являются пробы, отобранные тампонами, собранные с поверхности кожи и слизистых, с поверхности ран, отхаркиваемая мокрота, моча, выделения из половых органов, желудочное и кишечное содержимое.

Для транспортировки исследуемого материала используют транспортные среды, предотвращающие токсическое действие кислорода (Amies, Cary&Blair, Stuart).

Организация проведения микробиологического исследования.

При проведении лабораторных исследований всегда следует стремиться к тому, чтобы материал в возможно более короткие сроки был доставлен в лабораторию и как можно раньше исследован. Промедление на любом из этапов снижает вероятность выделения возбудителей.

Организационно забор клинического материала для микробиологического исследования может производиться следующими **способами**:

1. *Оптимальным является взятие материала в лаборатории*, где предусмотрены помещения для регистрации больных и забора у них материала. Взятие материала производит специально обученный средний медицинский персонал.

2. *Забор материала в кабинете врача, принимающего больного*. В этом случае в кабинете необходимо иметь термостат, поддерживающий температуру 37 °С. Взятие материала и посев его на предварительно прогретую в термостате питательную среду производит лечащий врач, который затем все засеянные питательные среды помещает в термостат. Питательные среды с посевным материалом *выдерживают в термостате 24 ч*,

а затем доставляют в бактериологическую лабораторию для изучения и исследования, по возможности создав при этом термостатные условия, особенно в холодное время года. Данный способ приемлем.

3. Забор материала, посев его на питательную среду в кабинете лечащего врача и последующая доставка материала в лабораторию в ближайшие часы (не позже 6 ч с момента посева) в переносном термостате возможны, но не желательны.

4. Забор материала в кабинете лечащего врача в транспортную среду. Материал забирает врач, принимающий больного, специально подготовленным для этого стерильным тампоном, помещает последний в стерильную пробирку с транспортной средой, закрывает резиновым колпачком и помещает в холодильник при $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ для хранения до окончания взятия материала у больных, которым планировалось в этот день бактериологическое исследование. Затем посевной материал отправляют в бактериологическую лабораторию не позже 24 ч с момента забора материала. Данный способ можно применять при пересылке материала с отдаленных территорий.

При невозможности быстрой доставки материал должен храниться в холодильнике при $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ или на льду (за исключением материала, в котором предположительно содержатся менингококки или гонококки). Материал без консерванта можно хранить при температуре $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1–2 сут, консервированные в 50 % глицерине кусочки органов — несколько недель. Для более длительного хранения некоторых видов материала (сыворотка крови) его замораживают при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Так поступают при проведении серологической реакции ИФА в неразъемных планшетах, так как на одном планшете одновременно исследуются образцы сыворотки 30–45 пациентов.

Транспортировка материала производится в закрытой стеклянной посуде, помещенной в биксы. На каждом сосуде должна быть этикетка с указанием Ф.И.О. больного, даты забора материала. Обязательно наличие **сопроводительного документа (направления)**, в котором указывают:

- название учреждения, направившего материал;
- вид материала;
- цель исследования;
- Ф.И.О. больного;
- возраст больного;
- адрес — для амбулаторных больных, отделение и № палаты — для стационарных больных;
- номер амбулаторной карты (истории болезни);
- дата заболевания;
- дата взятия материала;
- предполагаемый клинический диагноз;
- фамилия врача, направившего материал.

В лаборатории поступивший материал регистрируется в специальном журнале, туда же записывается и результат исследования.

После исследования остатки материала подлежат уничтожению (автоклавному или сжиганию), а посуда и инструменты, бывшие в контакте с биоматериалом — обеззараживанию.

Микроскопический (бактериоскопический) метод исследования

Бактериоскопический метод исследования (БСМИ) — совокупность способов обнаружения и изучения морфологических и тинкториальных (способность окрашиваться) свойств микробов в исследуемом материале (лабораторная культура, патологический материал, пробы из внешней среды) с помощью микроскопии.

Цели БСМИ:

1. Установление этиологии заболевания.
2. Определение чистоты выделенной культуры.

Выделяют четыре этапа БСМИ:

Первый этап — забор, хранение и транспортировка материала.

Второй этап — приготовление микропрепаратов.

В лабораторной практике используют следующие типы микроскопических микропрепаратов:

I. Препараты, позволяющие изучать микроорганизмы в убитом состоянии. Наиболее часто используется *бактериологический мазок*.

Порядок приготовления бактериологического мазка:

1. В пламени горелки прокаливают (фламбируют) бактериальную петлю и верхнюю часть петледержателя (петлю держат в правой руке как писчее перо, левши — наоборот).

2. Пробирку с культурой берут большим и указательным пальцами левой руки. Пробку зажимают мизинцем правой руки и извлекают её из пробирки.

3. Край горлышка пробирки фламбируют в пламени горелки и почти одновременно ещё раз обжигают петлю.

4. Петлю быстро вводят внутрь пробирки, охлаждают и погружают в бульонную культуру или прикасаются к налёту на скошенном питательном агаре.

5. Петлю извлекают, быстро фламбируют край пробирки, пробирку закрывают и ставят в штатив. Петлю стерилизуют: в горизонтальном положении вносят в нижнюю, наиболее холодную часть пламени горелки, чтобы не произошло разбрызгивание сжигаемого патогенного материала. После того как он сгорит, петлю переводят в вертикальное положение,

накаливают докрасна вначале нижнюю, затем верхнюю часть проволоки и прожигают петледержатель. Прокаливание в целом занимает 5–7 сек.

6. Материал из жидкой питательной среды распределяют по площади диаметром примерно 1 см; материал из плотной питательной среды эмульгируют в капле физиологического раствора. Хорошо приготовленный мазок тонкий, быстро высыхает на воздухе. Мазок можно подсушить над пламенем спиртовки, контролируя температуру рукой.

7. Высушенный мазок фиксируют 3 раза, медленно проводя его в верхней части пламени спиртовки, мазком вверх (физический способ фиксации). При этом происходит денатурация белка бактерий, они закрепляются на предметном стекле, лучше воспринимают анилиновые красители и не смываются при окрашивании.

Мазки из жидкого материала (ликвор, моча) готовят аналогично мазку из жидкой питательной среды.

Мазки из вязкого материала (мокрота, гной) готовят, помещая каплю материала между двумя стёклами и разводя их в противоположных направлениях, получают два мазка.

Тонкий мазок крови: на предметное стекло, ближе к одному из его концов, наносят каплю крови. Шлифованное стекло (уже предметного) ставят на первое под углом 45° подводят к капле крови (3–4 мкл) до соприкосновения с ней. После того, как кровь растечётся по шлифованному краю, стеклом делают скользящее движение справа налево, равномерно распределяя кровь тонким слоем по поверхности стекла. Толщина мазка зависит от величины угла между стёклами: чем острее угол, тем тоньше мазок. После приготовления мазки сушат на воздухе и фиксируют химическим способом: погружением в метанол (5 мин) или этанол (10–15 мин) или смесь Никифорова (10–15 мин). Фиксация цитологического материала позволяет сохранить структуру клеточных элементов, поэтому её следует применять как можно раньше.

Правильно приготовленный мазок должен быть равномерно тонким, желтоватого цвета, достаточной величины, т. е. располагаться на 1–1,5 см от краёв, занимать $\frac{2}{3}$ длины стекла и заканчиваться «метёлочкой». Толстые, густо-розовые мазки не следует использовать, т. к. в них морфология клеток плохо различима.

Для получения качественных мазков крови следует учитывать следующие моменты:

а) предметные стёкла и стекла, которыми готовят мазки должны быть безупречно вымыты и обезжирены в смеси Никифорова;

б) кровь с антикоагулянтом может сохраняться при $+4^\circ\text{C}$ в течение 24 ч без существенных изменений числа и морфологии клеток. Тем не менее, гематологические исследования рекомендуется проводить как можно

раньше, так как патологические клетки часто менее устойчивы к хранению. При использовании антикоагулянта нужно помнить, что несоответствие концентрации антикоагулянта к объёму взятой крови, недостаточно тщательное смешивание могут привести к значительным ошибкам (неточному определению концентрации клеточных элементов, искажению морфологической структуры клеток).

Толстая капля крови: на середину предметного стекла пастеровской пипеткой наносят каплю крови или прикладывают предметное стекло непосредственно ко второй капле крови, выступающей из пальца (первую удаляют ватой). Нанесённую на стекло кровь бактериальной петлёй распределяют по площади диаметром примерно 1 см; стекло оставляют в горизонтальном положении до подсыхания; кровь в «толстой капле» распределяется неравномерно, образуя неровный край.

Препарат-отпечаток: вырезанный из середины органа небольшой кусочек ткани захватывают пинцетом и прикладывают поверхностью среза к предметному стеклу последовательно несколько раз.

Препарат-соскоб: поверхность органа с целью обеззараживания прижигают накалёнными браншами пинцета, делают по этому месту надрез и из глубины остроконечными ножницами вырезают небольшой кусочек ткани, который помещают между двумя предметными стёклами; далее поступают, как при приготовлении мазка из вязкого материала. Если ткань органа плотная, из глубины разреза делают скальпелем соскоб; полученный материал распределяют тонким слоем по поверхности стекла скальпелем или бактериальной петлёй.

Препарат для электронной микроскопии: исследуемый материал тончайшим слоем наносят на тонкую плёнку-подложку (вместо предметного стекла), незначительно поглощающую электроны; плёнка крепится на опорную сетку; препарат контрастируют с помощью электронно-плотных (задерживающих электроны) веществ.

II. Препараты, позволяющие изучать микроорганизмы в живом состоянии:

1. *Висячая капля:* на середину не обезжиренного покровного стекла помещают каплю бульонной микробной культуры. Каплю покрывают предметным стеклом с лункой, края которой предварительно смазывают вазелином. Предметное стекло с прилипшим к нему покровным переворачивают; капля оказывается висячей в герметически закрытой влажной камере, из которой жидкость испаряется очень медленно, поэтому препарат долгое время пригоден для наблюдения. Висячую каплю микроскопируют с плоским зеркалом и суженной диафрагмой. Найденный край капли устанавливают в центре поля зрения, переходят на увеличение $\times 40$ или иммерсионную систему, слегка расширив диафрагму.

2. *Придавленная капля* — препарат для микроскопии живых объектов (клеток культуры тканей, бактерий). Ее готовят путём помещения между предметным и покровным стёклами (толщина предметного стекла <1,2 мм, покровного — <0,2 мм) капли взвеси исследуемого материала, избегая образования пузырьков воздуха. На предметное стекло наносят каплю материала, покровное стекло ставят на ребро у края капли и опускают, постепенно вытесняя воздух, чтобы избежать образования в ней пузырьков воздуха. В правильно приготовленном препарате стёкла плотно склеиваются и жидкость тончайшим слоем заполняет пространство между ними, не выступая за края предметного стекла. Для лучшей видимости неокрашенных микроорганизмов используют темнопольную или фазово-контрастную микроскопию.

Методы окраски мазков бывают двух типов:

1. *Простые* — используется один краситель, чаще водный фуксин (время экспозиции 1–2 мин) или 1%-ный спиртово-водный раствор метиленовой синьки (время экспозиции 3–5 мин). Время экспозиции определяется толщиной мазка: чем он толще, тем время больше. По истечении времени экспозиции краситель сливают, препарат промывают водой, высушивают, микроскопируют.

2. *Сложные* — применяют 2–3 контрастных по цвету красителя, что позволяет различить микроорганизмы и выявить некоторые особенности их строения или дифференцировать клетки макроорганизма (табл. 2).

Таблица 2

Сложные методы окраски клеточных структур бактерий

Структура бактерий	Метод окраски	Вид препарата
Споры	По Ожешко	Споры — красные, вегетативные клетки — синие
Капсула	По Бурри–Гинсу	Бесцветная капсула вокруг красного микроба, фон окрашивается в цвет туши
Клеточная стенка	У некислотоустойчивых — по Граму	Грамположительные — фиолетовые, грамотрицательные — красные
	У кислотоустойчивых (микобактерий) — по Цилю–Нильсену	Кислотоустойчивые — красные, некислотоустойчивые — синие
Жгутики	По Морозову	Клетки — тёмно-коричневые, жгутики — светло-жёлтые
Нуклеоид	По Романовскому–Гимзе	Нуклеоид — фиолетовый, цитоплазма — бледно-розовая
Включения	По Нейссеру	Палочки — желтые, зерна волютина — синие

Сложный метод окраски *по Романовскому–Гимзе* используют для окрашивания простейших, спирохет, ядерных элементов.

Сухие мазки фиксируют в метиловом спирте (5 мин) или в смеси Никифорова (15 мин), погружают в рабочий раствор (разведение 1:4) краски Романовского–Гимзы (состоит из азура, эозина и метиленовой синьки) на 5–7 мин, промывают дистиллированной водой и высушивают. Каждая новая партия красителя требует отработки своего режима окраски, даже если они применяются для одного и того же биоматериала. Краситель можно использовать неоднократно, соблюдая условия хранения.

При окраске по Романовскому–Гимзе цитоплазма простейших голубая, ядра красные. Боррелии сине-фиолетовые, трепонемы и лептоспиры слабо-розовые.

Правильно окрашенный по Романовскому–Гимзе мазок крови имеет светло-розовую окраску; эритроциты — розовые; ядра лейкоцитов — фиолетово-красные с хорошо видимой структурой хроматина, хорошо выделяются ядрышки; цитоплазма нейтрофилов — светло-розовая; базофильная зернистость — синяя, эозинофильная — красная, нейтрофильная — сиреневая, зернистость моноцитов — нежная азурофильная.

Третий этап — микроскопия с оценкой формы, размеров, взаимного расположения микробов. Микроскоп (греч. *skopeo* — смотрю) — оптический прибор для получения увеличенных изображений объектов, не видимых невооружённым глазом. Различают световую (светлопольную, иммерсионную, темнопольную, фазово-контрастную, люминесцентную) и электронную микроскопию.

Светлопольная микроскопия — основной метод исследования клеток и тканей, в котором для освещения объекта используют лучи видимого спектра.

Световой микроскоп (рис. 1) имеет механическую и оптическую системы. К последней относятся объектив, окуляр, осветительное устройство. Объективы по способу использования и степени увеличения делятся на *сухие* — между объективом и рассматриваемым предметом находится воздух и *иммерсионные* (лат. *immersio* — погружение) — между объективом и рассматриваемым предметом находится жидкость.



Рис. 1. Устройство светового микроскопа

Светлопольная микроскопия предназначена для изучения окрашенных препаратов. Изображение создается за счёт различий в степени поглощения света разными участками исследуемого окрашенного объекта (рис. 2). При прохождении пучка света через окрашенный препарат происходит изменение интенсивности света, т. е. меняется амплитуда световой волны. Такие амплитудные изменения легко улавливаются человеческим глазом.

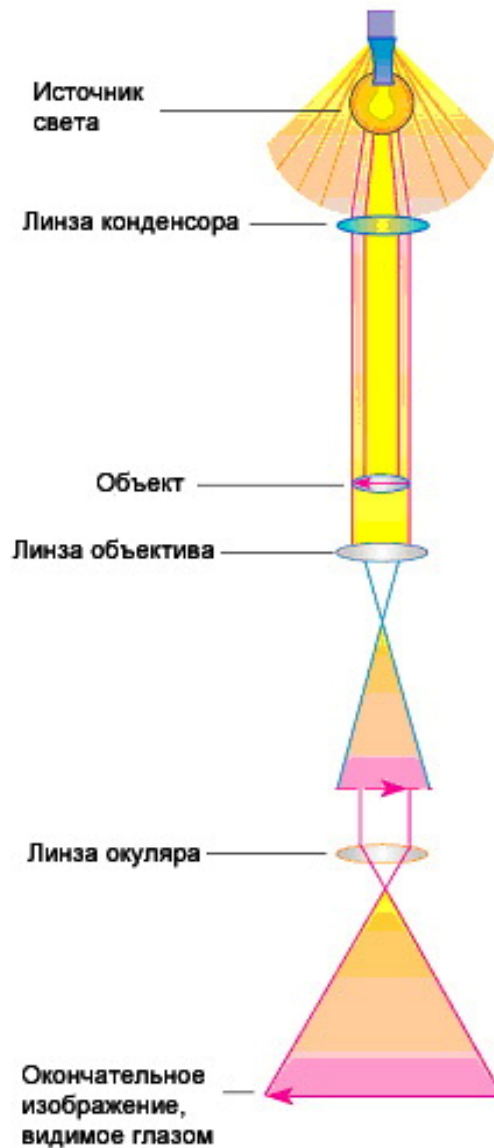


Рис. 2. Схема светового микроскопа для наблюдения в светлом поле зрения

Возможно применение светлопольной микроскопии и при наблюдении неокрашенных нативных препаратов, но лишь в том случае, если они рассеивают освещающий пучок настолько сильно, что значительная часть его не попадает в объектив.

При использовании сухого объектива с большим фокусными расстоянием световые лучи, идущие от зеркала через конденсор в объектив, проходят через неоднородные среды, различающиеся показателями преломления. Часть лучей отклоняется и не попадает в объектив. В результате поле зрения освещено недостаточно. Обычная световая микроскопия с сухим объективом, имеющим слабое увеличение, в микробиологии используется редко — для изучения микроорганизмов, имеющих крупные размеры (более 10 мкм).

Чтобы увеличить разрешающую способность микроскопа и исследовать более мелкие микроорганизмы, используют иммерсионную микроскопию. Иммерсионный объектив с фокусным расстоянием 1,5–3 мм (маркирован «ОИ» («ИО»)) или «МИ» («ИМ»), имеет кольцевую чёрную или белую черту) погружают в каплю масла (кедрового, персикового, при их отсутствии — вазелинового), показатель преломления которого близок к показателю преломления стекла.

Иммерсионное масло устраняет потери попадающих в объектив лучей света вследствие своего одинакового со стеклом коэффициента преломления (рис. 3). В этом случае падающий на препарат пучок света не рассеивается и, не меняя направления, попадает в иммерсионный объектив; разрешающая способность микроскопа увеличивается.

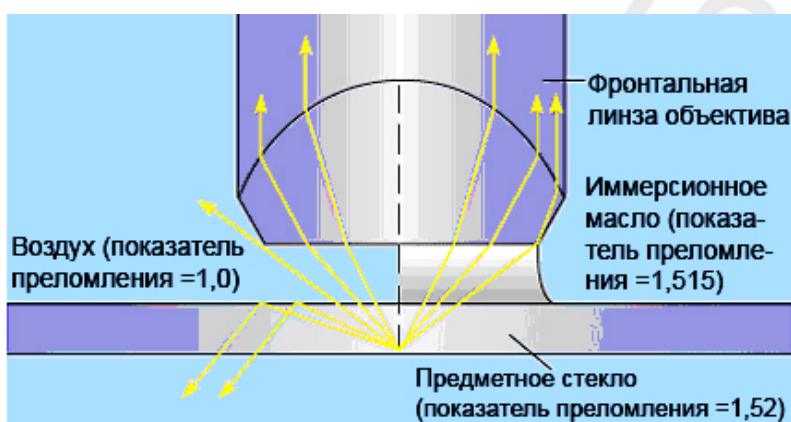


Рис. 3. Схема хода лучей в сухой и иммерсионной системах

Иногда вторую каплю иммерсионной жидкости помещают на верхнюю линзу конденсора. В редких случаях используют водную иммерсию, в этом случае устанавливают объектив «ВИ».

Увеличение микроскопа равно произведению увеличения объектива на увеличение окуляра. Сухие объективы могут иметь увеличение 8, 10, 20, 40, иммерсионные — 90, 100. Окуляры могут иметь увеличение 7, 10, 12, 15. Обычный световой микроскоп даёт увеличение в 100–400 раз, иммерсионный — в 1000 раз.

Качество микроскопа зависит не от степени увеличения, а от его разрешающей способности — минимального расстояния между двумя точками, которое ещё можно различить. Невооружённый человеческий глаз имеет разрешающую способность около 100 мкм. Разрешающая способность светового микроскопа ограничена длиной световых волн. В световых микроскопах с иммерсионной системой при использовании видимой части дневного света можно рассмотреть объекты около 0,2 мкм. Размеры микроорганизмов, имеющих клеточное строение, составляют 0,2–20 мкм (чаще 0,5–10 мкм), и они легко обнаруживаются в иммерсионном микроскопе.

Структуру препарата можно различить лишь тогда, когда разные его частицы по-разному поглощают или отражают свет либо отличаются одна от другой (или от окружающей среды) показателем преломления. Эти свойства обуславливают контрастность изображения — различие яркостей изображения и фона. Если это различие составляет менее 3–4 %, то его невозможно уловить.

Другие методы световой микроскопии выбираются в зависимости от характера и свойств изучаемых объектов.

Темнопольная микроскопия (ТПМ) — микроскопия с боковым освещением (ультрамикроскопия), позволяет обнаружить частицы размером в несколько миллимикрон, которые не видны в светлопольном микроскопе.

Принцип ТПМ. Микроскопия в тёмном поле зрения основана на явлении дифракции света при сильном боковом освещении взвешенных в жидкости мельчайших частиц (эффект Тиндаля).

Эффект тёмного поля создаётся с помощью специального темнопольного конденсора, имеющего боковую зеркальную поверхность или обычного конденсора, между линзами которого вкладывают кружок чёрной фотобумаги так, чтобы незначительная периферическая часть линзы оставалась свободной.

При выходе из темнопольного конденсора основная часть лучей света не попадает в объектив. Изображение в микроскопе формируется при помощи небольшой части лучей, рассеянных микрочастицами находящегося на предметном стекле препарата и прошедшими через объектив (рис. 4).



Рис. 4. Ход лучей в темнопольном микроскопе

При микроскопии препарата в тёмном поле зрения на верхнюю линзу конденсора наносят каплю масла, помещают препарат с предметным стек-

лом, на которое наносят каплю масла. Наносить масло на обе поверхности необходимо, чтобы при иммерсионной микроскопии проходящие лучи света не преломлялись. Можно использовать и сухую систему (объектив х40) и помещать каплю масла только на верхнюю линзу конденсора. Так как для бокового освещения необходим параллельный пучок света, применяется только плоское зеркало. Вместо масла можно использовать дистиллированную воду.

В темнопольном микроскопе в нативных препаратах изучают живые неокрашенные микроорганизмы, например, спирихеты (рис. 5).

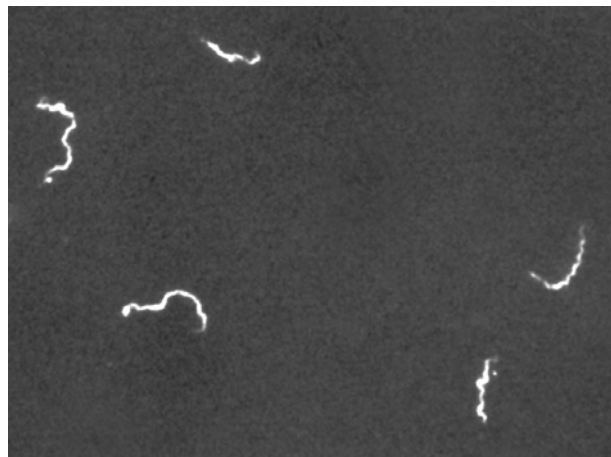


Рис. 5. *Treponema pallidum* в темнопольном микроскопе

Прямые лучи освещают объект не снизу, а сбоку и не попадают в глаза наблюдателя. В объектив попадают лучи, отражённые исследуемым объектом. Неосвещённое поле зрения остаётся совершенно тёмным, а микроорганизмы, отражающие лучи света, выглядят ярко светящимися.

Фазово-контрастная микроскопия (ФКМ) позволяет исследовать нативные препараты: бесцветные, прозрачные объекты, детали строения которых оптически мало различаются (живые клетки, срезы тканей, микоплазмы).

При ФКМ используют дополнительное фазово-контрастное устройство, состоящее из фазового объектива и фазового конденсора.

Фазовый объектив внутри имеет фазовую пластинку с нанесенным кольцом, которое изменяет фазу и уменьшает амплитуду световой волны. Середина кольца составляет $\frac{1}{2}$ – $\frac{2}{3}$ от диаметра выходного зрачка объектива, светопропускание кольца — 10–30 % в зависимости от типа фазового контраста.

Фазовый конденсор имеет кольцевую диафрагму с прозрачным световым кольцом. Размер светового кольца подбирается так, чтобы он соответствовал (или был чуть меньше) размеру фазового кольца объектива.

Изображение кольцевой диафрагмы совпадает с кольцом фазовой пластинки соответствующего объектива.

Принцип ФКМ. Человеческий глаз хорошо определяет изменения интенсивности света, наступающие при прохождении через окрашенные препараты, когда меняется амплитуда колебаний света. Распространение же световых волн в прозрачных однородных объектах не сопровождается потерей интенсивности света. Меняется только скорость прохождения света через объект по сравнению со скоростью его распространения в окружающей среде. Эти изменения называются фазовыми, так как при этом изменяется фаза колебаний прошедшего света. Фазовые колебания света глаз не воспринимает, а наблюдаемые объекты выглядят малоконтрастными, прозрачными.

Пучок света, проходя через кольцевую щель диафрагмы и объект, попадает в кольцо фазовой пластинки объектива. Лучи света отклоняются от фазовой пластинки (рис. 6). В результате между лучами, прошедшими через объект, и лучами светового фона возникает разность длины волны.

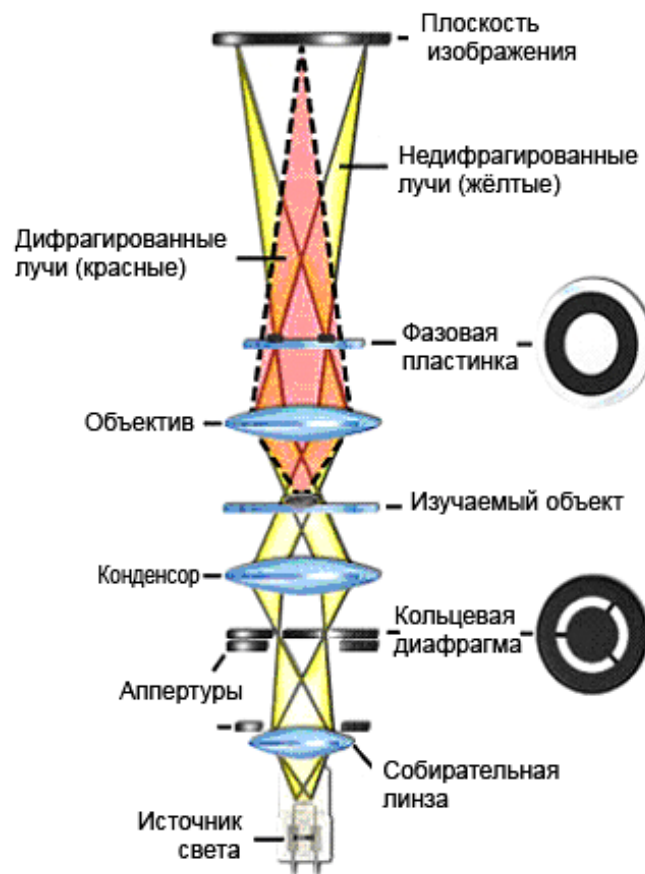


Рис. 6. Ход лучей в фазово-контрастном микроскопе

Таким образом, при использовании фазово-контрастного устройства невидимые фазовые изменения преобразуются в изменения амплитуды световой волны, т. е. в изменения интенсивности (яркости) света, которые различимы глазом.

Получаемое изображение называется фазово-контрастным.

В зависимости от способа получения фазовых колец различают 2 типа фазового контраста:

1. *Позитивный фазовый контраст* — фазовое кольцо в объективе технологически получается путем травления, что вносит «опережение» в прямо прошедший свет.

При этом изображение объекта с показателем преломления большим, чем у среды, получается темнее на более светлом фоне (рис. 7). Лучшие результаты наблюдаются при позитивном фазовом контрасте.



Рис. 7. Фазово-контрастная микроскопия *Bacillus cereus* (позитивный фазовый контраст)

2. *Негативный (аноптральный) фазовый контраст* — фазовое кольцо в объективе технологически получается путем нанесения на поверхность стекла тонкой пленки из копоти или меди, поглощающей не менее 10 % света. Это вносит «запаздывание» в прямо прошедший свет. При этом изображение объекта с показателем преломления большим, чем у среды, выглядит светлее окружающего темного фона. Аноптральная микроскопия позволяет достичь большей чёткости изображения малококонтрастных живых микроорганизмов.

ФКМ позволяет получить изображения малых прозрачных и бесцветных живых объектов (микроорганизмов, клеток).

Крупные прозрачные объекты рассеивают лучи света на небольшие углы, эти лучи проходят вместе с не отклонёнными через фазовое кольцо. Для крупных объектов фазово-контрастный эффект имеет место только вблизи их контуров, где происходит сильное рассеяние.

Люминесцентная микроскопия. Ее принцип основан на использовании явления люминесценции (флюоресценции, холодного свечения) — способности некоторых веществ флюоресцировать, т. е. на доли секунды поглощать падающие на них УФ или коротковолновые (сине-фиолетовые) лучи, а затем снова испускать свет. Испускаемый свет имеет длину волны, превышающую длину волны поглощаемого света на 20–50 нм, т. е. смещен по длине волны в сторону длинноволновой области спектра. Так, например, если поглощается синий свет, то испускается зеленый. Зеленый свет преоб-

разуется в желтый, желтый — в красно-оранжевый, а невидимое УФ-излучение — в видимый свет. Такое явление носит название «эффект Стокса».

Первичная (собственная) люминесценция наблюдается без предварительного окрашивания объекта. Вторичная (наведенная) возникает после окраски препаратов специальными люминесцирующими красителями — флюорохромами (*акридиновым оранжевым* — используют для обнаружения гонококков, *аурамином* — микобактерий, *корифосфином* — коринибактерий, *ФИТЦ* (флюоресцеина изотиоцианатом) — для метки антител).

Основной частью люминесцентного микроскопа является осветитель, имеющий лампу ультрафиолетового цвета, и систему фильтров (рис. 8).

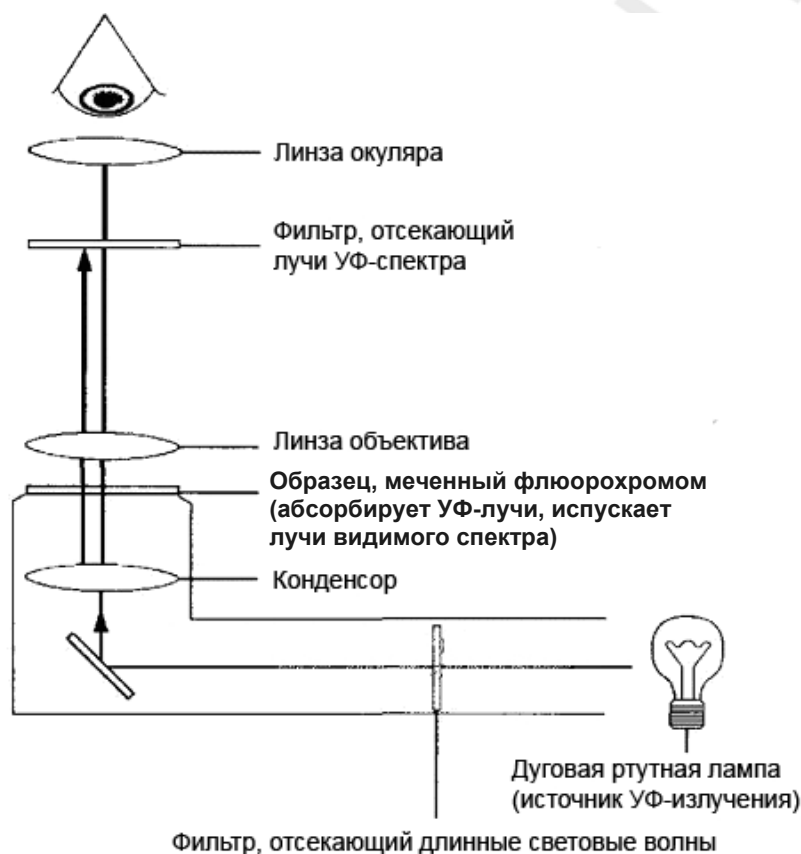


Рис. 8. Схематическое изображение люминесцентного микроскопа

Галогенные лампы непригодны в качестве источника света для люминесцентных исследований, так как металлическая нить накаливания преобразует большую часть потребленной электроэнергии в красный или невидимый инфракрасный свет. При этом лампа имеет непрерывный спектр излучения в широком спектральном диапазоне, непригодный для наблюдения слабосветящихся объектов.

Для работы в свете люминесценции необходим источник света с линейчатым спектром, интенсивным в коротковолновой части. Таким спектром излучения обладают ртутные лампы, работающие по принципу газового разряда. Лампы имеют специфичное светящееся тело. В кварцевую

колбу вплавлены два электрода. В зоне горения содержится небольшое количество ртути. За счет разрядов определенной мощности высокого напряжения между электродами возникает электрическая световая дуга, которая поддерживается в «горящем» состоянии.

Ртутная лампа излучает интенсивный свет, содержащий значительную долю УФ-излучения, которое необходимо для наблюдения в свете люминесценции.

В оптическую схему люминесцентного микроскопа вводят два светофильтра. Между зеркалом микроскопа и источником света устанавливают сине-фиолетовый светофильтр. Он пропускает от источника-осветителя только сине-зелёный свет, возбуждающий люминесценцию. Вещества-флюорохромы поглощают падающие на них коротковолновые лучи, переходят в возбуждённое состояние и приобретают иной цвет. Обратный переход в нормальное состояние происходит с испусканием света с большей длиной волны. Сине-зелёный свет мешает видеть возбуждаемое им свечение препарата, поэтому по пути к глазу наблюдателя отсекается жёлтым светофильтром.

Люминесцирующие объекты светятся ярким светом в тёмном поле зрения (рис. 9, 10). Сила их света чаще невелика, поэтому люминесцентную микроскопию проводят в затемнённом помещении.

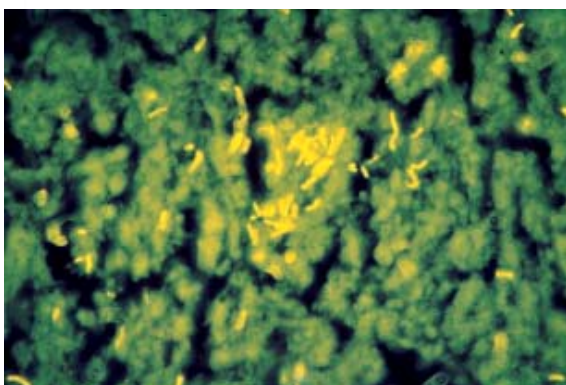


Рис. 9. *Mycobacterium tuberculosis* (желтые) в люминесцентном микроскопе

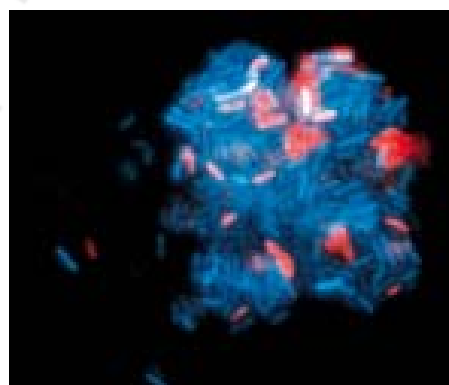


Рис. 10. *Escherichia coli* (синие — живые, красные — погибшие) в люминесцентном микроскопе

Преимущества люминесцентной микроскопии:

- цветное светящееся изображение микроорганизмов на чёрном фоне;
- обнаружение и установление локализации и концентрации живых и погибших микроорганизмов;
- возможность обнаружения микроорганизмов в исследуемом материале в небольших концентрациях вследствие высокой степени контрастности изображения;
- при использовании коротких УФ-лучей разрешающая способность люминесцентного микроскопа увеличивается до 0,1 мкм;

- экспресс-идентификация антигенов микроорганизмов в РИФ;
- возможность исследования прозрачных и непрозрачных объектов;
- возможность исследования жизненных процессов в динамике;
- использование люминесцентной микроскопии при цитологических и гистохимических исследованиях, так как флюорохромы могут распределяться в клетке диффузно либо избирательно окрашивать отдельные клеточные структуры или определенные химические соединения биологического объекта.

Возможности оптических микроскопов ограничены слишком большой длиной волны видимого света (6000 Å). Объекты, размеры которых меньше этой величины, находятся за пределами разрешающей способности светового микроскопа и могут быть обнаружены только при электронной микроскопии.

Электронная микроскопия (ЭМ) предполагает использование электронного микроскопа (рис. 11), в котором для освещения объектов вместо светового пучка используются электронные лучи (поток электронов) (табл. 3).



Рис. 11. Электронный микроскоп

Целые клетки из-за своей большой толщины непрозрачны для пучка электронов. Поэтому ЭМ требует специальной подготовки объектов исследования. Материал после фиксации обезвоживают, заливают в эпоксидные смолы, режут стеклянными или алмазными ножами на специаль-

ных ультратомах, позволяющих получать ультратонкие срезы толщиной 30–50 нм.

Биологические объекты состоят из веществ, построенных из лёгких элементов (С, N, O, H, P, S), поэтому их изображение в электронном микроскопе слабо контрастно и в клетках можно увидеть очень мало структурных деталей. Чтобы сделать изображение более контрастным, клетки обрабатывают электронными красителями — солями тяжёлых металлов (свинца, ртути, хрома, урана, вольфрама). Так как атомы тяжёлых металлов очень сильно рассеивают электроны, то структуры клетки, поглотившие эти металлы, будут выглядеть тёмными и контрастными. В качестве индикаторов для окислительно-восстановительных ферментов в ЭМ используют теллурид калия или соли тетразолия. Эти соединения, проникая в клетки, акцептируют электроны, которые они получают от дегидрогеназ. В результате реакции эти соединения восстанавливаются и выпадают в осадок, имеющий вид электронно-плотных (тёмных на экране микроскопа) зёрнышек, глыбок, слоёв.

Таблица 3

Сравнение электронного и светового микроскопов

Параметр	Электронный микроскоп	Световой микроскоп
Источник излучения	Электроны	Свет
Длина волны, нм	0,005	400–700
Максимальное полезное увеличение	x2500	x1500
Максимальное разрешение, нм	0,2	200
Линзы	Электромагниты	Стекланные
Объект	Неживой, обезвоженный, маленький или тонкий	Живой или неживой
Красители	Содержат цветные металлы, которые отражают электроны	Цветные

Принцип ЭМ. В качестве источника электронных лучей применяют электронную пушку, основой которой служит вольфрамовая нить, нагретая электрическим током (рис. 12). Электронные лучи обладают малой длиной волны. Прохождение электронных лучей в вакууме через электромагнитные поля, создаваемые электромагнитными линзами, концентрирует и направляет электронный поток. Это обеспечивает резкое повышение разрешающей способности электронного микроскопа до 0,2 нм и увеличение до 10^9 .

В *трансмиссионных (просвечивающих)* электронных микроскопах электроны проходят через образец, затем собираются и фокусируются электромагнитными линзами. Электроны невидимы для глаза, поэтому они направляются на флюоресцентный экран, который воспроизводит видимое

плоскостное изображение, или на фотоплёнку, чтобы получить постоянный снимок (электронную микрофотографию).

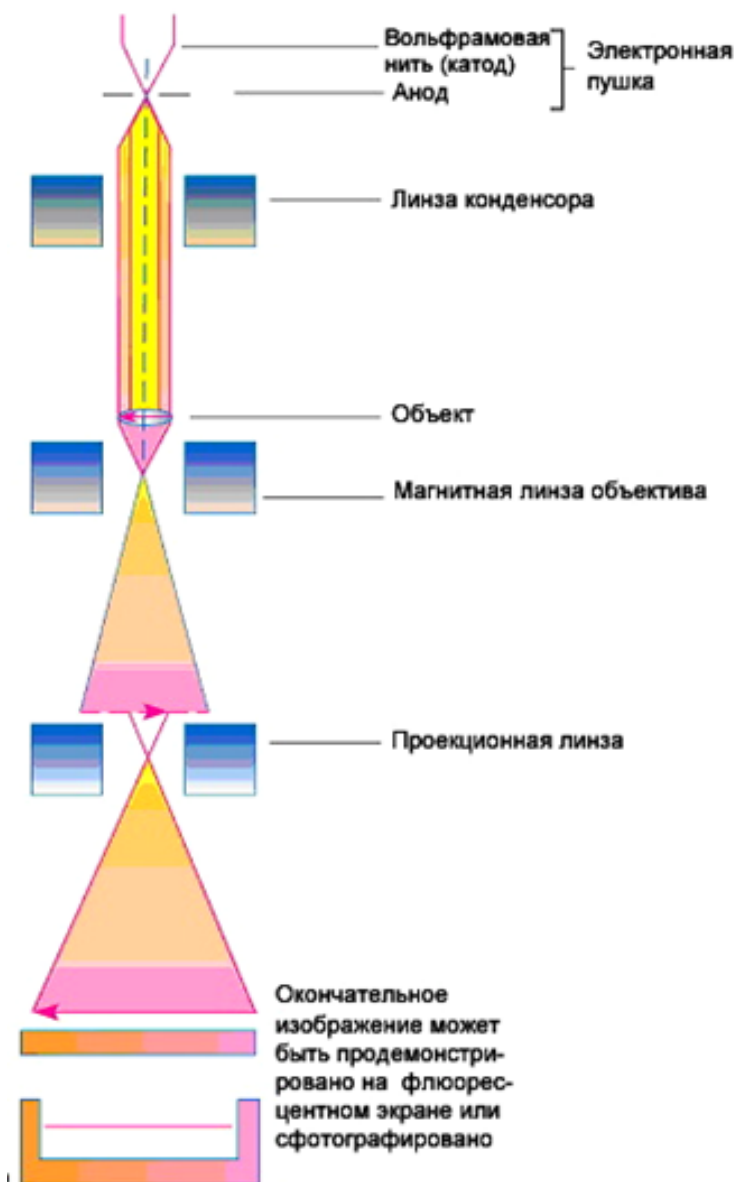


Рис. 12. Схема электронного микроскопа

Проходя через объект, части которого имеют различную толщину, электроны больше или меньше задерживаются, а объект приобретает контрастность. Создаёт изображение только та часть электронов, которая проходит через объект и попадает на экран микроскопа. Участки клеток, слабо рассеивающие электроны, выглядят на экране светлыми, а участки, сильно рассеивающие электроны, — тёмными (рис. 13).

В *сканирующих* электронных микроскопах пучок электронов фокусируется в тонком зонде и им сканируют образец, а отраженные от поверхности образца электроны собираются и формируют на экране объемное изображение (рис. 14–17). При сканирующей электронной микроскопии

изучают поверхность различных объектов, напыляя на них в вакуумной камере электронно-плотные вещества, и исследуют реплики, повторяющие контуры образца.

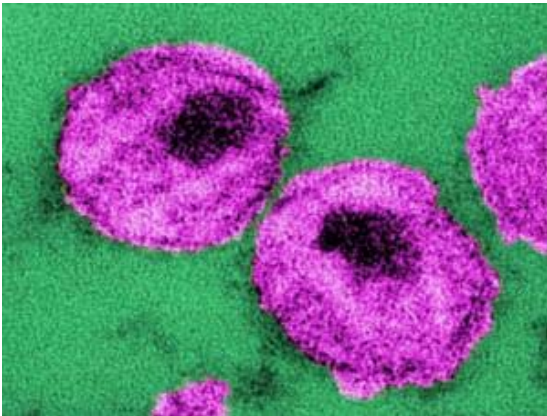


Рис. 13. ВИЧ в трансмиссионном электронном микроскопе

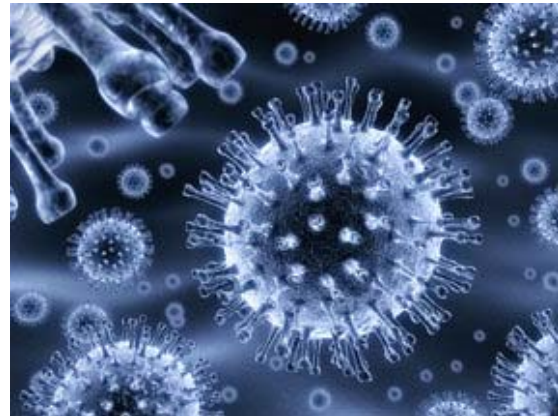


Рис. 14. ВИЧ в сканирующем электронном микроскопе



Рис. 15. *Trichomonas vaginalis* в сканирующем электронном микроскопе

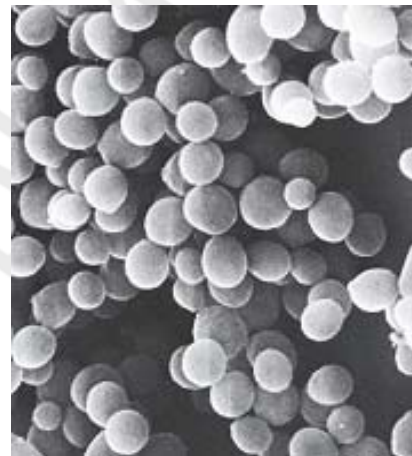


Рис. 16. *Staphylococcus aureus* в сканирующем электронном микроскопе

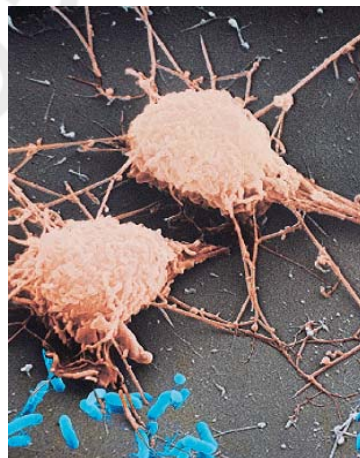


Рис. 17. Макрофаги и фагоцитируемые ими *Escherichia coli* в сканирующем электронном микроскопе

Преимущества электронной микроскопии:

- высокая разрешающая способность электронного микроскопа позволяет наблюдать объекты, размеры которых лежат за пределами разрешающей способности светового микроскопа. Поэтому ЭМ применяется для изучения ультраструктур микроорганизмов и макромолекулярных структур;
- сочетание ЭМ с другими методами позволяет проводить электронно-радиоавтографические, электронно-гистохимические, электронно-иммунологические исследования. ЭМ нашла широкое применение в морфологии, микробиологии, вирусологии, иммунологии, генетике, биохимии, онкологии.

Четвертый этап — заключение.

Этапы микроскопического метода исследования обобщены в табл. 4.

Таблица 4

Этапы микроскопического метода исследования

Этап	Содержание
Первый	Взятие, хранение и транспортировка материала
Второй	<i>Для изучения убитых микроорганизмов</i> — приготовление и окрашивание микропрепаратов: <ul style="list-style-type: none">– бактериологический мазок;– мазки из жидкого материала;– мазки из вязкого материала;– тонкий мазок крови;– толстая капля крови;– препарат-отпечаток;– препарат-соскоб;– препарат для ЭМ. <i>Для изучения живых микроорганизмов</i> — приготовление микропрепаратов: <ul style="list-style-type: none">– висячая капля;– придавленная капля
Третий	Микроскопия: <ul style="list-style-type: none">– световая (сухая или иммерсионная система);– темнопольная;– фазово-контрастная;– люминесцентная;– электронная
Четвертый	Заключение

Оценка БСМИ.

Достоинства:

- простой;
- доступный;
- быстрый;
- экономичный.

Недостатки:

- низкая чувствительность световых микроскопов (около 10^4 – 10^5 микроорганизмов в мл), поэтому информативность БСМИ невелика;

– низкая специфичность из-за схожести морфологии микроорганизмов разных видов, поэтому результаты его могут использоваться как ориентировочные при индикации высоких таксонов;

– обычно как самостоятельный метод БСМИ — поздний метод исследования, так как для накопления концентрации микроорганизмов, улавливаемой БСМИ, необходимо время; в то же время БСМИ используется на всех этапах БЛМИ для контроля чистоты выделяемой культуры.

Культивирование микроорганизмов на питательных средах

Облигатные внутриклеточные паразиты (хламидии, риккетсии, вирусы) культивируются исключительно *в клеточных системах*: на культурах клеток, в куриных эмбрионах, в организмах чувствительных лабораторных животных. Культивирование же **бактерий** (накопление микробной биомассы) осуществляется *на питательных средах*.

Питательная среда — субстрат для выращивания бактерий в лабораторных или производственных условиях.

Требования к питательным средам. В питательных средах создают необходимые условия для роста и размножения бактерий. Питательные среды должны:

– *содержать все элементы*, из которых строится бактериальная клетка, в такой форме, в которой микроорганизмы способны их усваивать; среды должны содержать источники С и N, минеральные соли, в ряде случаев ростовые факторы (аминокислоты, пурины, пиримидины, витамины);

– *быть влажными*, чтобы процесс диффузии питательных веществ в клетку проходил без затруднений;

– *быть прозрачными (жидкие среды)*, чтобы можно было визуально наблюдать за ростом микроорганизмов;

– *быть стерильными*, чтобы знать какому микробу принадлежат те или иные свойства;

– *быть изоосмотичными* (за счет 0,85 % NaCl);

– *иметь определённое значение рН и обладать буферными свойствами*.

Большинство патогенных бактерий, адаптированных к относительно стабильному микроокружению организма человека, растут преимущественно при близких к нейтральному значению рН 6,5–7,6. Холерный вибрион способен расти на средах с щелочным рН 8,0–9,0 (щелочная пептонная вода, щелочной агар), а грибы микромицеты растут на средах с кислым рН 4,0–6,0 (среда Сабуро). Сапрофиты адаптированы к росту в более широком диапазоне рН 2,0–9,0. Величина рН среды влияет на метаболизм бактерий,

воздействуя на растворимость питательных веществ. В процессе роста микроорганизмов величина рН среды может резко меняться, что требует поддержания определённого рН особенно для тех микроорганизмов, которые продуцируют кислоты, но не обладают к ним толерантностью (лактобациллы, энтеробактерии). Для этого в состав среды вводят либо несбраживаемые вещества (неорганические фосфаты, карбонат кальция или бикарбонат натрия), либо буферы (фосфатный, трис-солянокислый, цитратный и ацетатный).

Таблица 5

Классификации питательных сред

Классификационный признак	Виды сред
Происхождение	Естественные Искусственные (простые и сложные) Синтетические
Состав	Минимальные Полные
Консистенция	Жидкие Полужидкие Плотные Свёрнутые Сыпучие
Назначение	Общего назначения Элективные Дифференциально-диагностические Индикаторные Хромогенные
Цель использования	Транспортные Обогащения Для получения изолированных колоний Для накопления чистой культуры Для идентификации чистой культуры Консервирующие

Классификации питательных сред (табл. 5):

I. По происхождению:

1. *Естественные.* Их готовят из естественных продуктов животного и растительного происхождения (мяса, молока, яиц, отрубей, картофеля, моркови, пивного сусла, сенного отвара, сливового или морковного сока, кокосового молока, сыворотки крови). Эти среды не имеют постоянного состава, а потому не стандартны. В настоящее время их используют в качестве добавок к искусственным средам.

2. *Искусственные.* Они содержат в качестве источников аминного азота высокомолекулярные органические компоненты (пептон, триптон, мясной экстракт, казеин), которые получают из продуктов животного и растительного происхождения, очищают и дегидратируют. Эти среды

готовят из ингредиентов по определенной рецептуре, соответствующей ростовым потребностям культивируемых микроорганизмов. Состав их относительно постоянен, они стандартны, доступны и широко используются в диагностических лабораториях. Эта группа сред делится:

а) на *простые среды*, которые имеют достаточно простую рецептуру; в их состав входят источники аминного азота (пептон/триптон/мясной экстракт), а также соли, поддерживающие изотонические свойства и рН среды; предназначены для культивирования нетребовательных микроорганизмов. Примеры: мясная вода (МВ), пептонная вода, мясопептонный бульон (МПБ), мясопептонный агар (МПА).

б) *сложные среды*, которые получают путём добавления к простым питательным средам стимулирующих добавок: дрожжевого экстракта, сахаров, микроэлементов, витаминов, крови, сыворотки, гемина, пивного сусла и т. д. — которые усиливают ростовые свойства и позволяют культивировать определенные виды микроорганизмов, в том числе привередливые.

3. **Синтетические.** Они состоят из низкомолекулярных неорганических и органических соединений, в качестве источника аминного азота в эти среды входят аминокислоты. Синтетические среды имеют известный количественный и качественный состав ингредиентов: аминокислот, химически чистых аммонийных и азотнокислых солей, витаминов, микроэлементов и других факторов роста. Используют для культивирования микроорганизмов с целью получения вакцин и антибиотиков, изучения ростовых потребностей, а также для пассирования культур клеток.

II. По составу:

1. **Минимальные** — соответствуют минимальным потребностям микроорганизмов в питательных веществах. Минимальные среды используют в генетических исследованиях.

2. **Полные** — содержат все необходимое для роста бактерий.

III. По консистенции:

1. **Жидкие** (мясопептонный, сахарный, кровяной, желчный бульоны, пептонная вода, молоко).

2. **Полужидкие** — содержат 0,5 % агара (полужидкий агар).

3. **Плотные** — содержат уплотнители, придающие среде желеобразную консистенцию. В качестве уплотнителей могут использоваться:

– **агар** (по-малайски желе) — очищенный полисахарид из морских водорослей, который добавляют к жидким средам в концентрации 1–3 % (обычно 15–20 г/л). Плавится при температуре 100 °С, застывает — ниже +45 °С; разлагают его немногие бактерии;

– **желатин** — он разжижается многими микроорганизмами и имеет низкую температуру плавления (26–30 °С), поэтому редко используется в качестве уплотнителя;

– *силикагель* — используется в случаях, когда требуются плотные среды, не содержащие органических компонентов (для хемолитотрофов).

1. *Свёрнутые* — плотные среды, содержащие сыворотку крови или яичный белок, которые в процессе температурной коагуляции приобретают плотность.

2. *Сыпучие* — пшено, отруби и др., используют для длительного хранения микроорганизмов на поверхности среды.

IV. По назначению:

1. *Общего назначения, основные* (МПБ, МПА). На них растут многие нетребовательные микроорганизмы (псевдомонады, энтеробактерии, стафилококки).

2. *Элективные* (селективные, избирательные) содержат вещества, подавляющие рост сопутствующей микрофлоры и усиливающие рост определенных видов или родов микроорганизмов. В качестве селективных добавок используют антибиотики, антисептики (фурагин), анилиновые красители (феноловый красный, метиленовый синий, эозин, малахитовый зеленый), соли (теллурид калия, 4–9 % NaCl, селенит натрия), желчь. Примеры элективных сред: для стафилококков — желточно-солевой агар, для синегнойной палочки — фурагиновый агар.

3. *Дифференциально-диагностические* позволяют дифференцировать по внешнему виду колоний и биохимической активности одну группу микроорганизмов от другой при посеве биологического материала со смешанной микрофлорой. Содержат углеводы, индикаторы pH, селективные добавки. Примеры дифференциально-диагностических сред: для энтеробактерий — Эндо, Левина, Плоскирева, для клебсиелл — лактозобромтимоловый агар с пенициллином, для *Clostridium difficile* — фруктозо-цикloserин-цефокситиновый агар.

4. *Индикаторные*. В состав таких сред кроме индикатора pH (табл. 6) входят углеводы либо аминокислоты, при разложении которых изменяется pH и как следствие этого — цвет среды.

Таблица 6

Наиболее часто используемые индикаторы pH в питательных средах

Название индикатора	Окраска индикатора в зависимости от значения pH		
	щелочное	нейтральное	кислое
Андрее	бесцветный	бесцветный	красный
Бромтимоловый синий	бирюзовый	зеленый	желтый
ВР (водный голубой + розоловая кислота)	малиновый	бесцветный	синий
Феноловый красный	малиновый	красный	желтый

Изначально pH среды устанавливают $7,2 \pm 0,2$. Эти среды позволяют изучать биохимические свойства чистых культур микроорганизмов и не

обладают селективными свойствами. Примеры индикаторных сред: среды Гисса, Клиглера, Олькеницкого.

5. **Хромогенные** — новый тип диагностических сред, получающий в последнее время широкое распространение в ускоренной диагностике инфекционных заболеваний. На хромогенных средах по цвету колоний можно проводить предварительную идентификацию микроорганизмов (рис. 18).



Рис. 18. Хромогенная среда CHROMagar Orientation™

В состав таких сред, кроме ростовых и селективных компонентов, входит меченый хромогеном субстрат (субстраты). Колонии микроорганизмов, которые разлагают хромогенный субстрат, окрашиваются в определенный цвет. Разработаны хромогенные среды для выделения и предварительной идентификации листерий, сальмонелл, шигелл, эшерихий, кандид, устойчивых к метициллину стафилококков (MRSA) и др.

V. По цели использования в схеме бактериологической диагностики инфекционных заболеваний:

1. **Транспортные.** Их используют на этапах доставки биологического материала в бактериологическую лабораторию; состав этих сред такой, что бактерии сохраняют жизнеспособность, но не размножаются в них, поэтому количественный и качественный состав микрофлоры не изменяется.

2. **Среды обогащения** — жидкие среды, которые подавляют сопутствующие возбудителю микроорганизмы (щелочная пептонная вода для холерного вибриона, среды с желчью для энтеробактерий) и стимулируют рост возбудителя.

3. **Среды для получения изолированных колоний.**

4. **Среды для накопления чистой культуры.**

5. **Среды для идентификации микроорганизмов.**

6. Консервирующие — для длительного хранения микроорганизмов в условиях морозильной камеры. Эти среды содержат криопротекторы (10%-ный глицерин), защищающие мембраны в процессе замораживания; необходимы для создания коллекций микроорганизмов.

Приготовление питательных сред. Большинство сред, используемых в бактериологии, представляют собой высушенные концентраты в заводской фасовке, которые взвешивают, растворяют в дистиллированной воде, стерилизуют и разливают в лабораторную посуду. Этапы приготовления таких сред следующие:

1. Взвешивают навеску сухой концентрированной среды в соответствии с инструкцией по применению.

2. Растворяют навеску в соответствующем объеме дистиллированной воды.

3. Доводят до кипения при постоянном перемешивании и кипятят 1 мин до полного растворения компонентов. Доводят рН среды до требуемой величины (обычно $7,2 \pm 0,2$).

4. Разливают среду в подготовленную посуду, закрывают ватно-марлевыми пробками, стерилизуют в автоклаве при $+121\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 15 мин. Среды с углеводами стерилизуют при $+115\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 15 мин.

5. После охлаждения среды до $45\text{--}50\text{ }^{\circ}\text{C}$ добавляют при необходимости селективные и/или стимулирующие добавки: 5 % крови, 5 % сыворотки, антибиотики, гемин, витамины и др., тщательно перемешивают.

6. Разливают среду в стерильные чашки Петри по 20 мл на чашку (чтобы глубина агарового слоя составляла не менее 4 мм), равномерно распределяют, оставляют до застывания. Используют стерильные одноразовые пластиковые чашки Петри или стеклянные, многоразового использования, предварительно простерилизованные.

7. После застывания среды её подсушивают от конденсата в термостате в течение 30 мин. Для этого на полку термостата кладут лист фильтровальной бумаги и помещают чашку так, чтобы крышка служила опорой для края её дна, перевернутого средой вниз.

8. При необходимости чашки Петри с готовой средой можно хранить в запаянном полиэтиленовом пакете при $+2\text{...}+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 7–10 суток; перед посевом среды подсушивают в термостате до исчезновения конденсата на внутренней поверхности крышки.

Рост бактерий в жидких питательных средах. При росте бактерий в жидких питательных средах могут наблюдаться:

1) **равномерное помутнение среды**, типичное для большинства факультативно-анаэробных бактерий; при этом степень помутнения может быть слабой, умеренной или сильной;

2) *придонное или пристеночное помутнение среды*, специфичное для стрептококков и облигатно анаэробных бактерий, осадок может быть плотным, рыхлым, слизистым или хлопьевидным;

3) *плёнка на поверхности среды*, характерная для аэробов, может быть тонкой, плотной, рыхлой, гладкой, складчатой. Рост в виде пленки характерен, например, для *Yersinia pestis* (от пленки вниз спускаются нити «сталактиты») и *Vibrio cholera* (нежная пленка).

Рост бактерий на плотных питательных средах. На плотной питательной среде из одной микробной клетки вырастает скопление микроорганизмов — колония. Морфотипы колоний, вырастающих на средах, зависят от видовой принадлежности микроорганизма и позволяют идентифицировать и дифференцировать микроорганизмы.

На плотных питательных средах колонии микроорганизмов могут отличаться размерами, формой, краем, поверхностью, прозрачностью, структурой и консистенцией, профилем, цветом и запахом (табл. 7, рис. 19).

Таблица 7

Признаки колоний микроорганизмов

Признаки колоний			
размер (диаметр, мм)	форма	край	поверхность
Точечные — до 1 Мелкие — 1–2 Средние — 2–4 Крупные — >4	Правильная (круглая) Неправильная (волонистая, ризоидная, веретеновидная)	Ровный Волнистый Зубчатый Лопастной Складчатый	Матовая Блестящая Складчатая Морщинистая
прозрачность	консистенция (определяют, прикасаясь к колонии бакпетлём)	профиль	цвет
Непрозрачные (стафилококки, бациллы) Полупрозрачные (энтеробактерии, бактероиды) Прозрачные как «капельки росы» (гонококки, вибрионы)	Вязкая, тянущаяся Сухая, плотная	Плоский Высокий Выпуклый Подушечкообразный Кратерообразный Конусовидный Пуповидный	Бесцветная Окрашенная

Способность бактерий образовывать на питательных средах **окрашенные колонии** определяется одним из двух факторов:

1. *Цветом пигмента, продуцируемого микроорганизмами.* По химическому строению различают каротиноидные, меланиновые и другие пигменты, которые могут быть красного, оранжевого, жёлтого, коричневого, чёрного, синего или зелёного цвета. Пигментообразование детерминируется генетически. Пигменты обычно находятся в ЦПМ и защищают микробные клетки от эффектов фотоокисления, поэтому пигментообразование больше характерно для воздушной микрофлоры и служит фактором защи-

ты от УФ. Чаще пигменты нерастворимы в питательных средах и окрашивают только колонии. Некоторые пигменты растворимы в воде (например, пиоцианин у псевдомонад) и потому диффундируют в среду, окрашивая её.

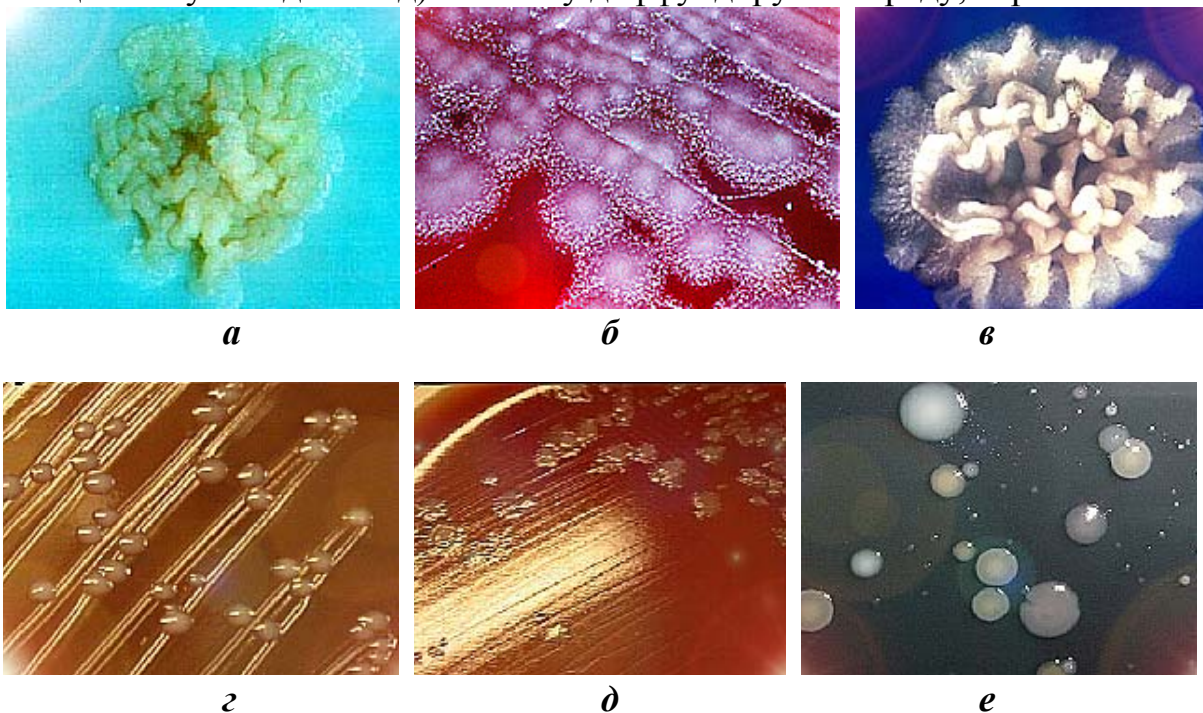


Рис. 19. Колонии микроорганизмов:

a — микобактерий; *б* — бацилл сибирской язвы; *в* — нокардий; *г* — бактероидов; *д* — клостридий; *е* — бордетелл коклюша

Примеры микроорганизмов, продуцирующих пигменты:

- *Staphylococcus aureus* — оранжево-желтый каротиноидный пигмент;
- *Pseudomonas aeruginosa* — сине-зеленый пигмент пиоцианин (при нейтральной реакции — синий, при щелочной — зелёный);
- *Prevotella melaninogenica*, *Peptostreptococcus niger* — коричнево-черный пигмент.

2. Составом среды, на которой культивируют микроорганизмы.

В состав селективных или дифференциально-диагностических сред могут входить:

– индикатор pH, цвет которого меняется при разложении углеводов в составе среды;

– красители, которые могут избирательно накапливаться в колониях ферментирующих углеводы микроорганизмов. Например, *Escherichia coli* разлагают лактозу и образуют на среде Эндо колонии малиново-красного цвета, а на среде Левина — фиолетового, колонии *Salmonella* spp. и *Shigella* spp., не разлагающие лактозу, на этих средах бесцветны или слабо-розовые.

– соли двухвалентных металлов, которые окрашивают колонии сероводородпродуцирующих микроорганизмов в серый или черный цвет

(черные или серые колонии образуют сальмонеллы на висмут-сульфитном агаре, коринебактерий дифтерии — на телуритовом агаре).

Несмотря на множество признаков, которыми различаются колонии, большинство микроорганизмов образуют на средах один из четырех морфотипов колоний:

– **гладкие, или S-колонии** (от англ. smooth — гладкий), имеют ровные края, гладкую поверхность; они выпуклые, блестящие. S-формы микроорганизмов более вирулентны (исключая *Y. pestis*, *B. anthracis*). Такой вид колоний обусловлен присутствием в составе наружных оболочек микроорганизмов гидрофильных полисахаридов;

– **шероховатые, или R-колонии** (от англ. rough — шероховатый), имеют неровный край, исчерченную поверхность, они плоские, не блестят. R-формы микроорганизмов часто авирулентны. Такой вид колоний связан с гидрофобностью наружных оболочек бактерий из-за отсутствия в них гидрофильных полисахаридов;

– **слизистые, или мукоидные, или M-колонии** (от англ. mucous — слизистый), — у клебсиелл, имеющих выраженную полисахаридную макрокапсулу;

– **карликовые, или D-колонии**, — у микоплазм и L-форм; видны только под малым увеличением микроскопа.

Под действием ряда факторов может происходить переход бактерий из S- в R-формы, называемый **диссоциацией**. Явление диссоциации у патогенных микробов наблюдается:

- а) под действием химиопрепаратов;
- б) под действием факторов иммунитета;
- в) при попадании микроба во внешнюю среду.

При обилии в засеваемом материале микробов они растут в виде плёнки, покрывающей всю поверхность плотной питательной среды. Такой характер микробного роста получил название газонного. Посев газоном производят, когда нужно получить большие количества чистой микробной культуры (например, при определении чувствительности её к антибиотикам).

Управляемое культивирование микроорганизмов. Промышленное использование микроорганизмов требует получения значительного количества микробного продукта (биомассы микроорганизмов, продуцируемых ими антибиотиков, токсинов и др.). Для этого используют методы *управляемого культивирования микроорганизмов*. Управляемое культивирование проводят в специальном оборудовании — *биореакторах*, которые позволяют создавать благоприятные и равномерные условия для роста и размножения микроорганизмов, что повышает накопление их биомассы и метаболитов, сокращает время культивирования. Управляемое культивирование может быть *периодическим* или *непрерывным*, *аэробным* или *анаэробным*.

эробным, поверхностным или глубинным (во всей толще жидкой питательной среды), *защищенным* (асептическим) или *незащищенным*.

Периодическое культивирование микроорганизмов — выращивание микроорганизмов в стационарных условиях (в питательной среде без непрерывного поступления нутриентов извне). В таких условиях по мере роста микроорганизмов происходит снижение количества белковых и углеводных субстратов, снижение окислительно-восстановительного потенциала и рН, что приводит к гибели культуры. Для периодического культивирования используют специальное оборудование — ферментеры, в которых осуществляют постоянное перемешивание и аэрацию (барботаж) среды. Периодически ферментер опорожняют, производят выделение и очистку продукта, после чего начинают новый цикл. Существует несколько вариантов периодического культивирования:

– *продлённое периодическое культивирование*, или культивирование с дробным дозированием субстрата, — подпитывают культуру, периодически добавляя питательные вещества;

– *многоциклическое культивирование* — часть культуры предыдущего цикла переносят в новую среду;

– *отъемно-доливное культивирование* — в середине экспоненциальной фазы роста отбирают половину культуральной жидкости, а вместо неё вносят свежую питательную среду.

Непрерывное культивирование микроорганизмов — выращивание микроорганизмов в динамических условиях (в постоянно обновляемой питательной среде). Проводят в специальных биореакторах — хемостатах или турбистатах, которые снабжены устройствами для поддержания температуры и рН на постоянном уровне, а также для автоматической подачи свежей питательной среды и удаления культуральной жидкости с продуктами метаболизма. Микробная популяция тем самым поддерживается необходимое время в логарифмической фазе роста. Управление скоростью поступления питательных веществ в проточных биореакторах осуществляется двумя способами: *турбистатным* и *хемостатным*.

В *турбистате* управление культивированием проводят путем измерения мутности выходящего потока с использованием фотоэлектрического элемента. Скорость разбавления свежей средой устанавливают в зависимости от требуемой плотности выходящей из турбистата культуры.

В *хемостатах* управление культивированием проводят путем лимитирования концентрации одного из ростовых факторов в поступающей в хемостат среде (например, концентрацию глюкозы, фосфора, серы), тем самым изменяют плотность микробных клеток в единице объема среды.

Методы выделения чистых культур аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов

I. Методы механического разобщения бактерий.

1. *Посев материала на чашки Петри бактериальной петлёй, шпателем, пипеткой*, последовательно на несколько сред, не прокаливая инструмент (по Дригальскому). При таком посеве материал, находящийся на петле, расходуется постепенно, и по линиям сетки, нанесённым в конце посева, вырастают изолированные колонии бактерий.

2. *Посев пластинчатыми разводками* (метод рассева в глубине среды по Коху) применяют, если в исследуемом материале содержится много бактерий. Готовят десятикратные разведения материала в пробирках, затем выливают содержимое пробирок в стерильные чашки Петри, заливают 20 мл расплавленного и остуженного до 45 °С МПА, перемешивают, дают агару застыть и инкубируют чашки в термостате.

3. *Разобщение на основе подвижности бактерий*. Материал засевают в каплю конденсационной жидкости скошенного МПА. При этом подвижные бактерии как бы «мигрируют» вверх по агаровому скосу и вырастают в виде колоний, расположенных в верхней части скошенного агара. При 2–3-кратном пассировании этих колоний в конденсационную жидкость скошенного агара удается получить чистую культуру подвижной бактерии (например, протей).

4. *Разобщение на основе размеров микроорганизмов* используют для получения чистых культур вирусов и микоплазм. Для этого смесь микроорганизмов фильтруют через микро- и миллипористые фильтры. Чистые культуры микроорганизмов получают в фильтрах.

II. Метод заражения чувствительных лабораторных животных (биологический) основан на избирательной чувствительности животных к микроорганизмам различных видов. Это выражается в быстрой скорости размножения определенного вида микроорганизмов при попадании в кровь и внутренние органы животного, откуда их затем выделяют. При этом другие виды микробов погибают под действием защитных факторов организма животного. Так выделяют, например, чистую культуру пневмококков из организма белой мыши, чистую культуру палочки туляремии из организма морской свинки.

III. Методы, основанные на избирательной чувствительности микроорганизмов к воздействию внешних факторов (предварительно или во время культивирования):

1) *физических:*

– *высокой температуры*: спорообразующие бактерии родов *Clostridium* и *Bacillus* выживают при нагревании смеси микробов, а неспорообразующие — гибнут;

– *низкой температуры*: при пониженных температурах культивируют *Y. enterocolitica*, *Y. pestis*, *L. monocytogenes*;

2) *химических*:

– *кислот*: при обработке кислотой смесей кислотоустойчивых и некислотоустойчивых бактерий последние гибнут, а первые (возбудители туберкулёза) остаются в чистой культуре; использование среды Сабуро (рН 5–6) для выделения грибов;

– *щелочей*: использование щелочной пептонной воды для выделения *V. cholerae*; использование метода гомогенизации мокроты с 10 % NaOH при выделении *M. tuberculosis*;

– *солей*: на селективных средах растут определённые виды бактерий (например, стафилококк растёт на ЖСА, содержащем 10–15 % NaCl);

– *антибиотиков*: основан на избирательной чувствительности определённых видов бактерий к отдельным антибиотикам. При посеве смеси бактерий на среду с добавлением антибиотика, вырастают нечувствительные к нему бактерии: выделение микоплазм на средах с пенициллином, выделение анаэробов на средах с аминогликозидами;

– *красителей*: красители добавляют к питательным средам для подавления роста сопутствующей флоры: при выделении энтеробактерий в среду Левина добавляют метиленовый синий и эозин для подавления грамположительных бактерий, при выделении микобактерий в среду Левенштейна–Йенсена добавляют малахитовый зелёный;

– *специфических ингибиторов*: среда с теллуридом калия используется для выделения *C. diphtheriae*, среда с селенитом натрия используется для выделения *Salmonella*, среды с желчью используются для выделения энтеробактерий и бактериоидов.

Методы выделения чистых культур облигатно-анаэробных микроорганизмов

Микробиологические исследования анаэробных микроорганизмов отличаются от выделения других типов микроорганизмов, так как облигатно анаэробные микроорганизмы погибают при содержании O₂ в атмосфере более 0,1 %. Несоблюдение правил культивирования анаэробных микроорганизмов может привести к получению неправильного ответа («гниль стерилена») или к потере анаэробов в процессе культивирования. Впервые облигатные анаэробы *Clostridium butyricum* выделил Л. Пастер в конце XIX в. С тех пор для выделения анаэробных микроорганизмов использовали разнообразные методы. Но из-за их нестандартности, плохой воспроизводимости многие из традиционных методов в современной бактериологии не применяются, уступив место более совершенным и стандартным методам.

Особенности выделения и культивирования анаэробов:

1. Анаэробы **культивируют на специальных питательных средах**, которые должны удовлетворять следующим требованиям:

а) *соответствовать сложным пищевым потребностям анаэробов* и обеспечивать их быстрый рост, поэтому для культивирования анаэробов используют высокопитательные среды, содержащие пептоны (1,5–2 %), дрожжевой экстракт (0,5 %), витамин К, гемин;

б) *содержать, при необходимости, стимулирующие добавки*: бараньи эритроциты (5 %), лошадиную сыворотку (5–10 %), твин-80 (0,02 %); пируват натрия (0,9 %); глюкозу (0,5 %); L-аргинин (0,1 %);

в) *иметь низкий окислительно-восстановительный потенциал*, что достигается путем добавления редуцирующих веществ. Редуцирующий агент, связывая свободный кислород среды, снижает E_h среды. В качестве нетоксичных редуцирующих агентов, обеспечивающих восстановительные условия среды, используют цистеина гидрохлорид (0,025 %), тиогликолят натрия (0,05 %), дитиотрейтол (0,05 %). В некоторые среды (Китта–Тароцци) добавляют кусочки тканей паренхиматозных органов (легкие, печень);

д) *содержать селективные добавки*, что обеспечивает избирательное выделение облигатно анаэробных микроорганизмов. В качестве селективных добавок используют антибиотики аминокликозидного ряда, к которым анаэробы природно устойчивы.

Для выделения облигатно анаэробных микроорганизмов используют следующие среды:

- *анаэробный кровяной агар с гентамицином*;
- *анаэробный кровяной агар с неомицином и налидиксовой кислотой*;
- *анаэробный кровяной агар с канамицином и ванкомицином*;
- *фруктозо-циклосерин-цефокситиновую среду* (для *Clostridium difficile*);

- *тиогликолевую полужидкую среду*;
- *среду Китта–Тароцци* (жидкая среда с кусочками мяса и вазелиновым маслом на поверхности);

- *среду Вильсона–Блера* (железо-сульфитный агар). *Clostridium spp.* растут в глубине столбика этой среды, давая колонии чёрного цвета за счёт восстановления сернокислого натрия в сульфат натрия, который, соединяясь с хлорным железом, образует чёрный осадок сернистого железа.

2. Посевы облигатно анаэробных микроорганизмов **культивируют в атмосфере с содержанием кислорода не более 0,1 %**. Бескислородные условия для культивирования анаэробов создают с использованием анаэробных камер, микроанаэроостатов либо анаэробных пакетов.

Анаэробная камера (рис. 20) представляет собой герметичный прозрачный бокс, перчаточный или бесперчаточный. Анаэробные условия в

нем достигаются созданием вакуума с последующим заполнением пространства камеры трехкомпонентным (N_2 (85–90 %) + CO_2 (5–10 %) + H_2 (5%)) или двухкомпонентным (N_2 + H_2) анаэробным газом. Устройство оснащено шлюзом для подачи из агрессивной кислородсодержащей среды во внутреннее пространство камеры образцов и расходных материалов. В камере также есть термостат, устройство для поддержания и контроля влажности, палладиевый катализатор для удаления остаточных количеств кислорода, прибор контроля концентрации кислорода. Анаэробная камера — дорогостоящее оборудование, им оснащаются преимущественно диагностические центры республиканского значения, референс-центры. Обеспечивает наивысшее качество анаэробного культивирования. Отличается вместительностью (50–200 чашек Петри), все диагностические исследования выполняются в бескислородной атмосфере.

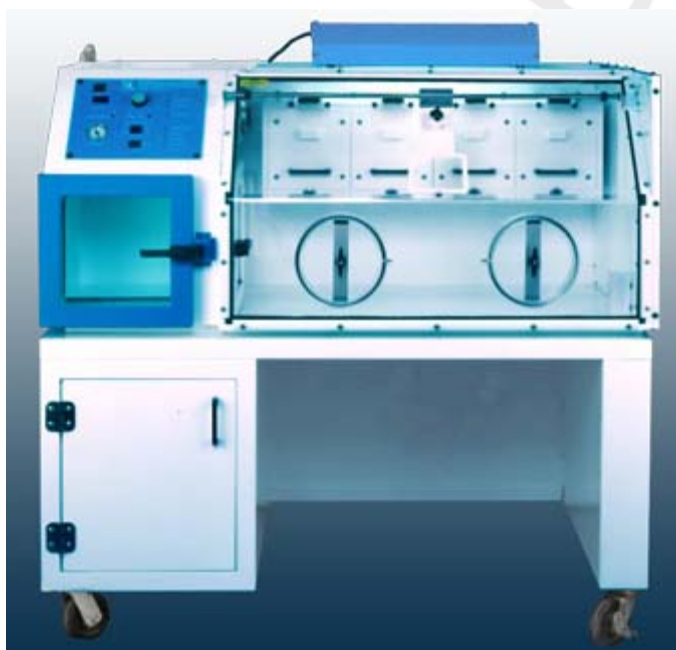


Рис. 20. Анаэробная камера

Микроанаэростат (рис. 21) представляет собой цилиндрическую, герметично закрываемую металлическую или пластмассовую емкость объемом 2,5 (3–7) литров, используемую для инкубации посевов в анаэробных условиях.

Бескислородные условия в микроанаэростате создаются одним из двух способов:

1) вакуумзамещением — создают вакуум и заполняют анаэробным газом;

2) химическим связыванием кислорода. Для химического связывания кислорода используют газогенерирующие системы, которые после добавления воды генерируют H_2 и CO_2 . H_2 связывает в присутствии палладиевого катализатора свободный кислород с образованием воды.

Генерируемый CO_2 необходим для стимуляции роста анаэробов, являющихся капнофилами. В последнее время используют системы, связывающие кислород за счет окисления соединений железа. Создание бескислородных условий в микроанаэростатах контролируется индикаторной тест-полоской, импрегнированной метиленовой синью, которая обесцвечивается в случае образования бескислородной атмосферы.



Рис. 21. Микроанаэростаты

Вместимость микроанаэростатов составляет 10–12 чашек Петри. Все исследования проводят в кислородсодержащей атмосфере, а затем загружают посе́вы в микроанаэростат, что снижает качество диагностических процедур по сравнению с анаэробной камерой. Кроме того, отсутствует возможность неограниченного наблюдения за посевами в процессе инкубации. Микроанаэростаты используют в малых лабораториях, они позволяют получить удовлетворительные результаты.

Анаэробный пакет представляет собой прозрачный, герметично закрываемый пластиковый пакет, рассчитанный на 1–2 чашки Петри. Анаэробные условия в нем создаются химическим связыванием кислорода с безводной реакционной системой. Создание бескислородных условий также контролируется индикаторной тест-полоской, обесцвечивающейся в бескислородной атмосфере. Анаэробные пакеты удобны для транспортировки материала, культур анаэробов, в экстренных случаях, в полевых условиях, а также в лаборатории при малой диагностической нагрузке. Прозрачность полиэтиленовых мешков позволяет легко проводить периодический контроль роста микроорганизмов. Анаэробные пакеты позволяют получить удовлетворительные результаты.

Исторические методы выделения анаэробов, некогда применявшиеся в практике анаэробной диагностики:

Метод Вейнберга. Готовили последовательные разведения материала в изотоническом растворе и высевали их в пробирки с расплавленным и остуженным до 40–45 °С

сахарным агаром или средой Вильсона–Блера. Клостридии росли в виде черных колоний в толще среды.

Метод Виньяля–Вейона. Исследуемым материалом, разведенным в расплавленной и остуженной до 40–45 °С среде Вильсона–Блера, заполняли капилляры пастеровских пипеток, концы которых запаивали и помещали в стеклянный цилиндр с ватой на дне. Через 2–3 сут в столбике агара вырастали колонии анаэробов, которые легко изолировали, надломав капилляр выше уровня намеченной колонии. Изолированные колонии извлекали петлёй, пересевали, изучали свойства с целью идентификации.

Химический способ культивирования анаэробов в эксикаторах (метод Аристовского). Посевы исследуемого материала в чашках Петри помещали в эксикатор — стеклянную емкость с притертыми краями крышки. На дно эксикатора вносили химический поглотитель кислорода: гипосульфит натрия или пирогаллол и углекислый натрий.

Биологический способ культивирования анаэробов (метод Фортнера), или метод совместного культивирования анаэробов и аэробов на плотных питательных средах в запаянных чашках Петри. На поверхность среды в чашках Петри (5%-ный кровяной агар с 1–2 % глюкозы), разделенной на две половины желобком, высевали на одной половине культуру активно поглощающих кислород аэробов (*S. marcescens* или *E. coli*), на другой половине — исследуемый материал. Чашки запаивали воском или заклеивали лейкопластырем. Аэробные бактерии быстро использовали кислород в герметически закрытой чашке, что создавало условия для роста анаэробов. Метод позволял выделять некоторые *Clostridium* spp.

Культуральный (бактериологический) метод исследования

Бактериологический метод исследования (БЛМИ) — метод, основанный на выделении чистых культур бактерий с помощью культивирования на питательных средах и их идентификации до вида на основании изучения морфологических, культуральных, биохимических, генетических, серологических, биологических, экологических характеристик микроорганизмов.

Бактериологическую диагностику инфекций проводят, используя стандартные диагностические схемы, утвержденные Министерством здравоохранения.

Чистая культура — бактерии одного вида, выращенные на питательной среде, свойства которых находятся в процессе изучения.

Штамм — идентифицированная чистая культура микроорганизмов одного вида, выделенная из определенного источника в определенное время. Штаммы одного вида могут несущественно отличаться биохимическими, генетическими, серологическими, биологическими и др. свойствами, а также местом и временем выделения.

Цели БЛМИ:

1. Постановка этиологического диагноза: выделение чистой культуры микроорганизмов и её идентификация.
2. Определение дополнительных свойств, например, чувствительности микроорганизма к антибиотикам и бактериофагам.

3. Определение количества микроорганизмов (важно в диагностике инфекций, вызываемых УПМ).

4. Типирование микроорганизмов, т. е. определение внутривидовых различий на основании изучения *генетических* и *эпидемиологических* (фаговаров и сероваров) *маркёров*. Используется в эпидемиологических целях, т. к. позволяет установить общность микроорганизмов, выделяемых от разных больных и из разных объектов внешней среды, в различных стационарах, географических регионах.

БЛМИ включает несколько этапов, различных для аэробов, факультативных и облигатных анаэробов.

Этапы БЛМИ при выделении чистой культуры аэробов и факультативных анаэробов.

Первый этап. Включает в себя следующее:

1. **Забор, транспортировку, хранение, предварительную обработку материала.** Иногда до посева проводят селективную обработку материала с учетом свойств выделяемого микроорганизма. Например, перед исследованием мокроты или другого материала на присутствие кислотоустойчивых микобактерий туберкулеза, материал обрабатывают растворами кислот или щелочей.

2. **Посев в среду обогащения** (при необходимости). Его проводят, если в исследуемом материале содержится малое количество бактерий, например, при выделении гемокультуры. Для этого кровь, взятую на высоте лихорадки в большом объёме (8–10 мл у взрослых, 4–5 мл у детей) засевают в среду в соотношении 1:10 (для преодоления действия бактерицидных факторов крови); посев инкубируют при температуре 37 °С 18–24 ч.

3. **Микроскопию исследуемого материала.** Из исследуемого материала готовят мазок, окрашивают его по Граму или другим методом и микроскопируют. Оценивают присутствующую микрофлору, ее количество. В ходе дальнейших исследований должны быть выделены микроорганизмы, присутствовавшие в первичном мазке.

4. **Посев на питательные среды с целью получения изолированных колоний.** Производят посев материала петлёй или шпателем методом механического разобщения на чашку с дифференциально-диагностической или селективной средой с целью получения изолированных колоний. После посева чашку переворачивают дном кверху (чтобы избежать размазывания колоний каплями конденсационной жидкости), подписывают и помещают в термостат при температуре 37 °С на 18–24 ч.

Следует помнить, что при посевах и пересевах микробных культур внимание работающего должно быть обращено на соблюдение правил асептики для предупреждения контаминации питательных сред и предупреждения заражения окружающих и самозаражения!

В случае инфекций, вызываемых условно-патогенными микроорганизмами, где имеет значение количество присутствующих микроорганизмов в патологическом материале, делают количественный посев материала, для чего предварительного готовят ряд 100-кратных разведений материала (обычно 3 разведения) в стерильном изотоническом растворе хлорида натрия в пробирках. После чего по 50 мкл каждого разведения высевают на питательные среды в чашках Петри.

Второй этап:

1. *Изучение морфотипов колоний на средах, их микроскопия.* Просматривают чашки и отмечают оптимальную питательную среду, скорость и характер роста микроорганизмов. Для изучения выбирают *изолированные колонии, расположенные по ходу штриха, ближе к центру*. Если вырастает несколько типов колоний — каждый исследуется в отдельности. Оценивают признаки колоний (см. табл. 7). При необходимости чашки с посевами просматривают через лупу или с помощью микроскопа с объективом малого увеличения и суженной диафрагмой. Изучают тинкториальные свойства отличающихся морфотипов колоний, для этого из части исследуемой колонии готовят *мазок*, окрашивают по Граму или другими методами, микроскопируют и определяют морфологию и чистоту культуры. При необходимости ставят *ориентировочную РА на стекле* с поливалентными сыворотками.

2. *Накопление чистой культуры.* Для накопления чистой культуры изолированные колонии всех морфотипов пересевают в отдельные пробирки со скошенным агаром или какой-либо другой питательной средой и инкубируют в термостате при +37 °С (такая температура оптимальна для большинства микроорганизмов, но может быть и другой, например, для *Campylobacterium spp.* — +42 °С, *Candida spp.* и *Yersinia pestis* — +25 °С).

В качестве среды накопления для энтеробактерий обычно используют среду Клиглера.

Состав среды Клиглера: МПА, 0,1 % глюкозы, 1 % лактозы, реактив на сероводород (сернокислое железо + тиосульфат натрия + сульфит натрия), индикатор феноловый красный. Изначальный цвет среды малиново-красный, среда «скошена» в пробирках: имеет столбик ($\frac{2}{3}$) и скошенную поверхность ($\frac{1}{3}$).

Посев в среду Клиглера производится штрихом по поверхности и уколом в столбик.

Третий этап:

1. *Учет роста на среде накопления, оценка чистоты культуры* в мазке по Граму. Отмечают *характер роста* выделенной чистой культуры. Визуально чистая культура характеризуется однородным ростом. При *микроскопическом исследовании* окрашенного мазка, приготовленного из такой культуры, в нём в разных полях зрения обнаруживаются морфологически и

тинкториально однородные клетки. Однако в случае выраженного плеоморфизма, присущего некоторым видам бактерий, в мазках из чистой культуры могут встречаться одновременно клетки с различной морфологией.

Если в качестве среды накопления использовали индикаторную среду Клиглера, то оценивают изменения ее цвета в столбике и скошенной части, по которым определяют биохимические свойства: ферментацию глюкозы, лактозы и продукцию сероводорода. При разложении лактозы желтеет скошенная часть среды, при разложении глюкозы — желтеет столбик. При образовании CO_2 в процессе разложения сахаров образуются газовые пузырьки или разрыв столбика. В случае продукции сероводорода отмечается почернение по ходу укола из-за превращения сульфата железа в сульфид железа.

Характер изменения цвета среды Клиглера (рис. 22) объясняется неодинаковой интенсивностью расщепления микроорганизмами азотистых веществ и образования щелочных продуктов в аэробных (на скошенной поверхности) и анаэробных (в столбике) условиях.

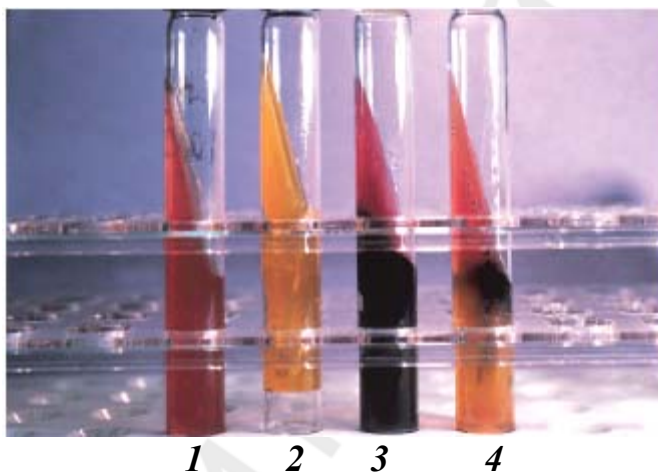


Рис. 22. Индикаторная среда Клиглера:

1 — исходная; 2 — с ростом *E. coli*; 3 — с ростом *S. paratyphi B*; 4 — с ростом *S. typhi*

В аэробных условиях на скошенной поверхности происходит более интенсивное щелочеобразование, чем в столбике среды. Поэтому при разложении глюкозы, присутствующей в среде в небольшом количестве, образующаяся на скошенной поверхности кислота быстро нейтрализуется. В то же время при разложении лактозы, присутствующей в среде в высокой концентрации, щелочные продукты не способны нейтрализовать кислоту.

В анаэробных условиях в столбике щелочные продукты образуются в ничтожном количестве, поэтому здесь выявляется ферментация глюкозы.

E. coli разлагают глюкозу и лактозу с газообразованием, не продуцируют сероводород. Они вызывают пожелтение столбика и скошенной части с разрывами среды.

S. paratyphi разлагают глюкозу с газообразованием, лактозоотрицательны. Они вызывают пожелтение столбика с разрывами, скошенная

часть не изменяет цвет и остается малиновой. При этом *S. paratyphi B* продуцируют сероводород (по ходу укола появляется черная окраска), *S. paratyphi A* сероводород не продуцируют.

S. typhi разлагают глюкозу без газообразования, лактозоотрицательны, продуцируют сероводород. Они вызывают пожелтение столбика без разрывов, скошенная часть не изменяет цвет и остается малиновой, по ходу укола появляется черная окраска.

Shigella spp. глюкозопозитивны, лактозоотрицательны, не продуцируют сероводород. Они вызывают пожелтение столбика (с разрывами или без них в зависимости от серовара), скошенная часть не изменяет цвет и остается малиновой.

2. Окончательная идентификация чистой культуры (определение систематического положения выделенного микроорганизма до уровня вида или варианта) **и определение спектра чувствительности выделенной культуры к антибиотикам.**

Для идентификации чистой культуры на этом этапе изучают биохимические, генетические, серологические и биологические признаки (табл. 8).

Таблица 8

**Признаки, учитываемые при идентификации микроорганизмов
(критерии вида)**

Признаки	Характеристика признаков
Морфологические	Размеры Форма Взаимное расположение Тинкториальные свойства: окраска по Граму или другими дифференциально-диагностическими методами
Культуральные	Рост на плотных (вид колоний) и в жидких средах
Биохимические	Выявление ферментов: – протеаз (разлагающих белки); – карбогидраз (разлагающих углеводы); – липаз (разлагающих липиды); – оксидоредуктаз (оксидазы, каталазы, дегидраз); – ферментов-токсенов (гемолизин, плазмокоагулазы, лецитиназы, гиалуронидазы, ДНК-азы); – экзотоксенов (дифтерийного и др.); – профиля летучих жирных кислот (для анаэробов)
Генетические	Содержание Г+Ц (%) в ДНК Последовательность нуклеотидов в ДНК и РНК
Серологические	Изучение антигенной структуры микроба и определение его серовара в РА на стекле с моновалентными сыворотками или в реакции латекс-агглютинации
Биологические	Вирулентность для животных Токсигенность Чувствительность к бактериофагам (определение фаговара) Чувствительность к антибиотикам
Экологические	Естественное место обитания

В рутинной лабораторной практике при идентификации нет необходимости изучать все свойства. Используют информативные, доступные, простые тесты, достаточные для определения видовой (вариантной) принадлежности выделенного микроорганизма.

Четвертый этап:

1. **Учет и анализ результатов.** Учитывают результаты изучения биохимических, серологических, генетических и др. характеристик и сравнивают их со свойствами эталонных (типовых) штаммов различных видов микроорганизмов. Относят идентифицируемый микроорганизм к тому виду, с которым он проявляет наибольшее сходство. Учитывают спектр чувствительности к противомикробным препаратам.

2. **Выдача заключения.** Оформляют заключение, которое представляет собой заверенный бланк с данными о пациенте, исследованном материале, выделенных видах микроорганизмов (в случае выделения УПМ необходимо указывать количество), спектре их чувствительности к противомикробным препаратам.

Этапы БЛМИ при выделении чистой культуры облигатных анаэробов. Среди облигатных анаэробов выделяют спорообразующие анаэробы клостридии (возбудители ботулизма, столбняка, газовой гангрены) и неспорообразующие (неклостридиальные) — пептококки, пептострептококки, вейлонеллы, пропионобактерии, бактероиды, порфиромонады, превотеллы, фузобактерии.

Первый этап.

1. **Забор материала и транспортировка с использованием транспортных систем для анаэробов.**

2. **Микроскопическое исследование материала** (в материале присутствуют полиморфные микроорганизмы либо грубые грамположительные палочки с обрубленными концами).

3. **Предварительная обработка материала методами температурного или алкогольного шока** для выделения спорообразующих анаэробов.

Процедура алкогольного шока: в течение 1 ч при комнатной температуре (22–25 °С) при постоянном перемешивании выдерживают смесь равных объемов абсолютного (или 96 %) этилового спирта и исследуемого материала (суспензия фекалий, раневой экссудат).

Процедура теплового шока: в подогретую на водяной бане при 80 °С в течение 5 мин пробирку со средой из рубленого мяса с глюкозой и крахмалом (chopped meat-glucose-starch medium) добавляют 1 мл суспензии соответствующего образца. Экспонируют пробу в течение 10 мин, а затем извлекают пробирку и охлаждают перед посевом в холодной воде.

4. **Посев материала на анаэробный кровяной агар, элективные и дифференциально-диагностические среды** (анаэробный кровяной агар

с гентамицином или анаэробный кровяной агар с неомицином и налидиксовой кислотой) *с целью получения изолированных колоний*. Посевы инкубируют 24–48 ч при 37 °С в анаэробных условиях (в анаэробной камере, либо в микроанаэростате, либо в анаэробном пакете).

5. Посев материала в жидкую тиогликолевую среду с целью определения летучих жирных кислот.

Второй этап:

1. Изучение морфотипов колоний на кровяном анаэробном агаре. Колонии анаэробов слизистые, выпуклые, мелкие, полупрозрачные, с серобелыми, преимущественно ровными краями. Колонии пигментирующих видов превотелл, порфиромонад, пептококков и пептострептококков приобретают светло-коричневое или черно-коричневое окрашивание на 7–14 сут инкубации на средах, содержащих кровь. Колонии бактериоидов на кровяном агаре могут давать зоны α -гемолиза. Колонии *Clostridium perfringens* могут обуславливать двойной гемолиз: 1 зона (внутренняя) — β -гемолиз, 2 зона (внешняя) — α -гемолиз. Роящийся рост типичен для *C. septicum*, *C. tetani*. *C. difficile* образуют колонии в виде битого стекла, могут иметь круглую или неправильную форму со слегка волокнистыми краями. Колонии *Fusobacterium* spp. имеют желтоватый или желто-кремовый оттенок.

2. Хроматография тиогликолевой среды и индикация анаэробов в среде по наличию летучих жирных кислот.

3. Микроскопия колоний.

4. Изучение флюоресценции колоний с помощью лампы Вуда. В проходящем длинноволновом УФ-свете (365 нм) представители рода *Prevotella* дают ярко-красную флюоресценцию, рода *Porphyromonas* и *C. difficile* — желто-зеленую флюоресценцию.

5. Посев изолированных колоний с целью определения их чувствительности к кислороду. Селективные анаэробные среды не всегда эффективно ингибируют рост сопутствующей факультативно-анаэробной микрофлоры, в связи с чем, на втором этапе бактериологического исследования подтверждают чувствительность исследуемой культуры к кислороду. Для этого намеченные для дальнейшего бактериологического исследования колонии высевают параллельно на сектора на две чашки Петри, одну из которых инкубируют в анаэробных условиях, а другую — в аэробных (рис. 23).

Посев на сектора осуществляют для всех морфотипов колоний; в случае однотипности пересевают не менее пяти колоний. Посев на сектора позволяет также накопить чистые культуры анаэробных микроорганизмов, что важно на дальнейших этапах идентификации и определения чувствительности к антимикробным средствам. Посевы инкубируют 24–48 ч при 37 °С.

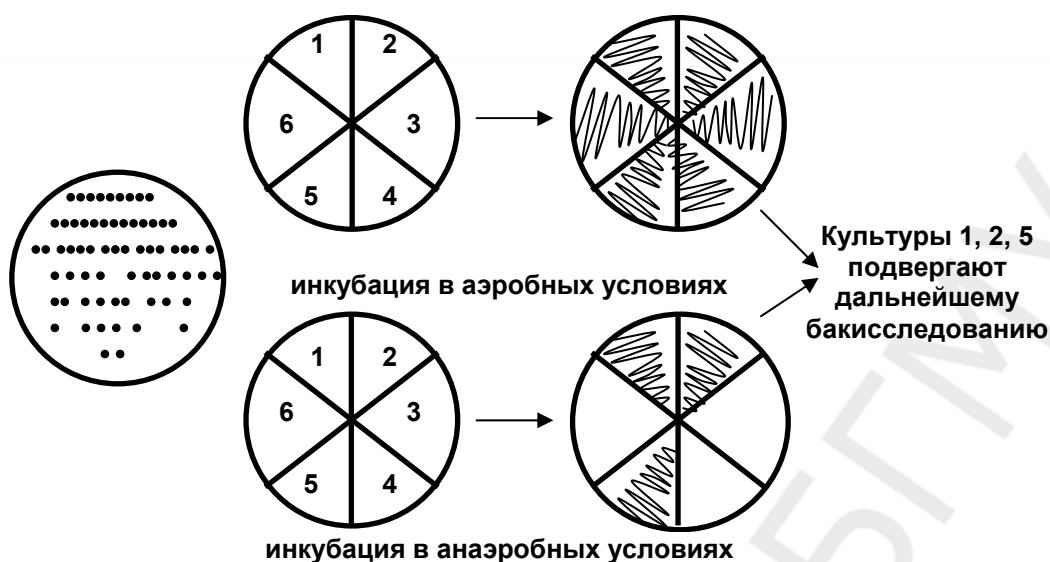


Рис. 23. Подтверждение чувствительности исследуемой культуры к кислороду

Третий этап. На третьем этапе исследуют свойства культур, для которых подтверждена чувствительность к кислороду.

1. **Определение чистоты культуры анаэробов в мазке по Граму.**

2. **Окончательная идентификация чистой культуры анаэробов** на основании биохимических признаков и спектра летучих жирных кислот. Ориентировочная идентификация до рода проводится с использованием ограниченного числа тестов, развернутая идентификация до вида — с использованием широкого спектра тестов.

Изучение биохимических признаков предпочтительно с использованием коммерческих тест-систем для биохимической идентификации анаэробов, которые позволяют относительно точно определить их вид. Большинство тест-систем применяются в комплексе с компьютеризированным банком данных биохимических профилей различных видов анаэробов, что упрощает процесс идентификации микроорганизмов.

3. **Определение спектра чувствительности к антибиотикам.**

Четвертый этап — аналогично выделению аэробов и факультативных анаэробов.

1. **Учет и анализ результатов.**

2. **Выдача заключения.**

Этапы бактериологического метода исследования обобщены в табл. 9.

Таблица 9

Схема бактериологического метода исследования

Этап	Содержание	
	Выделение аэробов и факультативных анаэробов	Выделение облигатных анаэробов
Первый	1. Забор, транспортировка, хранение, предварительная обработка материала.	1. Забор материала и транспортировка с использованием транспортных систем для анаэробов.

Этап	Содержание	
	Выделение аэробов и факультативных анаэробов	Выделение облигатных анаэробов
	2. Посев в среду обогащения (при необходимости). 3. Микроскопия. 4. Посев на питательные среды с целью получения изолированных колоний (количественный посев при выделении УПМ)	2. Микроскопия. 3. Предварительная обработка материала методами температурного или алкогольного шока для выделения спорообразующих анаэробов. 4. Посев на анаэробный кровяной агар и на элективные, дифференциально-диагностические среды с целью получения изолированных колоний. 5. Посев в жидкую тиогликолевую среду с целью определения летучих жирных кислот
Второй	1. Изучение морфотипов колоний. 2. Микроскопия колоний. 3. Ориентировочная РА на стекле с поливалентными сыворотками (при необходимости). 4. Накопление чистой культуры	1. Изучение морфотипов колоний на кровяном анаэробном агаре. 2. Микроскопия колоний. 3. Хроматография тиогликолевой среды и определение летучих жирных кислот. 4. Изучение флюоресценции колоний с помощью лампы Вуда. 5. Отсев изолированных колоний с целью определения их чувствительности к кислороду
Третий	Учет роста на среде накопления	Исследование свойств чувствительных к кислороду культур
	1. Оценка чистоты культуры в мазке по Грамму. 2. Окончательная идентификация чистой культуры. 3. Определение спектра чувствительности к антибиотикам	
Четвертый	1. Учет и анализ результатов. 2. Выдача заключения	

Оценка БЛМИ.

Достоинства:

- относительно высокая чувствительность (около 10^2 микроорганизмов в мл);
- относительно высокая специфичность (возможность установления этиологии заболевания);
- возможность определения количества микроорганизмов в исследуемом материале;
- возможность определения спектра чувствительности выделенной чистой культуры к антибиотикам;
- ранний метод исследования (может применяться с первых дней заболевания).

Недостатки: относительная длительность; трудоёмкость; опасность инфицирования; высокая стоимость.

Биохимическая идентификация микроорганизмов

Биохимическая идентификация основывается на определении ферментов микроорганизмов. Присутствие ферментов устанавливают по их способности разлагать соответствующие субстраты, для такой идентификации необходимо 18–24 ч. В последнее время определяют непосредственно сами ферменты, для такой идентификации требуется 4–6 ч.

Согласно международной биохимической классификации ферментов, в зависимости от катализируемой реакции выделяют 6 основных классов: оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы, лигазы. Отдельные представители каждого класса ферментов имеют систематическое название, традиционное (тривиальное) название, а также четырехуровневый числовой код, который отражает класс, подкласс, под-подкласс и серийный номер фермента в под-подклассе. Кроме систематического названия ферменты микроорганизмов имеют традиционные названия, получаемые в зависимости от субстратной специфичности: сахаролитические, протеолитические, липолитические, окислительно-восстановительные и ферменты-токсины. Наличие ферментов определяют с помощью специальных сред или тестов (табл. 10).

Таблица 10

Определение биохимических свойств микроорганизмов

Фермент	Среда для детекции	Положительная реакция
<i>Сахаролитические ферменты</i>		
Амилаза	Крахмальный агар (агар с 0,2 % крахмала) и раствор Люголя	При нанесении раствора йода на среду с 18–24-часовой культурой микроорганизмов, вокруг колоний с амилазной активностью образуется светлый неокрашенный ореол, в то время как остальная среда приобретает сине-фиолетовый цвет из-за присутствия в ней крахмала
Карбогидразы	Дифференциально-диагностические среды для энтеробактерий (Эндо, Левина, Плоскирева и др.); содержат лактозу, анилиновые красители	Лактозопозитивные энтеробактерии (<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>), образуют ярко окрашенные колонии, лактозонегативные энтеробактерии (<i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i>) — бледно-розовые или бесцветные колонии
	Полиуглеводные среды (Клиглера, Олькеницкого и др.). Среда Клиглера имеет малиново-красный цвет и содержит: 0,1 % глюкозы, 1 % лактозы, соли Fe ²⁺ , феноловый красный (индикатор pH)	При разложении глюкозы желтеет столбик среды, при разложении лактозы желтеет скошенная часть среды, при разложении углеводов с образованием CO ₂ в среде также появляются газовые пузырьки или разрыв столбика; при образовании H ₂ S наблюдается почернение по ходу укола

Фермент	Среда для детекции	Положительная реакция
	Жидкие или полужидкие моноуглеводные среды Гиса: содержат один из углеводов, индикатор рН (табл. 5); рН среды устанавливаются $7,2 \pm 0,2$. Для выявления газообразования в жидкие среды вносят поплавки	При разложении углеводов образуются кислые продукты, снижающие рН среды, в результате чего индикатор рН изменяет цвет. Газообразование на жидких средах приводит к накоплению газа в поплавке, в полужидких – появлению разрывов или газовых пузырьков в среде
Продукция ацетилметилкарбинола	Выявляют с помощью реакции Фогес–Проскауэра, используют 10%-ный или 20%-ный КОН	После добавления к культуре равного объёма 10%-ный или 20%-ный КОН и инкубации 4–24 ч при 37 °С в случае образования ацетилметилкарбинола среда окрашивается в розовый цвет с жёлтым оттенком; в случае образования ацетона и 2,3-бутиленгликоля окраска не изменяется
Протеолитические ферменты		
Протеазы и пептидазы	5%-ное обезжиренное молоко	Происходит свёртывание с образованием сгустков казеина и пептонизация с лизисом казеина, при которой молоко становится прозрачным. Обе реакции могут происходить последовательно или одновременно
	Свёрнутая сыворотка	Происходит разжижение
	Столбик желатина	Происходит разжижение (желатин разжижают <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Bacillus anthracis</i>)
	Молочный агар в чашках Петри имеет мутно-белый цвет	Появляются зоны просветления вокруг колоний на фоне мутно-белой среды
Дезаминазы аминокислот	Среда с одной из аминокислот и индикатором рН; рН среды $7,2 \pm 0,2$	Образуется аммиак, приводящий к защелачиванию среды и изменению цвета индикатора
Декарбоксилазы	Среда с одной из основных аминокислот (аргинином, лизином, орнитинном, гистидином, тирозином, глутамином) и индикатором рН	При наличии декарбоксилазной активности среда подщелачивается за счёт образования диаминов, вызывая изменение цвета индикатора
Триптофаназа	Мясопептонный бульон или среда с аминокислотой триптофаном, а также индикаторная бумажка, смоченная щавелевой кислотой и закреплённая под пробкой над питательной средой	Образуется индол, который приводит к покраснению бумажки, смоченной щавелевой кислотой
Десульфуразы (цистиназы)	Среды с цистеином, метионином и качественным реактивом на H_2S — солями железа, свинца, висмута	Образуется H_2S , который взаимодействует с Fe^{2+} (Pb^{2+} , Bi^{2+}) с образованием сульфида железа черного цвета, что вызывает почернение среды

Фермент	Среда для детекции	Положительная реакция
Уреаза	Среда с мочевиной и индикатором pH — феноловым красным, pH среды устанавливают $6,8 \pm 0,2$	Образуется аммиак и окраска среды из красно-оранжевой переходит в малиново-лиловую за счёт сдвига pH в щелочную сторону
<i>Липолитические ферменты</i>		
Липаза	Желточный агар или среда с твином-80	Липазы гидролизуют жиры на глицерин и свободные жирные кислоты. Вокруг колоний в проходящем свете на поверхности среды видна радужная пленка (похожа на бензиновую пленку на поверхности воды)
Лецитиназа	Желточный агар (к 300 мл стерильного МПА, расплавленного и охлажденного до 45–50 °С, добавляют источник лецитина — желток куриного яйца)	Лецитиназа расщепляет лецитин на фосфохолин и диглицерид, и вокруг колоний появляются опалесцирующие зоны, или «венчики помутнения»; лецитиназа есть у <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Clostridium</i> spp., <i>Fusobacterium</i> spp.
<i>Окислительно-восстановительные ферменты (ОВФ)</i>		
Оксидаза	Фильтровальная бумага, смоченная свежеприготовленным 1%-ным раствором тетраметилпарафенилен-диамина (реактив на оксидазу)	При нанесении бакпетлей 18–24-часовой культуры на поверхность фильтровальной бумаги в течение 1 мин появляется пурпурно-фиолетовое окрашивание; используют для дифференциации <i>Pseudomonas</i> spp. (оксидазопозитивные) и <i>Enterobacteriaceae</i> (оксидазонегативные)
Каталаза	3%-ный раствор H_2O_2 ; присутствие каталазы определяют у микроорганизмов, выращенных на любой питательной среде, кроме кровяных сред	При нанесении на колонию перекиси водорода, либо при внесении культуры в каплю перекиси на предметном стекле появляются пузырьки газа; используют для дифференциации <i>Streptococcus</i> spp. (каталазопозитивные) и <i>Staphylococcus</i> spp. (каталазонегативные)
Дегидразы	Сахарный полужидкий агар (донор водорода) с 1%-ным метиленовым синим (акцептор водорода)	Дегидразы способны восстанавливать некоторые органические красители, поэтому метиленовый синий обесцвечивается. Используют для определения бактериальной обсеменённости молока: подкрасив молоко метиленовой синькой, определяют время его обесцвечивания. Чем оно меньше, тем более обсеменено молоко. Качественное молоко долго остаётся синим
Пероксидаза	Используют бензидиновый тест: на предметное стекло наносят 4–6 капель суточной бактериальной культуры и добавляют по 1–3 капли 2%-ного раствора метил-	В течение 5–10 мин бесцветная среда приобретает розовую или вишнёво-красную окраску. Положительная реакция характерна для <i>Staphylococcus</i> spp., отрицательная — <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Escherichia</i> spp.

Фермент	Среда для детекции	Положительная реакция
	парааминофенол сульфата и 3%-ного раствора H_2O_2	
Ферменты-токсины		
Гемолизин	5–10%-ный кровяной агар	α -Гемолизины приводят к неполному гемолизу с образованием вокруг колоний зоны неполного просветления среды, которая в течение 2–5 сут приобретает зеленовато-бурый оттенок. β -Гемолизины вызывают полный гемолиз с образованием прозрачной зоны вокруг колоний. γ -Гемолизины не дают видимого глазом гемолиза
О-стрептолизин	В пробирки с двукратными разведениями β -гемолитических стрептококков добавляют равный объем 5%-ных эритроцитов кролика, инкубируют при 37 °С 1 час; параллельно ставят контроль из взвеси эритроцитов в питательном бульоне	В положительных случаях происходит гемолиз (лаковая кровь), в отрицательных — образуется осадок из эритроцитов. Определяют титр О-стрептолизина — наибольшее разведение микробной культуры при котором наблюдается гемолиз
Плазмокоагулаза	Стерильная цитратная плазма крови, разлитая по 0,4 мл в пробирки	После внесения суточной агаровой культуры и инкубации посевов 2–5 ч при 37 °С происходит свёртывание плазмы и утрата ею текучести
Гиалуронидаза	Побирка с гиалуроновой кислотой и уксусная кислота	Если тест-культура образует гиалуронидазу, то после 15 мин инкубации культуры бактерий при 37 °С в пробирке с гиалуроновой кислотой и добавления 2–3 каплей уксусной кислоты образуется сгусток муцина
Нуклеазы	МПА с ДНК, среда опалесцирует (полупрозрачна)	Через 18–24 ч культивирования на среде после нанесения на ее поверхность 0,1 % H_2SO_4 из-за деполимеризации ДНК и РНК вокруг колоний образуется прозрачный ореол — «венчик просветления»
Фибринолизин	Сгустки фибрина	Растворение сгустков фибрина
Цитотоксины	Культура эпителиальных клеток или др. и токсин, выделенный путем фильтрования культуральной жидкости с использованием бактериальных фильтров	При культивировании культуры клеток с безмикробным фильтратом токсина первая утрачивает типичную тканевую морфологию: округляется, ядра пикнотируются

Фермент	Среда для детекции	Положительная реакция
Летучие жирные кислоты	Газо-жидкостная хроматография кислото-эфирного экстракта ЛЖК из биологического материала или культуральной жидкости, содержащей анаэробы	На хроматограмме появляются пики в зависимости от массы и полярности вещества: чем легче вещество, тем раньше появляется пик на хроматограмме, поэтому ЛЖК выходят в следующей последовательности: уксусная, пропионовая, масляная, валериановая, капроновая (рис. 24). Изомасляная, изовалериановая, изокапроновая кислоты выходят раньше соответствующей кислоты

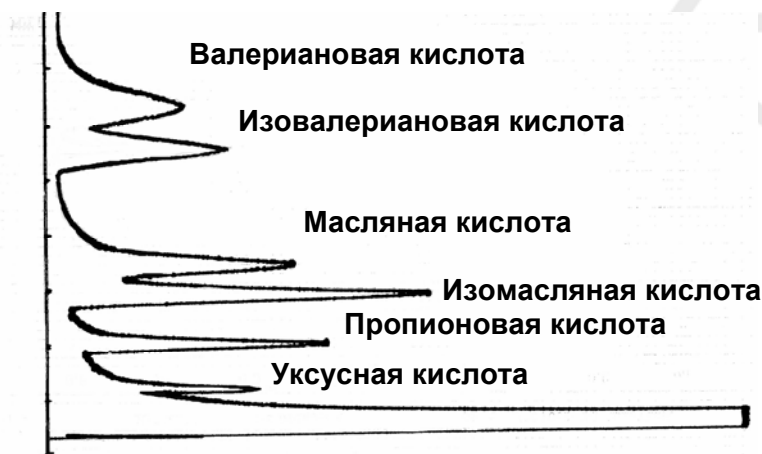


Рис. 24. Хроматограмма выхода ЛЖК, отражающая зависимость времени выхода стандартного раствора смеси летучих жирных кислот от их молекулярной массы и полярности (чувствительность электрометра $1 \cdot 10^{-9}$)

В последние годы в бактериологических лабораториях применяются одноразовые коммерческие тест-системы для биохимической идентификации. Они представляют собой пластиковые планшеты с лунками, заполненными дегидратированными субстратами с индикатором pH. Тест-системы позволяют изучать 20, 32, 64 биохимических признака (рис. 25).



Рис. 25. Коммерческие тест-системы

Схема идентификации с использованием таких тест-систем включает следующие этапы:

- 1) выделение чистой культуры или изолированных колоний на плотной питательной среде;
- 2) приготовление бактериальной суспензии с определенной концентрацией микроорганизмов, которую определяют путем сравнения со стандартами мутности;
- 3) внесение суспензии микроорганизмов в лунки тест-системы;
- 4) инкубация в термостате от 4 до 24 часов (длительность зависит от тест-системы) при 37 °С;
- 5) учёт результатов, который может быть:
 - а) визуальным по изменению цвета индикатора;
 - б) автоматическим с использованием микробиологического анализатора.
- 6) анализ результатов с использованием компьютерного банка данных, включающего биохимические профили разных видов микроорганизмов. Результаты ферментации учитываются по принципу +/- и вносятся в референс-таблицу, после чего происходит сравнение с компьютерным банком данных. Идентифицируемый микроорганизм относят к тому виду, с которым он проявляет наибольшее сходство и указывают степень сходства (в %). Хорошей идентификацией считается идентификация с 95 % (и более) совпадением признаков.

Идентификация микроорганизмов без выделения чистой культуры

Идентификация без выделения чистой культуры микроорганизмов необходима для детекции возбудителей непосредственно в биологическом материале, что позволяет проводить экспресс-диагностику заболеваний, а также выявлять некультивируемые микроорганизмы. Используют два подхода: генетический и серологический.

1. Генетический. Применяют молекулярно-генетические методы (ПЦР, гибридизацию, секвенирование). Являются перспективными для идентификации любых микроорганизмов и определения устойчивости к противомикробным препаратам (бактерий, вирусов), что обусловлено крайне высокой чувствительностью и быстротой получения результатов. Широко используют для идентификации длительно культивируемых бактерий (микобактерии туберкулёза), облигатных внутриклеточных паразитов (хламидий), возбудителей менингитов, а также вирусов (ВИЧ и вирусов гепатитов). Предполагается, что в будущем эти методы станут основными в диагностике.

2. **Серологический.** Применяют высокоспецифические серологические реакции: РИФ, ИФА. Наибольшее распространение данное направление получило:

а) для идентификации в РИФ некоторых возбудителей заболеваний, передаваемых половым путём (хламидии, микоплазмы, уреаплазмы);

б) идентификации в ИФА антигенов вируса гепатита В и антигенов ВИЧ.

Принципы молекулярно-генетического анализа

В конце 90-х гг. XX в. в диагностике инфекционных заболеваний ведущее место заняли молекулярно-генетические методы исследования, основанные на изучении биомолекул ДНК, РНК, белков в составе клеток (см. табл. 10). Они расширили представления:

- о структуре и регуляции функций живого;
- происхождении микроорганизмов и их эволюции;
- молекулярном патогенезе заболеваний;
- возможности диагностики и лечения заболеваний.

Сферы использования молекулярно-генетических методов в микробиологии:

1. **Диагностика инфекционных заболеваний.** Маркёром возбудителя является его геном, а именно видоспецифические генетические участки, по которым определяют присутствие определенного вида микроорганизма в клиническом материале (*идентифицируют микроорганизмы*). Например IS 6110 есть только у микобактерий туберкулеза, поэтому его выявление дает прямое указание на присутствие возбудителя туберкулеза.

2. **Химиотерапия и химиопрофилактика инфекционных заболеваний.** Молекулярно-генетические методы широко используются для выявления маркеров резистентности — генов резистентности либо мутаций в генах. Определение устойчивых к β -лактамным антибиотикам стафилококков проводят по наличию в их геноме гена *mecA*, энтеробактерий (*Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae*) и *Pseudomonas aeruginosa* — по генам *tem*, *shv*, *оха*. Выявление резистентности к рифампицину у *Mycobacterium tuberculosis* проводят по мутациям в *groV*-гене.

3. **Санитарная микробиология.** Молекулярно-генетические методы позволяют выявлять инфекционные агенты в пищевых продуктах и тем самым контролировать их качество или расследовать причину пищевых отравлений. Эти методы позволяют определять генетически модифицированные пищевые продукты, а также проводить детекцию инфекционных агентов в окружающей среде.

4. **Эпидемиология и инфекционный контроль.** С помощью молекулярно-генетических методов определяют различия микроорганизмов одно-

го вида (типировать микроорганизмы), выделенных от разных больных, в разных стационарах, в разных географических регионах. Это позволяет определять источники возбудителя, пути его распространения в стационаре, стране, мире и разрабатывать меры, контролирующие распространение эпидемических клонов.

5. Биотехнология, в том числе **вакцинология**. С помощью молекулярно-генетических методов создают генетически модифицированные организмы с полезными для народного хозяйства свойствами. В последнее время в вакцинологии получил широкое распространение подход, называемый «обратной вакцинологией». В классической вакцинологии основными объектами исследования являлись микроорганизмы-возбудители, которых инактивировали или лишали вирулентности, а затем микроорганизм или его компоненты использовали для вакцинации. В обратной вакцинологии основным объектом исследования является *секвенированный геном* микроорганизма, в котором с использованием компьютерного анализа проводят поиск генов (*in silico* анализ), кодирующих антигены микроорганизмов. Эти гены клонируют в геном *Escherichia coli* или других неприхотливых микроорганизмов, которые начинают продуцировать «клонированные» белки, иммуногенные свойства которых изучают путем иммунизации мышей. Наиболее иммуногенные пептиды становятся кандидатами в вакцины и проходят дальнейшие клинические испытания. Такой подход использован для создания вакцин, в разработке которых с использованием классических методов испытывали сложности — против менингококков, стрептококков (*Streptococcus pneumoniae*), хламидий (*Chlamydomphila pneumoniae*), стафилококков, иерсиний (*Yersinia pestis*), порфиромонад (*Porphyromonas gingivalis*), плазмодиев малярии (*Plasmodium falciparum*).

6. Систематика и эволюция микроорганизмов. Молекулярно-генетические методы позволяют создать естественную систематику микроорганизмов, отражающую их эволюционные взаимосвязи.

7. Геномика и патогеномика. При помощи молекулярно-генетических методов расшифровывают структуры и функций геномов, протеомов, внутриклеточных метаболитов, изучают молекулярный патогенез инфекционных заболеваний.

Материал для молекулярно-генетических исследований. Тип исследуемого материала зависит от симптомов, патогенеза, эпидемиологии предполагаемого заболевания. Для молекулярно-генетических исследований используется такой же материал, как и для бактериологического исследования:

- клинический биологический материал от больного (кровь, смывы, соскобы, слюна, гной, мокрота, спинномозговая жидкость, желудочный сок, отделяемое из уретры, моча, испражнения, биоптаты тканей и органов);
- пробы из объектов внешней среды (пищевые продукты, вода, почва);

– чистые культуры микроорганизмов.

Вид материала определяется методом, который будет использован для выделения ДНК/РНК.

Этапы молекулярно-генетических исследований:

1. Взятие материала, маркировка, транспортировка, подготовка проб к исследованию, хранение.
2. Экстракция ДНК/РНК.
3. Проведение молекулярно-генетических исследований.
4. Анализ и интерпретация результатов, выдача заключения.

Классификация молекулярно-генетических методов исследования представлена в табл. 11.

Таблица 11

Классификация молекулярно-генетических методов

Классификационный признак	Принципы методов
Методический подход	Изучение фрагментов ДНК Гибридизация нуклеиновых кислот Амплификация нуклеиновых кислот Анализ амплифицированных фрагментов Определение последовательности нуклеотидов в ДНК, РНК и аминокислот в белках Модификация генетической информации
Цель	Идентификация микроорганизмов Типирование микроорганизмов Эволюционный и филогенетический анализ микроорганизмов Определение положения и функций генов микроорганизмов Изучение экспрессии генов

I. Методы, основанные на изучении фрагментов ДНК:

1. **Плазмидное типирование** (рис. 26, 27). При помощи специальных методов из бактерий выделяют плазмидную ДНК и проводят разделение плазмид в агарозном геле. Перед проведением электрофореза плазмидную ДНК можно обработать рестриктазами, что приводит к фрагментированию ДНК.

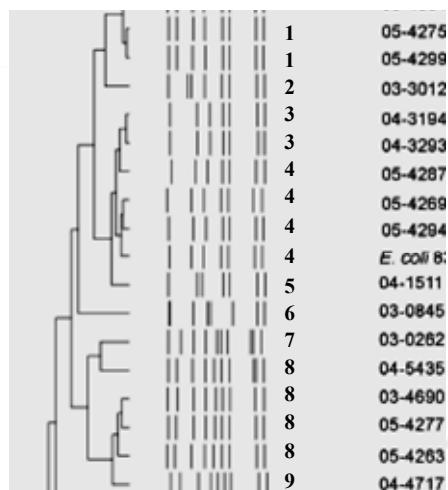


Рис. 26. Рестрикционные профили плазмид, выделяемых у разных штаммов сальмонелл (рестрикция с помощью эндонуклеазы BglII плазмиды bla_{cmv}-2 позволяет выявить 9 типов плазмид и распределить сальмонеллы на подтипы)

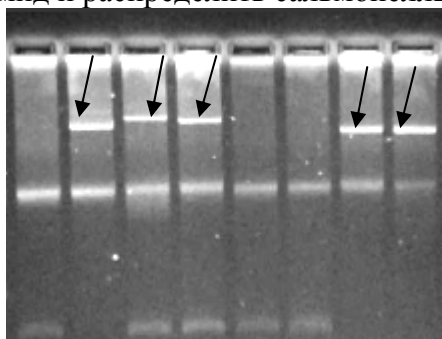


Рис. 27. Установление идентичности *Salmonella typhimurium*, выделяемых от разных пациентов, по присутствию у них одинаковых плазмид (во время вспышки пищевого отравления от больных выделяли сальмонеллы с одинаковыми плазмидами размером 2900 п. о. (образцы 2, 3, 4, 7, 8))

Метод позволяет оценить количество плазмид, их размер, а также характер образуемых рестрикционных фрагментов. Плазмидный анализ широко используется в эпидемиологических исследованиях, особенно при расследовании вспышек заболеваний, вызванных такими микроорганизмами, как *Staphylococcus spp.*, *P. aeruginosa*, представителями семейства *Enterobacteriaceae*. Однако многие клинические штаммы способны терять плазмиды, особенно в процессе многочисленных пересевов в лаборатории.

2. Рестрикционно-эндонуклеазный анализ (REA). Бактериальную хромосому нарезают рестриктазами на множество фрагментов. Затем проводят электрофорез в пульсирующем электрическом поле, в результате которого фрагменты ДНК выстраиваются в зависимости от размера в шеренгу, образуя уникальный видоспецифический профиль (рис. 28).

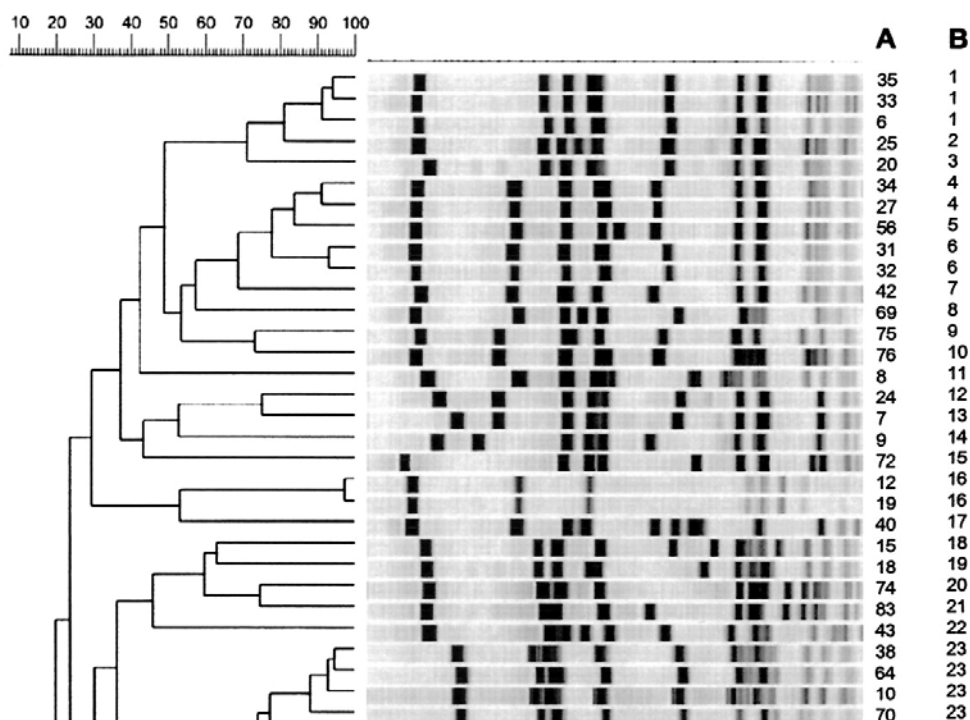


Рис. 28. Рестрикционно-эндонуклеазный анализ ДНК *Staphylococcus* spp.

По сходству рестрикционных профилей изучаемого и известных видов микроорганизмов можно идентифицировать и типировать микроорганизмы. Обычно для рестрикции используют макро-рестриктазы — ферменты, распознающие участки, состоящие из 6 или более нуклеотидов (табл. 12). Такие участки распознавания присутствуют в геноме в небольшом количестве, поэтому в результате действия макро-рестриктаз образуется до 30 достаточно крупных фрагментов. С помощью данного метода анализируется около 90 % бактериальной хромосомы. С помощью компьютеризированной системы сканирования гелей могут быть созданы базы данных рестрикционных профилей для многих микроорганизмов.

Таблица 12

Примеры некоторых рестриктаз и их рестрикционных сайтов

Типы рестриктаз	Рестриктаза	Сайт распознавания
Макрорестриктазы, распознающие последовательности из 6 и более нуклеотидов	SmaI	5'...C C C [^] G G G...3' 3'...G G G [^] C C C...5'
	SaII	5'...G [^] T C G A C...3' 3'...C A G C T [^] G...5'
	XbaI	5'...T [^] C T A G A...3' 3'...A G A T C [^] T...5'
Стандартные рестриктазы	HaeIII (BsuRI)	5'...G G [^] C C...3' 3'...C C [^] G G...5'

Примечание: ^ — место рестрикции.

II. Методы, основанные на гибридизации нуклеиновых кислот.

Молекулярная гибридизация — молекулярно-биологическая техника, основанная на способности одноцепочечной молекулы изучаемой ДНК/РНК

специфически соединяться с комплементарными одноцепочечными зондами (молекулами-свидетелями) с образованием гибридных дуплексов, которые флюоресцируют или меняют цвет реакционной смеси.

Методы молекулярной гибридизации позволяют выявлять степень сходства двух молекул ДНК, что используется для эволюционного анализа, для идентификации и типирования микроорганизмов, а также для изучения экспрессии генов.

Варианты проведения молекулярной гибридизации:

1. *В растворе.*

2. *В тканевых срезах (in situ).* Тканевые срезы депарафинируют, демаскируют нуклеиновые кислоты в них и наносят гибридизационный раствор, содержащий специфические меченые зонды. Проводят денатурацию ДНК, гибридизацию, отмывку несвязавшихся зондов, после чего осуществляют детекцию гибридизировавшихся зондов по флюоресценции.

3. *На микрочипах (эррей-гибридизация)* — наиболее совершенный метод. Позволяет наносить и фиксировать до нескольких сотен тысяч ДНК-зондов на поверхность стеклянного чипа, что дает возможность изучать одновременно все гены, присутствующие в ДНК микроорганизма.

4. *На мембранах.* Изучаемую ДНК фиксируют на мембранах и к ней добавляют гибридизационный раствор, содержащий специфические меченые зонды. В случае комплементарности зонд связывается с ДНК, после отмывки несвязавшихся зондов регистрируют флюоресценцию.

Этапы реакции гибридизации на мембранах:

1. *Выделение ДНК.* Методы аналогичны методам выделения ДНК для проведения ПЦР.

2. *Получение мелких фрагментов изучаемой ДНК* (не более 5000–10 000 п. о.). Для этого проводят либо рестрикцию (нарезку рестриктазами) крупной молекулы ДНК, либо ПЦР с образованием небольших ампликонов, либо обработку ультразвуком.

3. *Нанесение ДНК на мембрану и фиксация ДНК на мембране:*

– дот-блоты или слот-блоты. Перед нанесением ДНК денатурируют, превращают в одноцепочечные молекулы. Затем небольшие фрагменты изучаемой ДНК наносят на мембрану в виде точек (дот-блоты) либо полосок (слот-блоты);

– саузерн-блоты. Небольшие фрагменты изучаемой ДНК предварительно разделяют электрофорезом в полиакриламидном геле. ДНК переносят из геля на поверхность мембран.

Перенесенную на мембрану ДНК фиксируют при 80 °С или УФ-светом.

5. *Гибридизация* проводится в несколько этапов:

– обработка предгибризационным буфером мембраны с ДНК, что увеличивает связывающую способность мембраны;

– приготовление гибридизационного раствора, содержащего буфер и меченый зонд;

– программирование гибридизационной камеры и проведение гибридизации при 65 °С.

6. *Анализ результатов.* Если зонд комплементарен одноцепочечному участку ДНК изучаемого микроорганизма, происходит связывание зонда и исследуемой ДНК. Некомплементарные несвязавшиеся зонды удаляют промыванием. В месте связывания зонда выявляют флюоресценцию или изменение цвета (рис. 29).

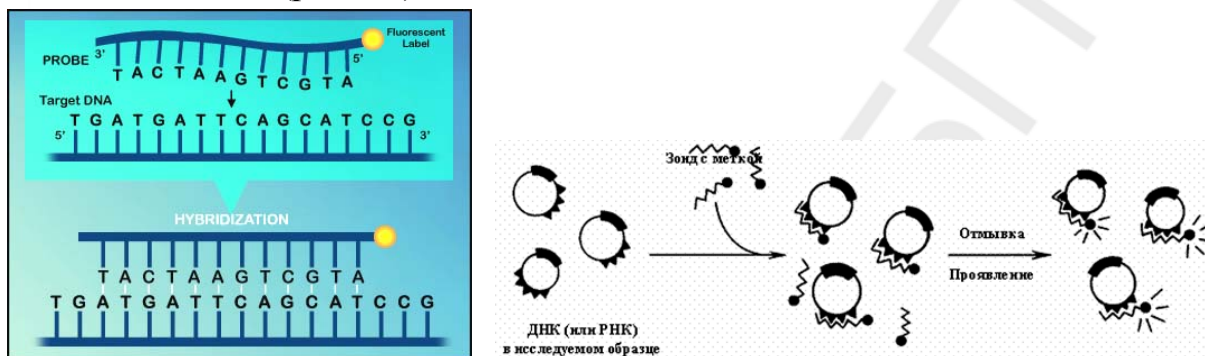


Рис. 29. Схема реакции молекулярной гибридизации для обнаружения в образцах ДНК возбудителя специфическим меченым зондом

III. Методы, основанные на амплификации нуклеиновых кислот.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) была разработана в 1983 г. американским биохимиком Кэри Мюллисом, который в 1993 г. был удостоен за это открытие Нобелевской премии.

Метод ПЦР основан на принципе естественной репликации ДНК и заключается в получении множественных копий (ампликонов) ДНК размером до 5000 п. о.

В качестве амплифицируемых участков ДНК микроорганизмов могут выступать гены патогенности, жизненно важных функций (гены «домашнего хозяйства»), устойчивости к противомикробным препаратам, видо- и родоспецифичные гены (важны для идентификации).

Принцип ПЦР. После температурной денатурации двухцепочечной ДНК образуются одноцепочечные молекулы, к которым присоединяются небольшие олигонуклеотиды — праймеры. Праймеры присоединяются только к комплементарному участку ДНК на обоих цепях ДНК и ограничивают амплифицируемый фрагмент с двух сторон. К 3'концу праймера прикрепляется ДНК-полимераза и на ДНК-матрице синтезирует копию. Синтез ДНК протекает только между праймерами.

Каждая стадия происходит при определенной температуре (рис. 30).

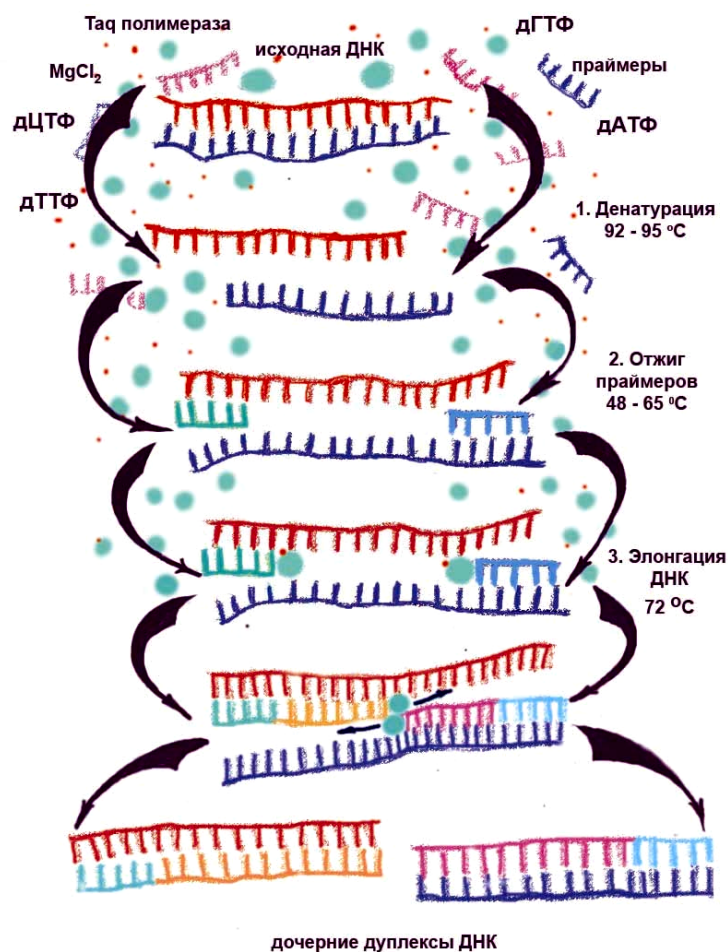


Рис. 30. Схема полимеразной цепной реакции

Каждый вновь синтезируемый фрагмент ДНК служит матрицей для синтеза двух новых нитей в следующем цикле амплификации. При многократном (30–40 раз) повторении этих стадий и оптимальном сочетании компонентов реакционной смеси происходит экспоненциальное увеличение количества ампликонов до 2^n , где n — число циклов амплификации. Детекцию образуемых ампликонов проводят с использованием электрофореза, либо флюоресцирующих зондов, либо флюоресцирующего ДНК-красителя *SybrGreen*. Получающиеся ампликоны имеют определенный размер, равный количеству олигонуклеотидных пар амплифицируемой последовательности и праймера.

Постановка ПЦР проводится в 5 этапов.

Первый этап — выделение (экстракция) ДНК из клеток (рис. 31). Метод выделения ДНК зависит от изучаемого микроорганизма и вида материала для исследований.



Рис. 31. Экстракция ДНК

На этой стадии клетки лизируют одним из способов: а) ферментативно (лизосим); б) химически; в) термически (90–95 °С). Клеточный дебрис осаждают центрифугированием, при этом ДНК остается в растворе. В некоторых случаях возникает необходимость в концентрировании ДНК. Для этого находящуюся в растворе ДНК адсорбируют на сорбенте, а затем проводят десорбцию ДНК небольшим количеством элюента. Концентрируют ДНК также с использованием осаждающих веществ, после чего осевшую ДНК ресуспендируют в небольшом объеме воды.

Второй этап — приготовление реакционной смеси. В микроцентрифужных пробирках объемом 0,5 или 0,2 мл смешивают компоненты реакционной смеси так, чтобы объем общей реакционной смеси составлял 25, 50 или 100 мкл. Все компоненты реакции вносят микропипеткой, причём каждый раз наконечник микропипетки меняют во избежание контаминации.

Обязательные компоненты реакционной смеси:

- а) раствор искомой ДНК, выделенной на предыдущей стадии;
 - б) смесь четырёх дНТФ (дезоксинуклеотидтрифосфатов) — строительный материал ДНК;
 - в) термостабильная ДНК-полимераза — Таq-полимераза (не денатурирует при 96 °С), осуществляющая полимеризацию нуклеотидов; ее получают из термофильных микроорганизмов *Thermophilus aquaticus*;
 - г) два синтетических праймера (прямой и обратный) — короткие, длиной 15–30 оснований, одноцепочечные олигонуклеотиды, которые связываются с комплементарными структурами исследуемой ДНК и с которых начинается биосинтез множественных копий;
 - д) специфический буфер. Для функционирования Таq-полимеразы необходимы ионы Mg^{+2} , определённое значение рН и концентрации солей.
- Необязательным компонентом являются присадки, увеличивающие специфичность реакции.

Третий этап — программирование температурного цикла и проведение амплификации заданного фрагмента ДНК в термоциклере (рис. 32). На выделенной ДНК-матрице происходит процесс многократного копирования ДНК в ходе последовательно сменяющихся циклов. Пробирки с реакционной смесью размещают в приборе — термоциклере. Температурные режимы циклов в термоциклере изменяются в соответствии с заданной программой. Программа проведения ПЦР включает 4 стадии (табл. 13).



Рис. 32. Термоциклер

Четвертый этап — визуализация получаемых копий ДНК и регистрация результатов реакции. Образующий высококонцентрированный раствор ампликонов ДНК прозрачен. Поэтому для выявления ДНК проводят электрофорез в агарозном геле, содержащем флюоресцирующий в УФ-свете ДНК-краситель — бромид этидия. ДНК движется в электрическом поле, взаимодействует с этидием бромидом и при просматривании в трансиллюминаторе (источник УФ-света) выглядит в виде светящейся оранжевой полоски. Полученные результаты можно документировать, фотографируя электрофореграммы с использованием оранжевого светофильтра.

Таблица 13

Характеристика стадий ПЦР

Стадия	Температура, °С	Экспозиция	Описание стадии
Начальная денатурация	90–95	3–10 мин	Большие двухцепочечные молекулы ДНК раскручиваются с образованием одноцепочечных молекул
25–40 циклов	денатурация	25 с – 1 мин	Небольшие двухцепочечные ампликоны раскручиваются с образованием одноцепочечных молекул
	отжиг	25 с – 4 мин	Праймеры прикрепляются к комплементарным фрагментам ДНК-матрицы, образуя дуплексы

	элонгация	72	25 с – 4 мин	ДНК полимеразы прикрепляется к 3'-концу праймера, соединившегося с ДНК-матрицей, и синтезирует копию, комплементарную ДНК-матрице
Конечная элонгация		72	5–10 мин	Образуются дуплексы ДНК
Хранение		4	–	–

Примечание: Температура отжига зависит от нуклеотидного состава праймера и рассчитывается математически.

Проведение электрофореза (рис. 33, 34).



Рис. 33. Источник тока и камера для электрофореза

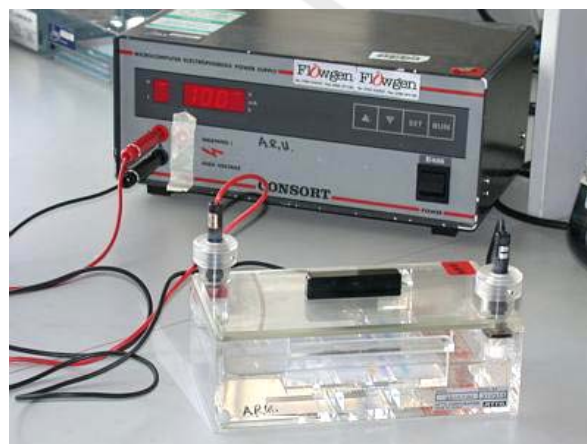


Рис. 34. Камера для электрофореза с агарозным гелем

Агарозный гель (0,5–4 %) с лунками для образцов опускают в аппарат для проведения электрофореза так, чтобы лунки находились в области катода. В камеру для электрофореза заливают трис-ацетат-ЭДТА-буфер так, чтобы толщина слоя жидкости над гелем составляла 1–2 мм. Образец смешивают с загрузочным красителем в соотношении 1:6 и вносят 6–20 мкл в лунку в геле. Обычно одновременно исследуют много образцов. Загрузочный краситель (зеленый, синий) имеет скорость движения, схожую с ДНК, поэтому по его перемещению судят о местонахождении ДНК в геле. В зависимости от плотности тока время проведения электрофореза составляет от 30 мин до 24 ч. После проведения электрофореза гель вынимают из камеры и переносят на столик трансиллюминатора, где бромистый этидий, связавшийся с ДНК, флюоресцирует в УФ-свете (230 нм), давая оранжевое свечение.

Пятый этап — анализ и интерпретация результатов реакции (рис. 35). Для оценки результатов учитывают опытные лунки, а также лунки с положительным и отрицательным контролем (рис. 36, табл. 14).



Рис. 35. Автоматизированная система визуализации гелей: трансиллюминатор, видеочамера, компьютер

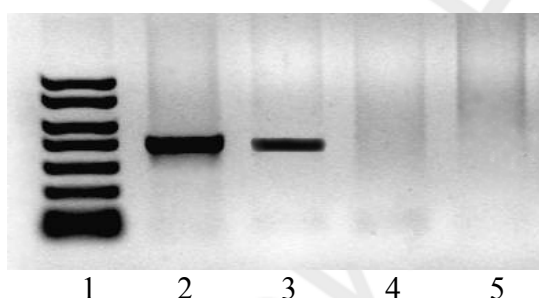


Рис. 36. Электрофореграмма продуктов ПЦР при диагностике возбудителя бактериальной инфекции:

1 — маркер молекулярного веса; 2 — положительный контроль; 3 — результат положительный; 4 — результат отрицательный; 5 — отрицательный контроль

Таблица 14

Анализ результатов ПЦР

Образцы	Светящиеся оранжевые полосы определенной молекулярной массы
Отрицательный контроль	Должны отсутствовать
Положительный контроль	Должны присутствовать
Опытные образцы положительные	Присутствуют
Опытные образцы отрицательные	Отсутствуют

При интерпретации результатов ПЦР следует помнить, что могут быть получены как ложноположительные, так и ложноотрицательные результаты. Ложноположительные результаты могут наблюдаться в результате контаминации при нарушении правил проведения ПЦР. Ложноотрицательные результаты могут наблюдаться в результате снижения чувствительности ПЦР при ингибировании реакции компонентами биологических образцов.

Модификации ПЦР:

1. **Классическая (specific PCR)** — амплификация участков ДНК размером до 5000 п.о. с использованием одной пары праймеров.

2. **Мультипраймерная (multiplex PCR)** — одновременное использование нескольких пар праймеров в одной реакционной пробирке. Это позволяет проводить одновременную амплификацию ДНК различных возбудителей, что сокращает время и расход реактивов. Например, мПЦР для диагностики гнойных менингитов одновременно определяет ДНК наиболее вероятных возбудителей бактериальных менингитов: *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*.

3. **Широкодиапазонная** — использование универсальных праймеров, взаимодействующих с высоко консервативными участками ДНК, встречающимися у многих микроорганизмов. Применяют для выявления в клиническом материале микроорганизмов, в том числе неизвестных и некультивируемых. Обычно мишенью для ПЦР являются гены, кодирующие рибосомы 16S и 23S, имеющие сходную структуру у различных прокариот.

4. **С обратной транскрипцией** — используется для обнаружения РНК у РНК-вирусов. Первоначально при помощи РНК-зависимой ДНК-полимеразы (обратной транскриптазы или ревертазы) синтезируют комплементарную ДНК, которую затем используют в стандартной ПЦР.

5. **Гнездовая** — обладает большей чувствительностью и специфичностью, т. к. проводится последовательно с двумя разными парами праймеров. ДНК-продукты, образуемые в первой ПЦР, взаимодействуют со второй парой праймеров.

6. **В реальном времени** — используется для определения точечных мутаций, количественного содержания ДНК в пробе, а также для определения уровня экспрессии генов. Этот тип ПЦР находит все большее распространение, так как выявление ампликонов осуществляется по флюоресценции зондов либо красителя *SybrGreen* и не требует проведения электрофореза (сокращается время и трудоёмкость анализа).

7. **ПП-ПЦР или ПЦР с использованием произвольных праймеров (RAPD-анализ полиморфизма случайно амплифицированной ДНК)** — основана на использовании коротких праймеров, длиной 9–10 п. о., способных связаться с разными участками ДНК при низкой температуре отжига. В результате RAPD-анализа происходят амплификации нуклеотидных последовательностей в различных областях генома и образуются многочисленные фрагменты разной длины, по количеству и размерам которых судят о групповой или видовой принадлежности микроорганизма.

8. **Асимметричная** — один из праймеров берут в концентрации в 10 раз большей, чем другой, чем добиваются преобладания среди продуктов реакции одноцепочечных ДНК над дуплексами.

IV. Методы анализа амплифицированных фрагментов.

Анализ амплифицированных фрагментов позволяет:

- 1) идентифицировать микроорганизмы;
- 2) выявлять подтипы микроорганизмов одного вида;

3) выявлять мутации в ДНК.

Внутривидовое типирование особенно важно при проведении эпидемиологических исследований. По сравнению с традиционными фенотипическими методами, генотипирование на основе ПЦР отличается универсальностью, более глубоким уровнем дифференциации, возможностью использования количественных методов для оценки идентичности штаммов.

1. **Полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ, англ. — RFLP).** Используя ПЦР, амплифицируют определенный генетический локус. Далее продукт амплификации расщепляют рестрикционными эндонуклеазами. При этом образуются фрагменты различного размера, которые при проведении электрофореза образуют профили, различные у разных видов (вариантов) микроорганизмов.

2. **Полиморфизм длины амплифицированных фрагментов (ПДАФ, англ. — AFLP).** В отличие от предыдущего метода рестрикцию проводят до ПЦР. ДНК микроорганизма с использованием рестриктазы нарезают на фрагменты, затем проводят ПЦР. В результате образуются фрагменты различного размера, которые при проведении электрофореза образуют профили, различные у разных видов (вариантов) микроорганизмов.

3. **Полиморфизм конформации однонитевой ДНК (ПЦР-SSCP).** Используют для выявления точечных мутаций в ДНК. Проводят асимметричную ПЦР, что сопровождается накоплением однонитевых молекул ДНК, которые разделяют при помощи электрофореза в денатурирующем геле, позволяющем разделять фрагменты, отличающиеся друг от друга одним нуклеотидом.

V. Методы, основанные на определении последовательности нуклеотидов в ДНК, РНК и аминокислот в белках.

Секвенирование — метод, позволяющий определять последовательность нуклеотидов: аденина, тимина, гуанина, цитозина — в молекуле ДНК. Использование этого метода расширило возможности биологии и позволило секвенировать геномы человека, животных, растений, микроорганизмов (бактерий, вирусов, грибов).

Цели секвенирования:

1) расшифровка генома — определение количества генов, их протяжённости, локализации, функций;

2) идентификация неизвестных микроорганизмов путем сравнения нуклеотидной структуры некоторых их генов с соответствующими последовательностями известных видов;

3) определение мутаций в генах для выявления резистентных микроорганизмов и изучения молекулярных механизмов устойчивости;

4) эпидемиологические исследования (определение генетических различий штаммов одного вида, выделяемых в разное время и из разных ис-

точников, что необходимо для определения связей между циркулирующими в различных регионах и стационарах микроорганизмов). Важны для выявления источников и механизмов распространения микроорганизмов, а также механизмов развития эпидемий;

5) выявления направлений эволюции микроорганизмов. На основании секвенированных последовательностей строят дендрограммы, позволяющие оценивать сходство микроорганизмов и их происхождение.

Этапы секвенирования:

1. *Проведение ПЦР.* Позволяет получить множественные копии небольших фрагментов ДНК размером от 300 до 1000 нуклеотидов. Секвенирование больших фрагментов затруднено, так как при проведении их электрофореза невозможно выявить фрагменты, отличающиеся одним нуклеотидом.

2. *Очистка амплифицированных фрагментов ДНК.* Проводят очистку ампликонов от шлаков — остатков ПЦР-реакции (праймеров, несвязавшихся нуклеотидов).

3. *Секвенирование* включает ряд последовательных стадий (рис. 37):

а) приготовление реакционной смеси, которая содержит:

- изучаемую ДНК;
- праймер;
- ДНК-полимеразу и буфер для неё;
- дезоксинуклеотидтрифосфаты (дАТФ, дТТФ, дГТФ, дЦТФ);
- меченные флуоресцентной меткой дидезоксинуклеотиды, которые

обрывают синтез цепочки ДНК, так как лишены 3'-ОН группы, необходимой для образования мостика между двумя нуклеотидами;

б) проведение реакции ПЦР-секвенирования;

С помощью флуоресцентно меченых терминаторов синтеза ДНК-цепи получают множество фрагментов ДНК, синтез которых оборван на аденине, тимине, гуанине, цитозине. Количество получаемых фрагментов ДНК равно сумме А, Т, Г, Ц, присутствующих в секвенируемом фрагменте.

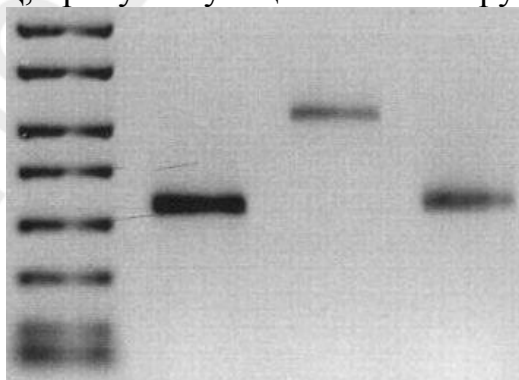


Рис. 37. Электрофореграмма ампликонов, образуемых в ПЦР

в) секвенирующий электрофорез в денатурирующем полиакриламидном геле для разделения ампликонов, отличающихся размерами в один нуклеотид (рис. 38);

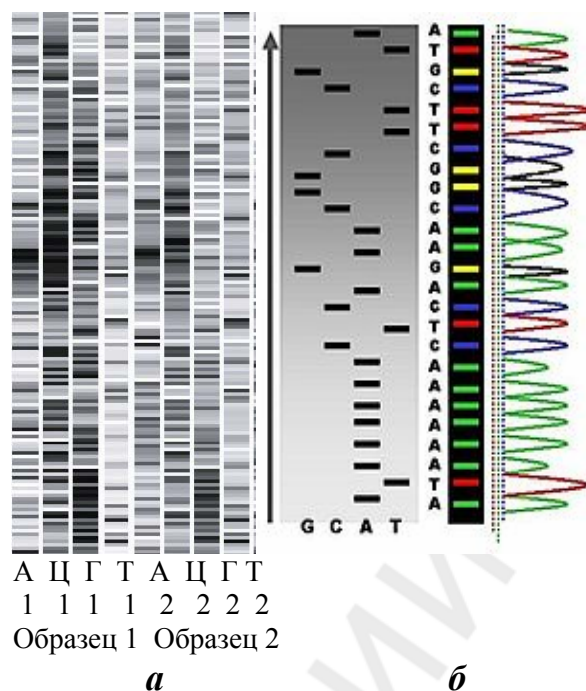


Рис. 38. Результаты секвенс-электрофореза: а — электрофореграмма; б — схема

г) получение линейного символьного описания первичной структуры молекулы ДНК (рис. 39).

```

Query 1      GGCACGAGCCAGCTGAGCCAATTCATGGACCAGAACCAACCCGCTGTCCGGGGTTGACCCGAC 60
          |||||
Sbjct 762388 GGCACGAGCCAGCTGAGCCAATTCATGGACCAGAACCAACCCGCTGTCCGGGGTTGACCCAC 762447

Query 61     AAGCGCCGACTGTCTG 75
          |||||
Sbjct 762448 AAGCGCCGACTGTCTG 762462
  
```

Рис. 39. Линейное символьное описание первичной структуры секвенированной молекулы ДНК (приведен пример гена, кодирующего РНК-полимеразу *Mycobacterium tuberculosis*)

4. *Биоанализ первичной структуры секвенированного фрагмента ДНК с помощью компьютерных программ для получения необходимой информации.* Обычно используют программу BLAST, доступ к которой открыт через сервер <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>. Программа путем сравнения с международным банком геномов определяет вид гена и микроорганизм, которому принадлежит этот ген. Например, в результате секвенирования определена следующая последовательность нуклеотидов в генетическом фрагменте: «GGC ACG AGC CAG CTG AGC CAA TTC ATG GAC CAG AAC AAC CCG CTG TCG GGG TTG ACC GAC AAG CGC CGA». Данный фрагмент загружают в программу BLAST, осуществляющую сравнение с геномами микроорганизмов в международном банке

геномов. Программа идентифицировала данный фрагмент как генов ген *Mycobacterium tuberculosis*. Программа BLAST позволяет выявить мутации в генах (рис. 40), обеспечивающие антибиотикорезистентность.

Кодоны	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529
H37RV	GGC	ACC	AGC	CAG	CTG	AGC	CAA	TTC	ATG	GAC	CAG	AAC	AAC	CCG	CTG	TCG	GGG	TTG	ACC	CAC	AAG	CGC	CGA
455	GGC	<u>ACG</u>	AGC	CAG	CTG	AGC	CAA	TTC	ATG	GAC	CAG	AAC	AAC	CCG	CTG	TCG	GGG	TTG	ACC	<u>GAC</u>	AAG	CGC	CGA
443	GGC	ACC	AGC	<u>GAG</u>	CTG	AGC	CAA	TTC	ATG	GAC	CAG	AAC	AAC	CCG	CTG	TCG	GGG	TTG	ACC	<u>GAC</u>	AAG	CGC	CGA

Рис. 40. Сравнение первичной структуры секвенированного генов гена у контрольного штамма *Mycobacterium tuberculosis* H37RV и 2 штаммов микобактерий (№ 455 и № 443), выделенных от больных с множественно резистентным туберкулезом

Недостатки секвенирования:

1) позволяет секвенировать фрагменты размером 300–1000 нуклеотидов, при этом первые 15–40 и последние 700–900 нуклеотидов распознаются плохо;

2) методы секвенирования ДНК пока недоступны для практических лабораторий, так как требуют дорогостоящего оборудования, дорогостоящих реагентов.

Другие варианты секвенирования. *Крупномасштабное секвенирование*, позволяющее секвенировать большие фрагменты ДНК, например, целую хромосому микроорганизмов. ДНК нарезают на фрагменты при помощи рестриктаз. Эти небольшие фрагменты при помощи вектора переносят в *Escherichia coli* (клонировать). Микроорганизмы, размножаясь приводят к накоплению клонированной ДНК (клональная амплификация). Далее все разновидности клонированных фрагментов ДНК секвенируют и при помощи компьютера собирают в единую длинную цепочку. Такой подход не требует предварительной информации об изучаемой ДНК, поэтому относится к секвенированию *de novo*.

Секвенирование с использованием гибридизации. В его основу положены гибридизационные биочиповые технологии. При этом неизвестная ДНК обрабатывается флуоресцентным красителем и наносится на чип с большим количеством зондов разной специфичности, находящихся в разных участках чипа. Тот участок чипа, где отмечается сильная флуоресценция, свидетельствует о комплементарности зонда и изучаемой ДНК, что позволяет, зная характер зонда, идентифицировать ДНК.

Микрожидкостное секвенирование по Сенджеру. Проводится с использованием всех стадий секвенирования по Сенджеру: ПЦР, очистки продуктов амплификации, электрофореза. Реакцию осуществляют в специальных чипах, при этом объем реакции измеряется в нанолитриях, что способствует меньшему расходу дорогостоящих реагентов. Чип состоит из трех функциональных частей: 1) камеры для ПЦР; 2) камеры для очистки ампликонов; 3) камеры для капиллярного электрофореза (капилляр имеет длину 30 см и компактно скручен).

VI. Методы, основанные на модификации генетической информации. Эта группа методов используется для определения структуры и функций генов. Модификация генетической информации приводит к утрате или приобретению генов, что сопровождается изменением фенотипа. Заключение о функции гена делают на основании результатов сравнительного изучения фенотипических признаков, присущих исходному и генетически модифицированному микроорганизму.

1. **Конъюгация.** Используют для картирования генома — определения местоположения генов и расстояния между ними. Способность к конъюгации клеток определяется присутствием плазмиды фертильности — F-плазмиды, которая кодирует конъюгативные пили. F плазида может интегрировать в бактериальную хромосому, и в таком состоянии носит название **Hfr**. После образования конъюгационной пары, Hfr-фактор инициирует перенос копии бактериальной хромосомы донора в реципиентную клетку, при этом в последнюю очередь переносится в составе бактериальной хромосомы Hfr-фактор. Так как перенос всей хромосомы продолжается при 37 °С около 100 мин, то прерывая конъюгацию в разное время, можно определить какие гены и в какой последовательности попадают в клетку реципиента. Впервые метод использован Жакобом и Вольманом в 1964 г. для построения генетической карты *E. coli* (рис. 41).

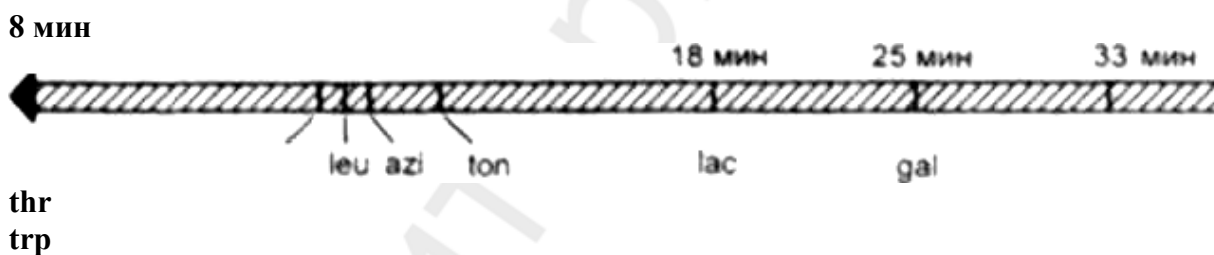


Рис. 41. Первая карта участка хромосомы *E. coli*, построенная на основании определения времени переноса соответствующего гена из донорской клетки в реципиентную

Постановка опыта конъюгации. Для постановки классического опыта конъюгации используют взаимно дополняющие друг друга по двум признакам донорский и реципиентный штаммы *E. coli* (табл. 15). Бульонные культуры донора и реципиента объемом 0,5 мл смешивают, смесь инкубируют 30 мин при 37 °С. Для выделения рекомбинантных клеток, смесь высевают на минимальную (глюкозосолевою) среду со стрептомицином. В качестве контроля на среду засевают донорский и реципиентный штаммы, которые не способны расти на ней, так как первый штамм чувствителен к стрептомицину, а второй — не синтезирует лейцин. После подсчёта выросших колоний рекомбинантов определяют частоту рекомбинаций, равную отношению количества рекомбинантных клеток к реципиентным.

Таблица 15

Характеристика штаммов *E. coli*, участвующих в процессе конъюгации

Свойства	E. coli		
	донор (F ⁺ , leu ⁺ , str ^s)	реципиент (F ⁻ , leu ⁻ , str ^r)	рекомбинант (F ⁺ , leu ⁺ , str ^r)
Наличие F-плазмиды	Да	Нет	Да
Синтез лейцина	Да	Нет	Да
Устойчивость к стрептомицину	Нет	Да	Да
Рост на минимальной среде (без лейцина) со стрептомицином	Нет	Нет	Да

2. **Трансдукция** — горизонтальный перенос генов от донора к реципиенту умеренными бактериофагами.

Для доказательства существования трансдукции может быть приведен опыт по горизонтальному переносу от донора к реципиенту генов β-галактозидазного оперона, контролирующего расщепление лактозы у E. coli. Для проведения опыта необходимы:

- реципиент — штамм E. coli, лишенный β-галактозидазного оперона (E. coli lac⁻), на среде Эндо образует бесцветные колонии;
- трансдуцирующий фаг — фаг (λ dgal), в геноме которого часть генов замещена генами β-галактозидазного оперона E. coli. Концентрация фага — 10⁶–10⁷ частиц в 1 мл;
- селективная среда Эндо, на которой лактозоотрицательные колонии бесцветны, а лактозоположительные колонии — ярко-малиновые, с металлическим оттенком.

Постановка опыта трансдукции. Смешивают по 1 мл трехчасовой бульонной культуры реципиента и трансдуцирующего фага. Смесь инкубируют 60 мин при +37 °С, готовят серию десятикратных разведений. Из пробирки с разведением 10⁻⁶ по 0,1 мл культуры высевают на среду Эндо и инкубируют в течение суток. Рекомбинантные клетки растут с образованием малиновых с металлическим оттенком колоний. Частота трансдукций равна отношению количества клеток рекомбинантов к числу реципиентов.

3. **Трансформация** — горизонтальный перенос генов от донора к реципиенту через внешнюю среду; осуществляемый после гибели бактерий-доноров.

Для проведения опыта необходимы следующие материалы:

- реципиент — штамм Bacillus subtilis (str^s), чувствительный к стрептомицину;
- ДНК донора — выделяют из штамма B. subtilis (str^r), устойчивого к стрептомицину;
- селективная среда — МПА со стрептомицином.

Постановка опыта трансформации. Смешивают по 1 мл бульонной культуры B. subtilis и ДНК донора. Инкубируют 30 мин при +37 °С, и высевают на МПА и МПА со стрептомицином. Рекомбинантные штаммы

способны расти на селективной среде со стрептомицином. Частота трансформаций равна отношению количества рекомбинантных клеток к реципиентным.

4. Сайт-специфический мутагенез — это совокупность молекулярно-генетических методов, которые позволяют создавать мутации в определенном участке ДНК. Для этого метода необходимо знание первичной структуры исследуемой ДНК, т. е. она должна быть секвенирована. Метод впервые описан в 1978 г. Микаэлем Смитом, который в 1993 г. получил Нобелевскую премию.

Этапы сайт-специфического мутагенеза:

а) *создание множественных мутантных копий изучаемого гена при помощи ПЦР. Мутантные копии гена получают путем введения мутантных последовательностей в состав праймера, поэтому образуемые в ПЦР копии гена несут известную мутацию (например, чувствительность к ампициллину);*

б) *внесение полученных копий мутантного гена в клетку-реципиент с помощью плазмидного вектора с двойной фенотипической меткой (например, генами устойчивости к тетрациклину и ампициллину). Изучаемый клонированный ген вводят в плазмидный вектор в месте нахождения гена устойчивости к ампициллину. Плазмидный вектор используют в качестве средства доставки клонированного гена в реципиентную клетку. Доставка осуществляется путем электропорации (трансформации под действием мощного электрического разряда) реципиентных клеток.*

В случае успешно проведенного клонирования реципиентные клетки проявляют чувствительность к ампициллину и приобретают устойчивость к тетрациклину;

в) *селекция мутантов с помощью метода реплик и использования сред с ампициллином и тетрациклином.*

5. Методы селекции мутантов. Для выделения мутантов используют:

а) *посев на минимальные среды, лишённые одного из ростовых компонентов. На этих средах растут микроорганизмы, способные синтезировать недостающий компонент;*

б) *посев на селективные среды, содержащие ингибирующие добавки, способствующие избирательному росту устойчивых к ним микроорганизмов. В качестве ингибирующих добавок могут выступать антибиотики, соли, анилиновые красители, желчные кислоты. На этих средах растут микроорганизмы, обладающие факторами устойчивости к ингибирующему агенту;*

в) *посев методом реплик одновременно большого количества изучаемых микроорганизмов (25, 50, 96 культур) при помощи штампа-репликатора. Этапы метода реплик:*

– *внесение тест-культур в лунки донышка штампа-репликатора;*

- инокуляция штифтов штампа репликатора тест-культурами (штифты опускают в лунки);
- посев на среду методом отпечатков;
- культивирование и учет результатов (рис. 42). На простой ростовой среде вырастают все микроорганизмы, в то время как на селективной среде — только мутантные, устойчивые к ингибирующему агенту;

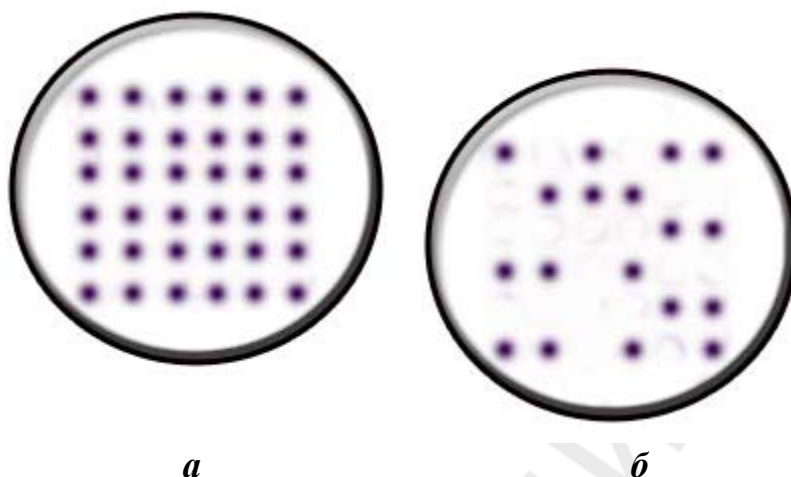


Рис. 42. Метод реплик для селекции мутантов:

a — рост тест-микроорганизмов на простой среде; *б* — рост мутантных микроорганизмов, устойчивых к ингибирующему агенту, на селективной среде

г) *использование биосенсоров* — молекул-репортеров, которые сообщают о присутствии микроорганизма, его антигенов, метаболитов и т. д.

Оценка молекулярно-генетических методов

Преимущества молекулярно-генетических методов:

1. *Высокая специфичность.* Эти методы позволяют выявлять уникальные, характерные только для определенного вида микроорганизмов участки ДНК/РНК. Специфичность задаётся нуклеотидной последовательностью специфических праймеров.

2. *Высокая чувствительность.* Позволяют выявлять микроорганизмы, присутствующие даже в небольшом количестве (10–1000 клеток в пробе), в то время как чувствительность других методов колеблется в пределах 10^3 – 10^5 клеток. Эти методы оказываются эффективными, даже когда микроорганизмы присутствуют в крайне низкой концентрации, например, на ранних стадиях заболеваний или при исследованиях донорской крови/органов.

3. *Возможность осуществлять диагностику инфекций и инвазий, распознавание которых затруднено, с использованием микроскопического, бактериологического методов.* Молекулярно-генетические методы позволяют идентифицировать микроорганизмы:

- некультивируемые (*Mycobacterium leprae*, *Helicobacter pylori*, вирусы папилломы человека, гепатита С, герпеса) или труднокультивируемые (*Treponema pallidum*);
- чрезвычайно чувствительные к условиям взятия клинического материала, транспортировки и культивирования (пневмококки, гемофилы, нейссерии, микоплазмы, облигатные анаэробы);
- способные к размножению *in vitro* только в культуре клеток (вирусы, хламидии, риккетсии);
- медленно растущие на искусственных средах (микобактерии, лептоспиры, грибы);
- трудно идентифицируемые классическими методами (нокардии, актиномицеты);
- находящиеся в полимикробных сообществах (микрофлора кишечника, зубной налет).

4. *Возможность использования для экспресс-диагностики.* Генетические методы позволяют обнаружить микроорганизмы в исследуемом материале без выделения их чистых культур, поэтому являются методами экспресс-анализа. Кроме того, большинство используемых методик позволяют получить результат в течение нескольких часов.

5. *Возможность полной автоматизации и высокая производительность.* С помощью молекулярно-генетических методов можно параллельно анализировать большое количество образцов. В последнее время появляются станции, в которых автоматизированы процесс выделения ДНК и приготовление реакционной смеси.

6. *Низкая вероятность инфицирования персонала в процессе проведения исследований.* Для получения результатов не требуется присутствия живого возбудителя, поэтому исследуемый материал может быть дезинфицирован химической или термической обработкой в момент его взятия.

Недостатки молекулярно-генетических методов:

1. *Отсутствие международных протоколов* по молекулярно-генетической диагностике различных нозологических форм заболеваний.

2. *Необходимость разработки новых подходов к клинической интерпретации получаемых результатов.* В этиологической диагностике заболеваний в настоящее время по-прежнему существуют «золотые стандарты», в основу которых положены культуральный или микроскопический методы исследования. Для постановки этиологического диагноза необходимы положительные результаты культурального и микроскопического методов, результаты молекулярно-генетических методов в настоящее время оцениваются как ориентировочные.

Следует помнить, что выявление в клинических образцах ДНК сапрофитных и условно-патогенных микроорганизмов может не означать наличия патологического процесса и поэтому не может быть автоматически

интерпретировано как диагноз, особенно на фоне благополучной клинической картины у пациента.

По этой же причине следует с осторожностью использовать молекулярно-генетические методы для анализа образцов с полимикробным сообществом (испражнения, материал из верхних дыхательных путей, материал из гениталий).

3. *Высокая стоимость оборудования.* Для проведения молекулярно-генетических исследований необходимо комплексное оснащение лаборатории, включающее термоциклер, устройство для ДНК-электрофореза, трансиллюминатор, шейкеры, центрифуги, холодильники, дозаторы, секвенатор, гибридизационную камеру и другое оборудование.

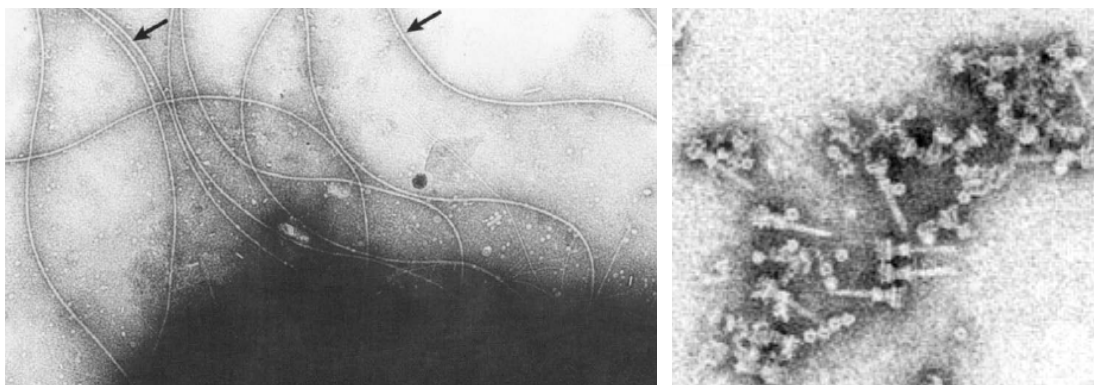
Определение факторов патогенности бактерий

1. **Белки фимбрий, адгезины, компоненты секреторной системы** изучают следующим образом:

- клетки дезинтегрируют ультразвуком;
- белки осаждают;
- проводят диализ для освобождения от балласта;
- выделяют очищенный белок при помощи жидкостной хроматографии;
- проводят электрофорез в полиакриламидном геле;
- идентифицируют белок с использованием биомаркеров (меченых поликлональных антител);
- изучают белок: определяют молекулярную массу методом масс-спектрометрии, 3D-структуру методом рентгеноструктурной кристаллографии.

2. **Фимбрии** выявляют с помощью:

- негативного контрастирования с последующей электронной микроскопией (рис. 43);
- изучения адгезии к поверхности культур клеток Her2 и др.;
- постановки маннозозависимой реакции гемагглютинации с эритроцитами разных видов животных: при добавлении эритроцитов к суспензии бактерий в присутствии 1%-ного раствора D-маннозы происходит склеивание эритроцитов с образованием «зонтика».



a

б

Рис. 43. Негативное контрастирование и электронная микроскопия для выявления:
a — жгутиков, пилей, фимбрий; *б* — инъектосомы 3-й секреторной системы

3. **Гены, кодирующие бактериальные гликаны** (пептидогликан, капсульные полисахариды, липополисахариды, системы гликозилирования белков), определяют с помощью сравнительного компьютерного анализа секвенированного генома микроорганизма и геномов хорошо изученных микроорганизмов. Функции генов подтверждают клонированием этих генов в *E. coli* или нокаутируют эти гены с использованием сайт-специфического мутагенеза.

4. **Поверхностные структуры клеточной стенки** изучают с помощью сканирующей атомно-силовой микроскопии высокого разрешения (рис. 44).

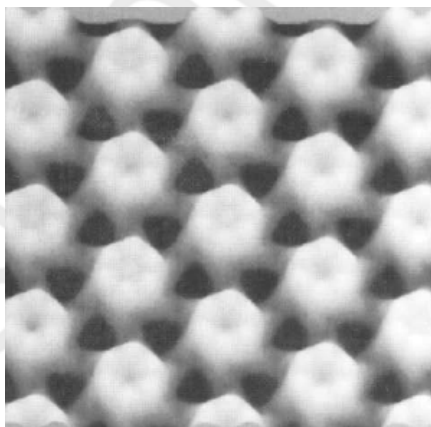


Рис. 44. Сканирующая электронная микроскопия для определения топографии поверхности бактерий

5. Капсула.

Наличие капсулы определяют окраской по Бурри–Гинсу (негативное контрастирование), по Книге, в реакции иммунного набухания.

Химический состав капсулы и других гликанов определяют путем разделения компонентов с использованием жидкостной хроматографии или капиллярного электрофореза, затем идентифицируют компоненты масс-спектрометрией.

Серологические варианты капсульных антигенов или ЛПС выявляют в серологических реакциях (реакции агглютинации, реакции латекс-агглютинации).

Патогенные свойства капсулы определяют путем введения капсульного вещества лабораторным животным (биологический метод), что может индуцировать образование абсцессов.

6. Токсигенность — свойство бактерий продуцировать и выделять во внешнюю среду экзотоксины (дифтерийный, ботулинистический, токсин *Clostridium difficile*, холерный, стафилококковый и др.), играющие решающую роль в развитии заболеваний.

Если существует несколько серологических вариантов экзотоксина, то определяют его серотип. Определение серотипа токсина имеет важное значение для назначения адекватной серотерапии (лечения сыворотками). Так, при ботулизме определение типа токсина позволяет использовать мновалентную сыворотку и сокращает количество чужеродного лошадиного белка, вводимого в организм. Серотипы экзотоксинов выявляют с использованием одного из следующих методов:

- ИФА;
- реакции преципитации;
- реакции обратной пассивной гемагглютинации;
- иммунохроматографии с использованием антител, меченных коллоидным золотом;
- реакции нейтрализации на животных или в культуре клеток.

7. Изучение неизвестных токсинов и других факторов патогенности микроорганизмов, механизмы действия которых недостаточно изучены.

Локализацию определенных белков в поверхностных образованиях бактерий определяют иммуноцитохимическим методом. При этом бактерии обрабатывают антителами, мечеными коллоидным золотом, а затем исследуют в электронном микроскопе (рис. 45). Золотая метка создает контрастную тень в месте связывания с бактериальными компонентами.

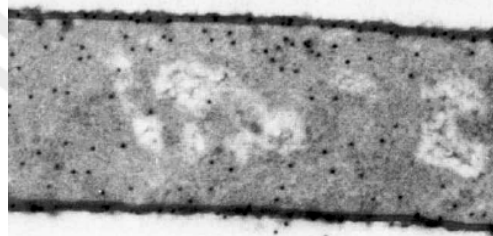


Рис. 45. Иммуноцитохимическое выявление амидазы *B. subtilis* с использованием антител, меченных коллоидным золотом и электронной микроскопии

Для выявления факторов вирулентности мало изученных возбудителей проводят 2D-электрофорез в геле разрушенных ультразвуком вирулентных и авирулентных форм микроорганизмов, относящихся к одному виду (рис. 46, а, б). Затем сравнивают электрофореграммы и определяют

расхождения между ними. Белки, присутствующие только у вирулентных микроорганизмов, секвенируют. Прогнозируют ген, кодирующий секвенированный белок. Проводят поиск гена в геноме бактерии, клонируют его в *E. coli*, выделяют белок с использованием жидкостной хроматографии или капиллярного электрофореза, изучают структуру методами масс-спектрометрии, рентгеноструктурной кристаллографии (рис. 47). Аналогичным образом можно изучать не только клеточные лизаты бактерий, но и секретируемые в культуральную жидкость белки и токсины, для чего проводят 2D-электрофорез безмикробной культуральной жидкости. Кроме того, можно не выделять отдельные белки, так как использование масс-спектрометрии позволяет идентифицировать множество пептидов, находящихся в смеси.

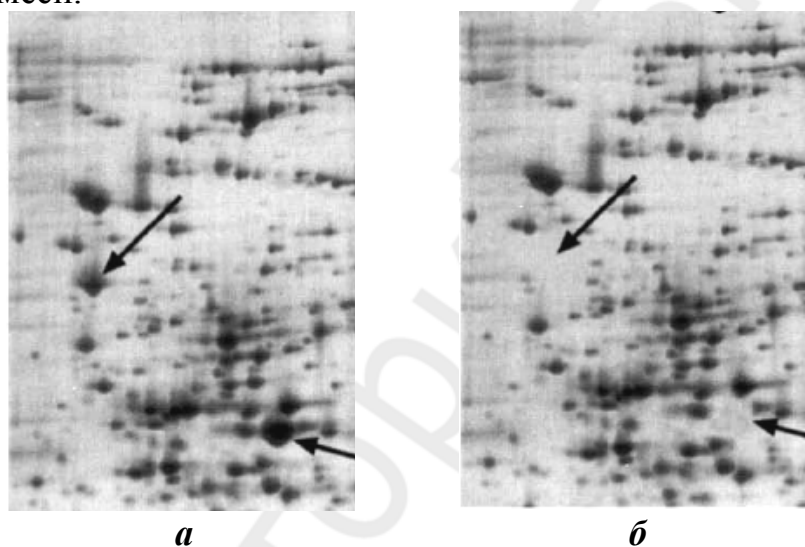


Рис. 46. Сравнительный 2D-электрофорез вирулентных (а) и авирулентных (б) форм одного вида микроорганизмов (стрелками обозначены белки, присутствующие только у вирулентных форм)

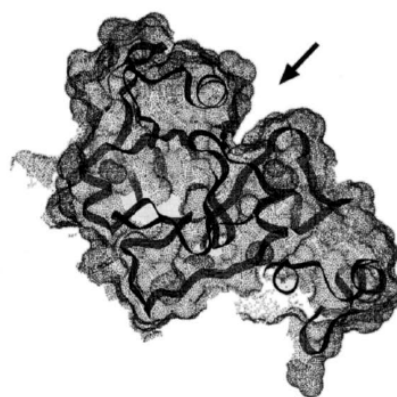


Рис. 47. 3D-структура белков вирулентных форм микроорганизмов

Для выявления эффектов, оказываемых токсинами на клетки или ткани, проводят эксперименты на культуре клеток и лабораторных животных.

8. **Определение ферментов обмена веществ и ферментов-токсинов** (см. определение биохимических свойств микробов — гемолизинов, лецитиназы, протеаз, липаз, плазмокоагулазы и др.).

9. Для выявления **сенсibilизации** к микробным аллергенам ставят кожно-аллергические пробы (например, пробу Манту).

10. Для выявления **протективных антигенов** (пептидов, приводящих к формированию противоинфекционного иммунитета) проводят сравнительный анализ геномов микроорганизмов и определяют спектр генов, которые потенциально могут кодировать протективные антигены. Эти гены клонируют в *E. coli*, клонированные белки выделяют и изучают их иммуногенные свойства на лабораторных животных, проводят селекцию наиболее иммуногенных пептидов, которые могут стать компонентом вакцин.

Однако следует помнить, что не всегда патогенность возбудителя, выявляемая *in vitro*, соответствует реакциям, реализуемым возбудителем *in vivo*. Это связано с различием экспрессии генов в разных условиях микроокружения. Молекулярно-генетические методы открыли новые возможности в изучении основных клеточных молекул. Зная геномы и протеомы возбудителей, человек получил возможность проникнуть еще глубже в понимание организации живого. Несмотря на это, пока не были сделаны глобальные открытия, позволяющие контролировать вирулентные свойства микробов, предотвращая развитие заболеваний.

Методы изучения чувствительности бактерий к антибиотикам

Эмпирическое назначение антибиотиков основано на знаниях о природной чувствительности бактерий к антибиотикам, эпидемиологических данных о резистентности микроорганизмов в регионе или стационаре. Несомненным преимуществом эмпирической антимикробной терапии является незамедлительное начало ее проведения.

Однако из-за формирования резистентности у микроорганизмов этиотропная антибиотикотерапия может быть неэффективной. Поэтому важно проводить **этиотропное назначение антибиотиков**, основанное на выделении возбудителя инфекции из клинического материала и определении его чувствительности к антибиотикам (табл. 16).

Определение антибиотикорезистентности проводят согласно утвержденным документам — стандартам или приказам, которые регламентируют процедуру определения антибиотикорезистентности микроорганизмов. В Республике Беларусь существует приказ Министерства здравоохранения по определению антибиотикорезистентности, в Америке и Европе — стандарты Комитета по клиническим лабораторным стандартам (NCCLS).

**Классификация методов определения чувствительности
микроорганизмов к антибиотикам**

Критерий метода	Методы
Подход	Генотипические: – ПЦР4 – ПЦР–ПДРФ; – ДНК-гибридизация; – секвенирование
	Фенотипические: – диффузионные методы (диско-диффузионный); – методы разведений (в агаре, в бульоне) ; – комбинированные (Е-тест)
Быстрота получения результатов	Ординарные (обычные)
	Ускоренные
	Автоматизированные

ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ

Минимальная ингибирующая (подавляющая) концентрация (МИК) — наименьшая концентрация антибиотика, которая подавляет видимый рост исследуемого микроорганизма *in vitro* (в бульонных или на агаровых питательных средах) в стандартных условиях постановки опыта и выражается в мкг/мл (мг/л) или ед/мл.

Минимальная бактерицидная концентрация (МБК) — наименьшая концентрация антибиотика, которая при исследовании *in vitro* вызывает гибель 99,9 % микроорганизмов от исходного уровня в течение определённого периода времени.

Чувствительный микроорганизм — штамм, который не имеет механизмов резистентности к данному препарату. Его рост на питательной среде прекращается при использовании антибиотика в терапевтической дозе.

Умеренно-резистентный микроорганизм — штамм, рост которого на питательной среде прекращается только при использовании антибиотика в высшей дозе. Лечение инфекций, вызываемых умеренно-резистентными микроорганизмами, проводится при отсутствии альтернативных препаратов, высшей (максимальной терапевтической) дозой антибиотика.

Резистентный микроорганизм — штамм, который имеет механизмы устойчивости к данному препарату. Его рост на питательной среде прекращается лишь при использовании очень высоких концентраций препарата, которые нельзя создать в организме из-за их высокой токсичности. При лечении инфекций, вызванных этим микроорганизмом, клинический эффект от терапии отсутствует даже при использовании высшей дозы антибиотика. При этом могут наблюдаться побочные действия антибиотика.

Показания к определению чувствительности микроорганизмов к антибиотикам:

1) определение чувствительности к новому антибиотику, рекомендуемому к применению;

2) периодический мониторинг антибиотикорезистентности в отдельных медицинских центрах и в различных географических регионах с целью наблюдения за распространением устойчивости к антибиотикам;

3) обоснование адекватной антибиотикотерапии у отдельных больных в случаях:

а) выделения микроорганизмов из первично стерильных жидкостей, органов и тканей человека;

б) при выделении микроорганизмов из первично нестерильных биотопов, оценке чувствительности должна предшествовать оценка клинической значимости выделенного микроорганизма;

в) инфекций, резистентных к препаратам эмпирической терапии;

г) уникальных инфекций и отсутствии опыта их терапии;

д) инфекций, требующих пролонгированной терапии (каждую неделю лечения проводят детекцию антибиотикорезистентности, так как возможна смена возбудителей).

Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам нецелесообразно:

1) для представителей нормальной микрофлоры человека, при их выделении из естественных мест обитания;

2) для видов микроорганизмов, у которых не описано резистентных форм к тем или иным антибиотикам. Например, *Streptococcus pyogenes* чувствительны к пенициллину, поэтому проводить определение чувствительности к этим препаратам в повседневной практике нецелесообразно.

Выбор антибиотиков, подлежащих тестированию. В исследования включают антибиотики, обладающие природной активностью в отношении выделенных микроорганизмов с клинически подтвержденной эффективностью при соответствующих инфекциях.

В перечень антибиотиков могут быть включены 1–2 дополнительных препарата по запросу лечащего врача, либо при появлении новых более эффективных средств.

Этапы тестирования чувствительности микроорганизмов к антибиотикам:

1. Выделение чистой культуры микроорганизмов и приготовление суспензии микроорганизмов. Прямое определение чувствительности без выделения чистой культуры возможно только в исключительных случаях, при этом исследование следует повторить после выделения чистой культуры микроорганизма.

2. Приготовление среды.

3. Инокуляция среды микроорганизмами.

4. Инкубация.

5. Учет результатов, анализ, формулирование рекомендаций по лечению.

6. Периодический контроль качества тестирования с использованием штаммов из международных коллекций микроорганизмов.

ДИСКО-ДИФФУЗИОННЫЙ МЕТОД

Характеристика метода. Полуколичественный. Определяет группы антибиотиков, активных в отношении патогена.

Особенности метода. Используют стандартные диски диаметром 6,25 мм, представляющие собой фильтровальный картон, пропитанный антибиотиком в определенной концентрации.

Техника проведения. Готовят суспензию тест-микроорганизмов в концентрации $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл, наносят ее в объеме 1 мл на чашку Петри со средой Мюллера–Хинтона или АГВ (толщина слоя среды — $4 \pm 0,5$ см). Суспензию распределяют равномерно по поверхности, избыток суспензии удаляют, поверхность среды высушивают, наносят на среду диски на расстоянии 2 см друг от друга и от края, но не более 6 на чашку Петри, инкубируют при 35 °С 18–24 ч. Можно использовать специальный диспенсер для одновременного нанесения 6 дисков.

Принцип учета. Антибиотик из диска центробежно диффундирует в среду, в месте его действия микроорганизмы погибают, образуя концентрическую зону задержки роста. В остальных участках среды микроорганизмы беспрепятственно растут.

Оценка чувствительности. Определяют диаметр зон задержки роста в мм и сравнивают со стандартными величинами зон задержки роста, на основании чего относят микроорганизмы к чувствительным, умеренно чувствительным или резистентным (рис. 48).

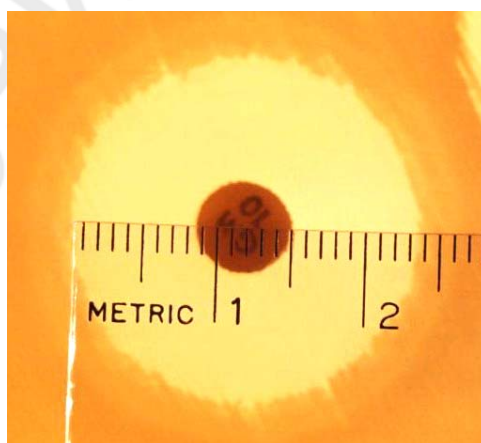


Рис. 48. Диаметр зоны задержки роста пропорционален антибиотикочувствительности микроорганизма

Оценка метода. Простой, нетрудоемкий, относительно дешевый, обладает высокой воспроизводимостью. Основной метод в клинических лабораториях для нетребовательных микроорганизмов.

МЕТОД РАЗВЕДЕНИЙ В АГАРЕ

Характеристика метода. Количественный. Определяет активные препараты и их ингибирующие концентрации.

Особенности метода. Готовят 8–12 серийных двукратных разведений антибиотика в агаре Мюллера–Хинтона.

Техника проведения. Готовят суспензию тест-микроорганизмов в концентрации 10^7 КОЕ/мл и инокулируют по 1–2 мкл (посевная доза $1-2 \times 10^4$) на среды в чашках Петри с последовательными двукратными концентрациями антибиотика, инкубируют при $35\text{ }^\circ\text{C}$ 18–24 ч. Культуры могут наносить на среду в чашках Петри штампом-репликатором, что позволяет одновременно изучать до 100 культур.

Принцип учета. Микроорганизмы растут на среде, если концентрация антибиотика ниже ингибирующей и не растут — если больше.

Оценка чувствительности. Определяют МИК антибиотика для тест-культуры и сравнивают со стандартными величинами МИК. Относят тест-культуру к чувствительным, умеренно чувствительным или резистентным микроорганизмам.

Оценка метода. Метод трудоемкий, требует затрат большого количества сред, посуды, времени. Основной метод регионального или национального мониторинга антибиотикорезистентности.

МЕТОД РАЗВЕДЕНИЙ В ЖИДКИХ СРЕДАХ

Характеристика метода. Количественный. Определяет активные препараты и их ингибирующие концентрации.

Особенности метода. Готовят 8–12 серийных двукратных разведений антибиотика в пробирках с бульоном Мюллера–Хинтона.

Техника проведения. Готовят суспензию тест-микроорганизмов 10^6 КОЕ/мл, вносят суспензию в соотношении 1:1 в бульон Мюллера–Хинтона с различными концентрациями антибиотика (посевная доза 5×10^5), инкубируют при $35\text{ }^\circ\text{C}$ 18–24 ч.

Принцип учета. Микроорганизмы растут на среде, вызывая ее помутнение, если концентрация антибиотика ниже ингибирующей, и не растут — если больше (среда прозрачна).

Оценка чувствительности. Определяют МИК тест-культуры и сравнивают со стандартными величинами МИК. Относят тест-культуру к чувствительным, умеренно чувствительным или резистентным микроорганизмам.

Оценка метода. Метод трудоемкий, требует затрат большого количества сред, посуды, времени. Основной метод регионального или национального мониторинга антибиотикорезистентности.

Е-ТЕСТ (ЭПСИЛОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД)

Характеристика метода. Количественный. Определяет активные препараты и их ингибирующие концентрации.

Особенности метода. Используют стандартные пластиковые полоски с нанесенным на них экспоненциально убывающим градиентом концентрации антибиотика, например от 256 до 0,016 мкг/мл.

Техника проведения. Готовят суспензию тест-микроорганизмов в концентрации 10^8 КОЕ/мл, погружают в нее стерильный тампон, равномерно штриховыми движениями распределяют суспензию по поверхности среды Мюллера–Хинтона или АГВ ($\text{pH } 7,2 \pm 0,1$), поверхность среды высушивают. На чашку диаметром 90 мм наносят не более 2 полосок Е-теста (на чашку диаметром 150 мм — не более 6), инкубируют при 35°C 16–18 ч.

Принцип учета. Антибиотик из Е-теста центробежно диффундирует в среду, в месте его активного действия рост микроорганизмов подавляется и образуется эллипсоидная (каплевидная) зона задержки роста. Так как концентрация антибиотика в полоске убывает, то получается не концентрическая, а эллипсоидная зона задержки роста. Место пересечения основания эллипса со шкалой концентраций Е-теста соответствует МИК антибиотика (рис. 49).



Рис. 49. Метод Е-тестов

Оценка чувствительности. Ингибция роста микроорганизма вокруг полоски-носителя происходит только в той зоне, где концентрация антибиотика выше МИК. Определяют МИК тест-культуры и сравнивают со стандартными величинами МИК. Относят тест-культуру к чувствительным, умеренно чувствительным или резистентным.

Оценка метода. Простой, нетрудоемкий, позволяет тестировать привередливые микроорганизмы (стрептококки, пневмококки, гемофилы, гонококки, анаэробы). Не получил широкого распространения из-за дороговизны.

УСКОРЕННЫЙ МЕТОД

Характеристика метода. Полуколичественный или количественный. Позволяет получить результат через 4–6 ч. Основан на выявлении начальных стадий роста бактерий.

Особенности метода. Используют индикаторы окислительно-восстановительного потенциала (ОВП) — хлорид тетразолия или индикаторы рН среды (в том числе флюоресцентные), которые позволяют выявлять рост микроорганизмов на ранних стадиях.

Техника проведения. Определение чувствительности проводят либо диско-диффузионным методом, либо методом разведений в бульоне (см. выше). При использовании диско-диффузионного метода через 4–6 ч агар с культурой и нанесенными дисками обрабатывают индикатором окислительно-восстановительного потенциала — хлоридом тетразолия. В случае использования метода разведений в бульоне изначально в жидкую среду с антибиотиками добавляют индикатор рН и сбраживаемые углеводы, при этом рН среды устанавливают нейтральной $7,2 \pm 0,2$. За счет индикатора среда приобретает определенный цвет.

Принцип учета. После обработки ОВП индикатором в местах роста микроба среда окрашивается в красный цвет, при отсутствии роста микроба цвет среды не изменяется. В случае использования индикатора рН, если антибиотик не активен, то микроорганизмы растут и выделяют кислые метаболиты, индиктор рН меняет цвет. Если антибиотик активен, то микроорганизмы погибают и среда не изменяет свой цвет.

Оценка чувствительности. Оценка результатов проводится по диаметру неокрашенных зон вокруг дисков. В жидких средах по изменению цвета среды в пробирках определяют МИК антибиотика.

Оценка метода. Простой, ориентировочный.

АВТОМАТИЗИРОВАННЫЙ МЕТОД С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АВТОМАТИЧЕСКИХ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ АНАЛИЗАТОРОВ

Характеристика метода. Количественный. Определяет активные препараты и их ингибирующие концентрации, прогнозирует механизмы

устойчивости, позволяет создавать компьютерную базу резистентности всех исследованных культур к антибиотикам.

Особенности метода. Используют стандартные тест-системы, в которых антибиотики в трех концентрациях внесены в специальные лунки пластиковой тест-системы. В лунках также находятся углеводы и индикатор рН. Все субстраты в лунках высушены.

Техника проведения. Готовят суспензию чистой культуры тест-микроорганизмов с мутностью 0,25–0,65 по стандарту McFarland. Прибор вносит автоматически суспензию микроорганизмов в тест-систему, инкубирует при 35 °С в течение суток, учитывает каждые 2 ч результаты, по мере готовности результатов интерпретирует их в течение 2–24 ч, выдает протокол результатов (электронный, печатный).

Принцип метода. Если концентрация антибиотика не активна, микроорганизмы растут и размножаются, вызывая увеличение мутности среды, снижение рН среды и изменение цвета индикатора. Если концентрация антибиотика активна, то микроорганизмы не изменяют мутность и цвет среды (рис. 50).

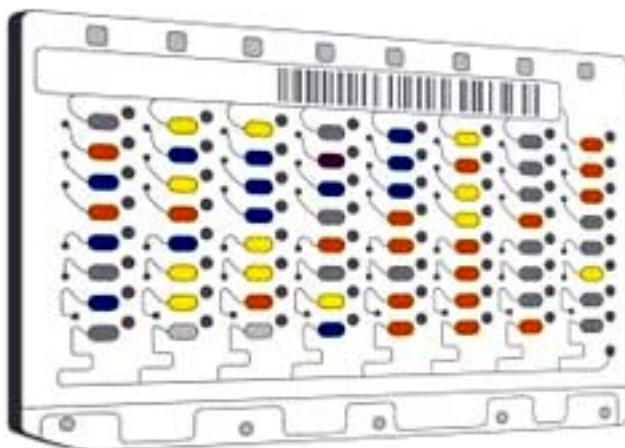


Рис. 50. Карта с лунками, заполненными дегидратированными антибиотиками, углеводами, индикаторами рН

Оценка чувствительности. Прибор автоматически проводит нефелометрию и спектрофотометрию и по изменению мутности и цвета среды определяет МИК тест-культуры. Сравнивает ее со стандартными величинами МИК и относит тест-культуру к чувствительным, умеренно чувствительным или резистентным штаммам.

Оценка метода. Стандартный, из-за автоматизации прост в исполнении, позволяет получать результаты через 5–8 ч, позволяет создавать электронную базу данных и сравнивать данные из различных лабораторий. Требуется дорогостоящего автоматического анализатора.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Характеристика методов. Определяют генетические маркеры резистентности.

Особенности методов. Используют ПЦР, ПЦР–ПДРФ, ДНК-гибридизацию, секвенирование.

Техника проведения. Выделяют ДНК из материала от больных или из чистой культуры микроорганизмов. Проводят генетические исследования. Проводят сравнение с данными фенотипического анализа.

Принцип методов. У резистентных микроорганизмов присутствуют гены, контролирующие синтез ферментов, разрушающих антибиотики. У некоторых микроорганизмов резистентность связана с мутациями в генах, кодирующих структуры, на которые действует антибиотик. Изменение мишени приводит к резистентности (рис. 51).

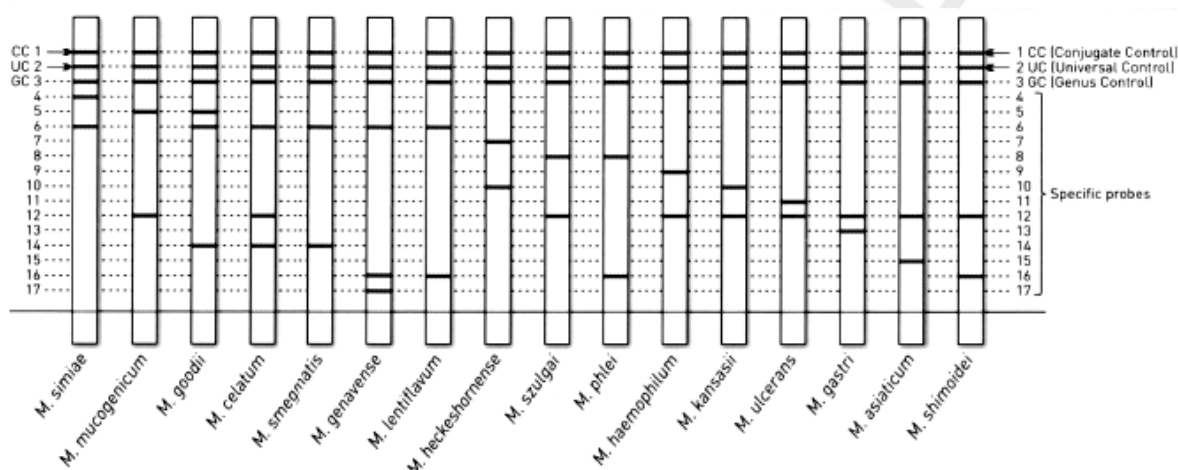


Рис. 51. Strip-тест (реакция гибридизации на мембранах) для определения устойчивости к противотуберкулезным препаратам *Mycobacterium* spp. (на каждой тест-полоске верхние три горизонтальные полосы являются контролем, остальные свидетельствуют о видовой принадлежности и наличии мутаций в *rpoB* гене, обуславливающих устойчивость к рифампицину)

Оценка чувствительности. Выявление у микроорганизма генетических маркеров резистентности свидетельствует о потенциальной устойчивости к антибиотику.

Оценка методов. Перспективны. На практике используются для диагностики антибиотикорезистентности микобактерий туберкулеза, а также для изучения генетических механизмов устойчивости в рамках регионального или национального мониторинга антибиотикорезистентности.

Выявление генетических маркеров резистентности целесообразно в тех случаях, когда традиционные фенотипические методы определения чувствительности микроорганизмов неприменимы или недостаточно эффективны. Например, определение чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* к противотуберкулезным препаратам с помощью культуральных

методов занимает 4–8 нед. Кроме того, результаты фенотипических тестов могут быть искажены в связи со снижением активности антимикробных препаратов в процессе длительного культивирования микроорганизмов.

Факторы, влияющие на результаты определения антибиотикорезистентности:

1) **состав питательной среды:**

– содержание ионов Ca^{2+} (не более 20–25 мг/л) и Mg^{2+} (не более 10–12,5 мг/л). Эти ионы инактивируют некоторые антибиотики (тетрациклины), при этом МИК антибиотика повышается;

– содержание тимина, тимидина, инактивирующих сульфаниламиды и триметоприм;

– pH среды (рис. 52).



Рис. 52. Влияние pH среды на диаметры зон задержки роста некоторых антибиотиков

2) **величина посевной дозы и состояние тест-микроорганизмов (инокулюм-эффект):**

– культуры, длительное время хранившиеся на плотных или жидких питательных средах, обладают пониженными ростовыми свойствами, поэтому для оценки чувствительности необходимо использовать микроорганизмы, инкубированные не более 16–18 ч;

– увеличение концентрации инокулята с 10^5 КОЕ/мл до 10^7 КОЕ/мл может приводить к повышению МПК;

3) **условия инкубации:**

– изменение температуры инкубации может привести к торможению либо к увеличению скорости роста, поэтому посеы инкубируют при 35 °С;

– преждевременный или поздний учет результатов может привести к ошибочной оценке результатов, поэтому его проводят через 18–24 ч инкубации.

Причины несовпадений результатов определения активности препарата *in vitro* и его клинической эффективностью в лечении пациентов:

- 1) отсутствие адекватного хирургического лечения;
- 2) общее состояние пациента (возраст, питание, сопутствующие заболевания);
- 3) несвоевременное назначение антимикробной терапии;
- 4) низкая биодоступность препарата;
- 5) невозможность достижения бактерицидной концентрации в воспалительном очаге;
- 6) инактивация микробными ферментами.

Некоторые резистентные формы микроорганизмов, получающие эпидемическое распространение:

1. **Антибиотикорезистентные *S. pneumoniae* (АРП)** — пневмококки, резистентные к антибактериальным препаратам трех и более классов (например, к пенициллину, ко-тримоксазолу и макролидам).

2. **Бактерии, продуцирующие β -лактамазы расширенного спектра действия (БЛРС)**, способны инактивировать β -лактамные антибиотики различных классов, включая пенициллины и цефалоспорины I–IV поколений, кроме цефамицинов (цефокситин, цефотетан) и карбапенемов.

3. **Бактерии, продуцирующие β -лактамазы широкого спектра действия**, способны инактивировать пенициллины, включая аминопенициллины (ампициллин, амоксициллин), антисинегнойные пенициллины (карбенициллин, пиперациллин и др.), цефалоспорины I и отчасти II (цефалор) поколений.

4. **Ванкомицинорезистентные энтерококки (VRE)** — *Enterococcus* spp. для которых МИК для ванкомицина составляет 32 мг/л и более.

5. **Метициллинорезистентный *S. aureus* (MRSA)** — *S. aureus*, резистентный к метициллину (оксациллину), который содержит ген *mecA*, обуславливающий продукцию измененного пенициллинсвязывающего белка — ПСБ-2. ПСБ-2 плохо связывает β -лактамные антиботики и они не транспортируются в бактерии. MRSA устойчивы ко всем β -лактамным антибиотикам и обычно резистентны к антибиотикам других классов, поэтому их называют «множественно-резистентные стафилококки».

6. ***S. aureus* с промежуточной резистентностью к ванкомицину или *S. aureus* с промежуточной резистентностью к гликопептидам** — *S. aureus*, которые характеризуются значениями МИК ванкомицина 8–16 мг/л.

Биологический (экспериментальный) метод исследования

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

Цели ЭМИ:

1. Выделение и идентификация чистой культуры микроорганизмов, если её невозможно получить на питательных средах:
 - а) из-за большого количества в материале посторонней микрофлоры, обладающей ингибиторным действием (например, выделение возбудителя чумы из разлагающихся трупов грызунов);
 - б) для выделения микроорганизмов, которые на питательных средах не растут (риккетсии, вирусы).
2. Определение вирулентности и патогенности микроорганизмов.
3. Индикация и идентификация экзотоксинов.
4. Изучение патогенеза инфекционных болезней при воспроизведении экспериментальных инфекций.
5. Производство биологических препаратов (профилактических, диагностических и лечебных сывороток, вакцин, культур тканей).
6. Проверка безвредности и эффективности лечебных препаратов (химиопрепаратов, иммунопрепаратов).
7. Лабораторные животные служат донорами крови для приготовления кровяных питательных сред и проведения исследований, связанных с использованием крови и её ингредиентов.

Этапы ЭМИ:

Первый этап ЭМИ — взятие и обработка материала.

К выполнению экспериментальных исследований на животных допускаются лица, имеющие высшее медицинское, медико-биологическое, фармацевтическое, ветеринарное, зоотехническое или биологическое образование, после того как они освоили правила обращения с лабораторными животными и приобрели практические навыки.

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

Второй этап ЭМИ — выбор и заражение лабораторного животного.

Выбор лабораторного животного. В медико-биологических исследованиях используется около 250 видов животных.

Нелинейные животные. Одни виды постоянно разводят в лабораториях, питомниках и предприятиях по производству биопрепаратов, это так называемые лабораторные животные: белые мыши, белые крысы, морские

свинки, кролики, хомяки, кошки, собаки, обезьяны, бараны, лошади. Других животных периодически отлавливают для эксперимента (полевки, песчанки, суслики, хорьки, сурки, лемминги). От общего числа лабораторных животных на долю белых мышей приходится около 70 %, белых крыс — 15 %, морских свинок — 9 %, кроликов — 2 %.

Линейные животные. Методом тесного инбридинга (внутриродственного скрещивания) удалось вывести более 200 линий мышей, свыше 20 линий крыс, 7 линий морских свинок, несколько линий кроликов. Среди диких животных чистых линий не существует. На выведение линий затрачивается не менее 8–10 лет тщательно выполняемой работы. С целью выведения определённой линии лабораторных мышей, крыс или других животных осуществляют братско-сестринское скрещивание на протяжении более 20 последовательных поколений и лишь тогда достигают 100 % гомозиготности. Линейные (инбредные) животные ценны тем, что являются генетически однородными и отличаются от нелинейных животных постоянными реакциями на воздействие физиологических, химических и патогенных факторов. Каждой линии присущи свои передающиеся по наследству особенности и свойства (повышенная или пониженная чувствительность к возбудителям инфекционных заболеваний, опухолям). По рекомендации Международного комитета по стандартизации генетической номенклатуры названия линий пишутся заглавными латинскими буквами. В заголовке линии заложено её происхождение, год создания какой-либо особенности животных данной линии. Например, среди белых мышей наиболее распространены линии А, СВА, ВАLB, ВАJJ, С57BL, С57BR, С58, С3Н.

Линейные лабораторные животные очень чувствительны к неблагоприятным факторам окружающей среды, поэтому условия содержания их должны быть лучше, чем нелинейных животных.

Потомство линейных животных, у которых в силу различных причин прекращено разведение методом инбридинга теряет линию, так как у них накапливаются мутации, а гомозиготность понижается. Уменьшение гомозиготности при этом прогрессирует от поколения к поколению, а специфические для данной линии признаки могут быть потеряны, ослаблены или извращены.

Животные-гнотобионты и животные-гнотифоры. Как линейные, так и нелинейные животные являются носителями возбудителей многих вирусных, бактериальных, грибковых заболеваний, которые затрудняют выполнение точных исследований. В процессе эксперимента, особенно длительного, присутствующие в организме животного возбудители могут активироваться и извратить характер реакции на испытуемый агент. В связи с этим возникла потребность получения лабораторных животных, лишённых микроорганизмов (гнотобионтов) или имеющих в организме контролируемую микрофлору (гнотифоры). Животных-гнотобионтов получают

от беременных самок, которым проводят кесарево сечение в определённый период перед родами. Новорожденных помещают на утеплённые подстилки в клетки. Корм, воду, подстилку и другие материалы, необходимые для обеспечения жизнедеятельности безмикробных животных, подвергают стерилизации в автоклавах. Животных-гнотобиотов содержат в стерильных условиях в течение всей их жизни. В гнотобиотических изоляторах получены безмикробные мыши, крысы, морские свинки, хомячки, кролики, кошки, собаки, ягнята, козлята, поросята, обезьяны.

Выбор вида, линии, возраста и пола животных диктуется целями исследований. Отобранных животных тщательно осматривают, больных выбраковывают. *Перед проведением эксперимента все животные должны быть выдержаны в виварии на 2-недельном карантине.*

Животные, взятые в эксперимент, должны быть здоровы, чувствительны к предполагаемому возбудителю, однородны по породе, линии, массе, возрасту, полу, упитанности, промаркированы.

Основные способы маркировки лабораторных животных:

- татуировка ушей тушью у животных, имеющих большие непигментированные ушные раковины (кролики, свинки, крысы, мыши);
- мечение мышей и крыс краской (насыщенным раствором пикриновой кислоты, 0,5%-ным раствором генцианвиолета, фуксином, эозином);
- с помощью колец или жетонов из мягкой белой жести, которые закрепляют на ушах или лапках (так маркируют новорожденных лабораторных животных).

Фиксация животных при проведении исследований. Кролики отличаются от других лабораторных животных спокойствием и относительно слабым сопротивлением при фиксации. Для фиксации их привязывают к специальным станкам или столам. Следует иметь в виду, что при сильном запрокидывании головы у кроликов легко наступает смерть от удушья. Помощник может зафиксировать кролика двумя руками: левой рукой за кожу спины в области затылка, правой — за кожу в области крестца. Кролика можно опеленать куском прочной материи. Удобен также способ фиксации с помощью индивидуального иммобилизационного станка, ящика с круглой прорезью в передней стенке.

Фиксация *морских свинок* не представляет затруднений.левой рукой животное удерживают за спину и грудь так, чтобы большой и указательный пальцы охватывали шею, а другие пальцы этой же руки обездвиживали передние конечности и ограничивали движения головы, правой рукой снизу удерживают заднюю часть тела и обездвиживают животом вверх.

Фиксация *белых крыс* обычно является наиболее сложной. Животное берут за кожу спины или хвост. Помощник левой рукой берет крысу за кожу в области затылка, фиксируя голову и передние конечности, а правой — удерживает задние конечности и хвост. После этого животному

придают нужное положение. Для фиксации крыс предложен ряд приспособлений — сетки, цилиндры, гильзы.

У *белой мыши* захватывают кожу спины на затылке большим и указательными пальцами левой руки, а остальными пальцами этой же руки удерживают задние конечности и хвост. Эти же манипуляции можно выполнять раздельно двумя руками. Фиксированное животное располагают в нужном положении.

Методы заражения лабораторных животных. Применяют следующие методы заражения животных: *накожный*, *внутрикожный*, *подкожный*, *внутримышечный*, *внутривенный*, *пероральный*, *интраназальный*, *внутриполостной* (в брюшную полость, в грудную полость, в переднюю камеру глаза), *внутриорганный* (в мозг, в лёгкие).

Способ заражения зависит от вида материала, вида животного, тропизма микроба.

Участок кожи, где проводится манипуляция, обрабатывают в такой последовательности:

- выщипывают или выстригают (выбривают) шерсть;
- удаляют остатки шерсти депилятором;
- участок кожи подвергают антисептической обработке одним из способов (спиртом, спиртом в смеси с эфиром 1:1, 10%-ной настойкой йода).

Материал вводят с соблюдением правил асептики. При болезненных вмешательствах предварительно проводят анестезию.

Накожный метод. На кожу спины или живота, освобождённую от шерсти, наносят царапины скарификационной иглой. Материал берут стеклянной палочкой и втирают досуха.

Внутрикожный метод. Местом введения обычно выбирают кожу спины или живота. Шерсть на этом месте за два дня до опыта удаляют депилятором. Используют очень тонкие и острые иглы с пологим скосом. Иглу вводят в кожу под очень острым углом скосом вверх. Инъецируют до 0,1 мл раствора. Образовавшееся вздутие («лимонная корочка») не исчезает 3–5 мин.

Подкожный метод. Иглу шприца вводят в основание кожной складки предполагаемого места инъекции. После прокола кожи направление иглы меняют и медленно вводят жидкость: мышам не более 1,0 мл, морским свинкам и крысам — 1,5 мл, кроликам — 3,0 мл, место введения обрабатывают антисептиком. Следят за тем, чтобы введенный материал не вытек наружу.

Внутримышечный метод. Лучшим местом введения считается участок с развитым мышечным слоем в области верхней трети задней лапы животного. Острые иглы направляют почти перпендикулярно участку.

Внутривенный метод. Инъекцию производят в краевую вену уха кроликов, яремную вену морских свинок, хвостовую вену крыс или мышей.

Обрабатывают кожу над веной. Для лучшего наполнения вены ее пережимают ниже будущего введения или кожу обогревают теплой (55 °С) водой. Материал вводят медленно.

Пероральный метод. Объем жидкости, вводимой перорально, зависит от вида и возраста животного.

Кроликов и морских свинок пеленают и располагают в положении, близком к вертикальному. Материал вводят принудительно с помощью тонкого эластичного зонда. Процесс введения зонда требует навыков. Перед введением зонда животному вставляют роторасширитель с отверстием в середине. Продвижение зонда по пищеводу обычно не вызывает затруднений, если его конец смазан вазелином, а у животного вызывают глотательные движения закапыванием в рот нескольких капель воды. Через воронку или шприц жидкость вливают в желудок.

Крыс или мышей помощник фиксирует в вертикальном положении, рот открывают браншами пинцета. Жидкость можно вводить двумя способами: а) шприцем со специальной изогнутой иглой, конец которой утолщен в виде шарика с боковым отверстием; б) шприцем с обычной иглой, на которую насажен тонкий эластичный зонд.

Интраназальный метод. Животное фиксируют, с помощью эфира или хлороформа вызывают состояние лёгкого наркоза. Материал вводят в нос животному маленькими каплями шприцем и иглой с насаженным тонким зондом. Материал можно капать непосредственно на нос животного, контролируя его попадание в носовые ходы.

Внутрибрюшинный метод. Инъекцию производят в задней трети живота. Место введения обрабатывают антисептиком до и после инъекции. Животное располагают вниз головой или в наклонном положении. Несколько отступив от средней линии, брюшную стенку прокалывают, вводят иглу под тупым углом к стенке. Игла должна быть с притупленным концом во избежание повреждения внутренних органов.

Третий этап ЭМИ:

1. *Наблюдение за животным.* В период наблюдения за животным должен быть обеспечен надлежащий уход; методика наблюдения зависит от ожидаемого эффекта:

а) при определении вирулентности, токсигенности, токсичности наблюдают появление инфильтратов или учитывают гибель животного;

б) при этиологической диагностике наблюдают за возникновением признаков заболевания; берут материал для бактериологического и серологического исследования, соблюдая правила асептики; ставят аллергические пробы.

2. Гибель (умерщвление) животного и вскрытие трупа.

Между смертью и вскрытием трупа животного должно проходить как можно меньше времени, так как кишечная флора даже при температуре

холодильника проникает в ткани, кровь, органы через 20–27 ч. Более целесообразно умерщвлять животное в агональный период.

Животные, которые подвергались в эксперименте воздействиям, повлекшим за собой понижение жизнеспособности, подлежат умерщвлению гуманным методом (эвтаназии). Эвтаназия не должна выполняться в помещении, в котором находятся другие лабораторные животные. Умерщвление часто осуществляется путём декапитации с использованием специальных гильотин, путём передозировки наркотических веществ (эфира, хлороформа, барбитуратов), электрическим током, воздушной эмболией (внутривенным введением воздуха), полным обескровливанием при использовании различных методов обезболивания.

При вскрытии труп кролика фиксируют на специальной доске за вытянутые лапы. Трупы морских свинок, крыс, мышей можно прикалывать старыми инъекционными иглами к парафиновой пластине в эмалированном лотке. Всю шерсть животного смачивают дезинфектантом (спирт, 5%-ная карболовая кислота, 5%-ный хлорамин). Кожу разрезают по средней линии живота от симфиза до подбородка. На уровне передних и задних лап делают боковые разрезы. Кожу отсепааровывают, отворачивают в стороны и прикалывают к пластине.

Ход вскрытия зависит от задач исследования: изучают патологоанатомическую и патоморфологическую картину, делают посев органов для выявления обсеменённости и выделения чистой культуры, из внутренних органов готовят мазки-отпечатки.

Вскрытие начинают с грудной полости, вырезая грудину. Если в грудной полости есть экссудат, из него делают мазки и посев. Кровь из сердца забирают проколом пастеровской пипеткой с оттянутым капиллярным концом. Проводят осмотр органов грудной полости и при необходимости забирают из них кусочки ткани. Далее вскрывают брюшную полость. При наличии экссудата его засевают в питательную среду. Затем тщательно осматривают и исследуют органы брюшной полости. Взятие материала из паренхиматозных органов проводят следующим образом: поверхность органа прижигают нагретым в пламени спиртовки скальпелем; прижжённый участок органа прокалывают стерильной пастеровской пипеткой с оттянутым концом или стерильной петлей; взятый материал засевают.

Все этапы работы с лабораторными животными регистрируют в специальном журнале с графами:

- Вид лабораторного животного.
- Цель заражения.
- Время заражения.
- Материал, примененный для заражения.
- Изменение поведенческих реакций животного после заражения.
- Время гибели (умерщвления) животного.

- Изменения, обнаруженные при вскрытии.
- Материал, взятый для посева.
- Свойства микроорганизма.
- Вид микроорганизма.

После вскрытия труп животного сжигают, автоклавируют или кипятят 1–2 ч в растворе фенола; инструменты дезинфицируют, очищают, затем стерилизуют. Трупы животных, павших от особо опасных инфекций, вскрывают в специальных помещениях с соблюдением особых мер предосторожности.

Четвертый этап ЭМИ — идентификация выделенной культуры и **заключение** по результатам исследования.

Этапы экспериментального метода исследования обобщены в табл. 17.

Таблица 17

Этапы экспериментального метода исследования

Этап	Содержание
Первый	Взятие и обработка материала
Второй	1. Выбор лабораторного животного: – здоровое и чувствительное; – мыши, крысы, кролики, бараны, лошади; – беспородные и линейные; – гнотобионты и гнотиферы. 2. Методы заражения: – накожный; – внутрикожный; – подкожный; – внутримышечный; – внутривенный; – пероральный; – интраназальный; – внутриполостной; – внутриорганный
Третий	1. Прижизненно: – наблюдение; – взятие материала для БЛМИ и СЛМИ; – постановка кожно-аллергических проб. 2. Гибель (умерщвление) животного, вскрытие: – патологоанатомическая картина; – патоморфологическая картина; – препараты-отпечатки; – взятие материала для БЛМИ и СЛМИ
Четвертый	Идентификация выделенной культуры и заключение

Оценка ЭМИ:

Достоинства метода:

- относительно высокая чувствительность;
- высокая специфичность;
- ранний метод исследования.

Недостатки метода:

- длительность;
- не всегда доступен;
- велика опасность инфицирования;
- дорогостоящий.

Общие принципы серологического метода исследования

Серологический (от лат. serum — сыворотка, logos — учение) **метод исследования (СЛМИ)** — метод, в основе которого лежит реакция специфического взаимодействия антигенов (Аг) и антител (Ат).

Используя этот метод, можно определить неизвестное Ат при взаимодействии с известным Аг, и наоборот.

Основные понятия.

Диагностическая сыворотка (известное Ат) — иммунная сыворотка, содержащая Ат известной специфичности в известном титре. Диагностические сыворотки получают путём иммунизации животных соответствующим Аг. В последнее время в этом качестве всё чаще используют моноклональные Ат.

Диагностикум (известный Аг) — взвесь в физрастворе известных микроорганизмов или извлечённых из них Аг. В качестве неспецифического диагностикума могут быть использованы перекрёстно реагирующие Аг.

Титр сыворотки — максимальное разведение сыворотки (или минимальное её количество), в котором обнаруживаются Ат.

Диагностический титр — разведение сыворотки, в котором реакция положительна только у больных и отрицательна у здоровых. Для одной инфекции диагностический титр каждой серологической реакции свой.

Парные сыворотки — сыворотки одного обследуемого, взятые с определённым интервалом для изучения динамики титра Ат. Первую сыворотку берут в начале заболевания, в острую стадию, вторую — при острых инфекциях — через 7–14 дней, при хронических инфекциях — через месяц.

Серонегативный период — стадия заболевания, в которой специфические Ат ещё не обнаруживаются, несмотря на наличие возбудителя («серологическое окно»).

Серопозитивный период — стадия заболевания, в которой специфические Ат обнаруживаются.

Сероконверсия — переход серонегативности в серопозитивность.

Задачи СЛМИ:

1. **Серодиагностика инфекционных заболеваний**, основанная на обнаружении в сыворотке Ат. **Диагностическое значение имеют:**

а) обнаружение *At* в диагностическом титре;

б) оценка динамики титра *At*. При установлении свежего случая заболевания диагностическое значение имеет 4-кратное нарастание титра *At* в парных сыворотках. Однако при наличии дополнительных клинических и эпидемиологических данных для установления диагноза достаточно 2-кратного нарастания титра *At*;

в) определение классоспецифичности антител чётко характеризует этапы инфекционного процесса, а также может служить косвенным прогностическим критерием. Так, выявление специфических IgM свидетельствует о свежем случае заболевания (инфекционная реакция). Выявление специфических IgG — анамнестическая реакция: постинфекционная (титр антител выше) или поствакцинальная (титр антител ниже).

2. Серодиагностика аутоиммунных заболеваний и аллергических реакции немедленного типа, основанная на обнаружении в сыворотке *At*.

3. Серодиагностика заболеваний, основанная на обнаружении *Ag* в биологических жидкостях или тканях:

а) экспресс-диагностика **инфекционных заболеваний** при обнаружении *Ag* микроорганизмов (например, диагностика хламидиозов, микоплазмозов, уреаплазмозов методом РИФ).

Количественное определение *Ag* микроорганизмов в динамике инфекционного процесса служит критерием эффективности проводимой антимикробной терапии;

б) диагностика **опухолей** при обнаружении в сыворотке опухлеассоциированных *Ag* (например, ПСА (простатспецифического *Ag*) при раке простаты).

4. Определение активности гуморального поствакцинального индивидуального или коллективного иммунитета.

5. Определение титров диагностических, лечебных и профилактических сывороток.

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

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

Материал для серологического исследования:

1) сыворотки, полученные из венозной крови, взятой в утреннее время, натощак (между последним приемом пищи и взятием крови должно пройти не менее 12 часов). За сутки до взятия крови необходимо исключить жирную пищу и прием алкоголя, за 1 час — курение. Необходимо исключить повышенные психоэмоциональные и физические нагрузки;

2) чистые культуры микроорганизмов, выделенные от больных или из объектов внешней среды;

3) патологический материал от больных (например, соскобы эпителия, пунктаты, биоптаты, секционный материал) для экспресс-обнаружения Аг микроорганизмов.

Оценка СЛМИ.

I. Достоинства СЛМИ:

1. **Высокая специфичность** определяется способностью Аг взаимодействовать только с гомологичными Ат. Самая низкая специфичность — у РА.

2. **Чувствительность** — минимальное количество Аг или Ат, которое выявляет реакция; хотя чувствительность зависит от метода исследования: минимальная — у РА (выявляет 100 мг Ат в 1 л), максимальная — у ИФА и РИА (выявляют до 0,00001 мг Ат в 1 л). В целом чувствительность достаточно высокая, но не абсолютная (95–98 % в самых чувствительных реакциях).

3. **Ранний метод исследования при выявлении Аг**, как микробных (обычно в РИФ), так и опухолеассоциированных (обычно в ИФА).

4. **Возможность проведения ретроспективных эпидемиологических исследований на основании обнаружения Ат.** Ат циркулируют в организме относительно долго после контакта организма с возбудителем. Это особенно важно при ретроспективной диагностике субклинических форм заболеваний.

5. **Быстрота получения результатов.** Скорость получения результатов зависит от используемой реакции. Так, при постановке РА на стекле результат может быть получен через 5 мин, при постановке РПГА — через 2 ч, РСК, ИФА, РИА — через 4 ч, РП в геле — через 24 ч.

II. Недостатки СЛМИ:

1. **Поздний метод исследования при выявлении Ат.** При острых инфекционных заболеваниях обнаружение Ат часто бывает ретроспективным потому, что Ат обычно появляются не ранее 7 дня от начала заболевания, а к этому времени острое заболевание может закончиться.

2. **Наличие ложных результатов.** Они могут быть **ложноположительные (ЛПР)** (острые (сохраняются до 6 месяцев) или хронические (наблюдаются постоянно)) и ложноотрицательные (ЛОР).

Причины ЛПР:

1) низкое качество используемой тест-системы, её недостаточная специфичность;

2) технические погрешности в работе лаборанта (перепутывание образцов);

3) наличие сопутствующих заболеваний и состояний:

а) для острых ЛПР:

– изменение гормонального фона (во время менстации, за 2 недели до родов, в течение 3 недель после родов);

- острые инфекции;
 - изменения липидного обмена при отравлениях, приёме алкоголя, жирной пищи, некоторых лекарств;
 - при обширных травмах (открытые переломы, сотрясение мозга);
 - при инфаркте миокарда (лёгкого).
- б) для хронических ЛПР:
- нарушение обмена веществ;
 - другие хронические инфекции;
 - аллергические и аутоиммунные заболевания;
 - хронические интоксикации;
 - злокачественные опухоли.

Причины ЛОР:

- 1) ранняя стадия заболевания, когда Ат не вырабатываются (серонегативный период) или титр их низкий, неулавливаемый данной тест-системой;
 - 2) особенности течения заболевания:
 - снижение реактивности организма при тяжёлом течении заболевания;
 - раннее назначение этиотропного или специфического лечения;
 - физиологическое иммунодефицитное состояние: у престарелых людей, а также на этапе становления иммунной системы у детей до 2 лет;
 - при микробоносительстве;
 - в) низкая чувствительность используемой тест-системы;
 - г) технические погрешности в работе лаборанта (перепутывание образцов);
- 3) **потенциальная опасность инфицирования** всегда существует при работе с биологическим материалом.

Общие закономерности серологических реакций:

1. Ставятся *in vitro*, за исключением анафилактики.
2. Проявляются при иммунологическом соответствии (гомологичности) Аг и Ат и присутствии их в эквивалентных соотношениях (недостаток или избыток компонентов препятствует образованию иммунных комплексов). Протекают в оптимальных температурных условиях (0–37 °С) и pH среды, только в присутствии электролита (0,85%-ный раствор NaCl).
3. Различают двухфазные и однофазные серологические реакции. Двухфазные протекают в 2 фазы: специфическую и неспецифическую. *Специфическая фаза:* взаимодействие Аг с Ат. Участок молекулы Аг, взаимодействующий с Ат — эпитоп, соответствующий участок молекулы Ат — активный центр (паратоп). Сила связывания Аг и Ат зависит от комплементарности (соответствия по принципу ключ-замок) Аг и Ат. Среди Ат существует большое разнообразие по структуре активного центра, одни Ат точно комплементарны Аг, другие — не полностью.

В связывании Аг с активным центром Ат участвуют нековалентные связи за счёт пространственной комплементарности, которые обеспечива-

ются электростатическим, вандерваальсовым и гидрофобным взаимодействием, и водородные связи.

Взаимодействие нарастает по мере уменьшения расстояния между Аг и Ат. Прочность соединения активного центра Ат и Аг детерминанты, обусловленная их комплементарностью — *аффинитет*. У поливалентных Ат аффинитет выше. Суммарная сила взаимодействия поливалентного Ат с полидетерминантным антигеном — *авидность*.

Специфическая фаза осуществляется быстро, взаимодействие происходит при рН 7,0 и определенной температуре. Образуется прочное соединение, но ковалентные связи не участвуют, поэтому оно обратимо: при изменении рН, высокой концентрации солей наступает диссоциация комплекса Аг–Ат.

Неспецифическая фаза: укрупнение и образование видимого комплекса Аг–Ат. При приближении поверхности эпитопа и паратопа на расстояние в десятые доли нм во взаимодействие вступают межмолекулярные силы, обладающие высокой энергией.

Неспецифическая фаза развивается медленно, осуществляется в присутствии электролита, визуальный эффект зависит от свойств Аг:

- если Аг корпускулярный нерастворимый (бактерии, эритроциты), наступает феномен агглютинации (зёрна, хлопья);
- если Аг молекулярный растворимый, наблюдается феномен преципитации (помутнения);
- если Аг клеточный, наблюдается феномен лизиса клетки;
- если в качестве Аг выступают токсины или вирусы, наблюдается феномен нейтрализации.

Регистрация однофазных взаимодействий требует введения в систему дополнительной метки, позволяющей фиксировать связывание Аг и Ат. Методы визуализации однофазных взаимодействий:

- 1) сорбция одного компонента реакции (Аг или Ат) на носителе. В качестве носителя антигенов могут быть использованы эритроциты — РПГА или частицы латекса — РПЛА;
- 2) использование гемолитической системы, состоящей из равных объёмов Аг и Ат, для определения комплементсвязывающих антител в РСК;
- 3) использование флюорохромов — РИФ;
- 4) использование ферментов (пероксидаза, β -глюкуронидаза) — ИФА;
- 5) комбинированное применение различных принципов и реакций: после электрофоретического разделения белков исследуемого образца электрофореграмма переносится на нитроцеллюлозную пластинку и далее обрабатывается как в ИФА — иммуноблотинг;
- 6) использование радиоактивных изотопов (йод, хром) — РИА;
- 7) использование электронов или морфологически различимых частиц: золота, осмия, ферритина (белка селезенки), гемоцианина (белка

гемолимфы моллюска), небольших вирусов при иммунной электронной микроскопии и в иммуногистохимических исследованиях. Ат, присоединенные к электронам или морфологически различимым частицам, становятся видимыми в электронном микроскопе как небольшие плотные точки;

8) использование системы биотин-авидин в тест-системах ИФА 4-го поколения для скрининга ВИЧ-инфекции. Биотином метят моноклональные Ат к Аг ВИЧ. Молекулы авидина (гликопротеина яичного белка) обладают высоким сродством к небольшим молекулам витамина биотина (молекула авидина связывает 4 молекулы биотина). Поэтому Ат, конъюгированные с биотином, обнаруживают по взаимодействию с авидином;

9) ингибирование специфическими Ат феномена гемагглютинации (склеивания эритроцитов гемагглютинидами вируса) — РТГА;

10) ингибирование специфическими Ат феномена гемадсорбции (способности вирусов, имеющих гемагглютинины, адсорбировать эритроциты) — РТГАдс;

11) нейтрализации вирусной активности специфическими Ат в культуре клеток или на лабораторных животных — РН. В случае гомологичности Ат и вирусных Аг культура клеток (или лабораторное животное) сохраняет жизнеспособность.

4. Все серологические реакции отличаются по проявлениям (регистрируемому эффекту) и технике постановки.

Подробно серологические реакции изучаются в курсе иммунологии.

Общие принципы аллергологического метода исследования

Аллергологический метод исследования (АЛМИ) используется для выявления в организме Ат или сенсibilизированных Т-лимфоцитов к аллергену.

Задачи АЛМИ:

1) диагностика хронических инфекционных заболеваний, в патогенезе которых имеет место сенсibilизация к микробным антигенам (ГЗТ);

2) диагностика аллергических заболеваний (ГНТ);

3) разработка специфической десенсибилизирующей терапии реакций ГНТ медиаторного типа.

Этапы АЛМИ:

Первый этап — сбор аллергологического анамнеза с целью:

1) установления наследственной предрасположенности к аллергии;

2) установления наличия симптомов аллергического заболевания при объективном обследовании больного (чихания, ринореи, затруднения дыхания, конъюнктивита, сыпи, отеков, зуда);

3) выявления факторов, отягощающих личный аллергологический анамнез:

- перенесенных острых инфекционных заболеваний;
- наличия в данное время или в анамнезе хронических воспалительных заболеваний (хронический тонзиллит, синусит, ринит, холецистит, колит, хронические язвы кожи, экзема, фурункулёз, кожные грибковые заболевания);
- выявление пищевой, ингаляционной, инсектной аллергии, контактного дерматита;
- получение сведений о профилактических прививках и реакциях на них;
- получение сведений о введении гетерологичных сывороток и реакциях на них;
- получение сведений о реакциях на введение антибиотиков, частоте применения антибиотиков, сведения о непереносимости других лекарств;

4) установление эффекта элиминации аллергена: связи между исчезновением контакта с аллергеном и изменением состояния пациента.

Так, аллергию к клещам домашней пыли можно заподозрить при развитии обострений, связанных с уборкой помещения, работе с книгами. При смене места проживания выраженность симптомов часто уменьшается, иногда вплоть до полной клинической ремиссии, в виду отсутствия контакта с аллергеном.

При аллергии на производственные аллергены наблюдается ухудшение состояния после выходных («эффект понедельника»).

При лекарственной аллергии отмечается смягчение или исчезновение симптомов аллергии после отмены препарата;

5) предположения по группе аллергена:

- улучшение состояния пациента с пищевой аллергией при исключении из рациона аллергенных продуктов;
- связь с простудными заболеваниями у больных с инфекционно-аллергической бронхиальной астмой, аллергическим ринитом;
- наличие сезонности.

Так, при поллинозах связь обострения заболевания с периодом цветения растений обычно настолько очевидна, что проведение аллергологического обследования становится необходимым лишь с целью уточнения спектра аллергенов для проведения специфической десенсибилизации.

Атопический дерматит, обусловленный гиперчувствительностью к аллергенам домашней пыли и плесневых грибов, обостряется ранней весной еще до цветения растений и поздней осенью (больше времени проводится в помещении);

- наличие наследственной предрасположенности при медиаторном типе ГНТ;

б) дифференциации пищевой аллергии с парааллергией (употреблением большого количества продуктов, содержащих биологически активные амины, что имитирует патофизиологическую стадию медиаторного типа ГНТ) и идиосинক্রазией (непереносимостью отдельных продуктов, например, молочных, обусловленной ферментопатией).

В диагностике пищевой аллергии существенное значение имеют сведения, четко указывающие на связь обострения с приемом конкретного пищевого продукта. При этом учитывается только обострение, которое развивается во временном диапазоне от нескольких минут до 4 ч с момента употребления в пищу подозреваемого продукта.

Существенное значение для выявления пищевых аллергенов имеет установление непереносимости продуктов, сходных по антигенной структуре с подозреваемым аллергеном. Например, пациенты, имеющие аллергию на куриное яйцо, чаще всего не переносят и мясо курицы. При непереносимости коровьего молока нередко отмечается аллергия на говядину.

Второй этап АЛМИ — постановка кожно-аллергических проб, которая предполагает введение предполагаемого аллергена в организм больного.

Кожно-аллергические пробы для диагностики ГЗТ. Антигены многих возбудителей обладают сенсibiliзирующим действием, что используют для диагностики инфекционных заболеваний, а также при проведении эпидемиологических исследований.

Кожно-аллергические реакции при инфекционных заболеваниях появляются относительно рано (с 4–5-го дня болезни), достигают наибольшей интенсивности на 2–3 неделе болезни. В зависимости от выраженности или напряженности аллергического процесса положительная реакция может сохраняться годами (например, при бруцеллёзе) или исчезать довольно быстро, в течение нескольких недель (месяцев) (например, при дизентерии). Кожные пробы нашли применение в диагностике таких заболеваний как сар, мелиоидоз, бруцеллёз. Наиболее известна проба Манту, используемая как для диагностики туберкулёза, так и для оценки невосприимчивости организма к возбудителю (рис. 53, 54).



Рис. 53. Постановка пробы Манту

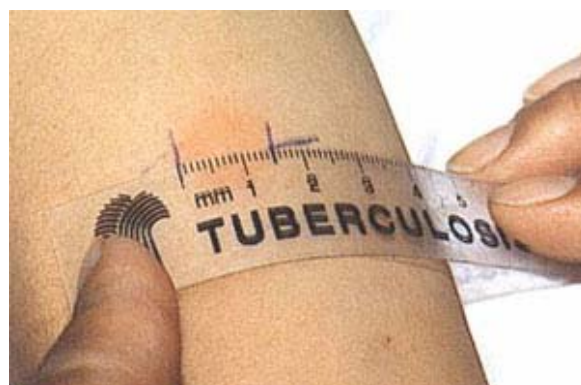


Рис. 54. Учет пробы Манту

Кожно-аллергические пробы для диагностики ГЗТ предполагают внутрикожное введение Аг (аллергена). Аллергенные препараты готовятся специальными учреждениями — институтами вакцин и сывороток. Предполагаемый аллерген вводят внутрикожно в объёме 0,1 мл. Результат учитывают через 24–72 ч после введения аллергена по диаметру папулы (инфильтрата).

Кожно-аллергические пробы также используются при диагностике ГНТ медиаторного типа. Введенные в практику в 1911 г., кожно-аллергические пробы остаются одним из самых достоверных диагностических тестов *in vivo*. Именно кожно-аллергические пробы являлись и являются ориентиром для определения достоверности всех тестов *in vitro*. Кожное тестирование — ценный метод диагностики сенсibilизации, который широко используется во всех странах мира.

Для кожных тестов используют растворы аллергенов: трав, пыльцы, эпидермиса животных, яда насекомых, пищи, лекарств. Степень диагностической чувствительности кожно-аллергических проб увеличивается в следующем порядке: капельная, аппликационная (накожная), укол (прик-тест), скарификационная (через царапину), внутрикожная.

Капельные пробы — аллерген наносится на неповреждённую кожу в виде капли.

Аппликационные пробы — раствором аллергена смачивают марлевый тампон и накладывают его на неповрежденный участок кожи (внутренней поверхности предплечья или спины). Затем этот участок заклеивается перфорированным лейкопластырем (рис. 55).



Рис. 55. Аппликационные пробы на коже спины

Оценка результатов проводится как через 20–30 мин после нанесения на кожу аллергена (ГНТ), так и спустя 24–48 ч (ГЗТ). Оцениваются гиперемия кожи, зуд, отечность, мокнутие в месте нанесения вещества. Аппликационные тесты незаменимы для оценки индивидуальной переносимости различных наружных средств для лечения и ухода за кожей.

Прик-тесты ставят на обработанной спиртом коже внутренней стороны предплечья. Стерильную металлическую или пластиковую иглу аппликатора с ограничителем погружают в раствор аллергена, затем помещают на кожу предплечья и надавливают, прокалывая кожу на глубину 1 мм.

Скарификационные пробы — на обработанную спиртом кожу внутренней стороны предплечья наносят капли аллергенов, через них однократным скарификатором делают небольшие царапины (рис. 56).



Рис. 56. Постановка скарификационных проб

Внутрикожные тесты — разведенный 1:100 (по отношению к кожным тестам) аллерген вводят внутрикожно в кожу предплечья в объеме 0,1 мл. Внутрикожные тесты ставятся с ингаляционными аллергенами в сложных диагностических ситуациях, когда клинические данные убедительно свидетельствуют о наличии сенсibilизации, а результаты кожных тестов сомнительны. Внутрикожные тесты с пищевыми аллергенами проводить категорически запрещено из-за их чрезмерной чувствительности и возможности провокации анафилактической реакции.

Противопоказания к кожному тестированию:

- обострение текущего аллергического заболевания;
- острое инфекционное заболевание (ОРВИ, ангина и др.);
- хроническое заболевание в стадии декомпенсации;
- беременность;
- туберкулезный процесс любой локализации в период обострения;
- психическое заболевание в период обострения;
- коллагенозы;
- злокачественные заболевания;
- длительная терапия кортикостероидами или местное их применение в области кожи, где предполагается проведение проб (отказаться за 2 недели до проведения проб);
- прием антигистаминных препаратов (отказаться за сутки до проведения проб);

- возраст старше 60 лет.

В таких ситуациях кожное тестирование запрещается или откладывается.

Кожное тестирование нецелесообразно проводить в следующих случаях:

- указании в анамнезе на острую реакцию к определенному аллергену (для исключения возможных анафилактических реакций);
- отсутствии подозрений на аллергическую природу заболевания;
- отказе родителей больного ребенка или самого больного от проведения тестирования;
- наличии у больного выраженного дермографизма;
- наличии у пациента инфекционных заболеваний кожи или поражения кожи и отсутствии непораженных участков для проведения тестирования.

В таких ситуациях кожное тестирование откладывают или используют лабораторные методы диагностики.

Кожно-аллергические пробы проводятся в процедурном кабинете аллергологического отделения под контролем врача-аллерголога.

За один раз проводится не более 15 проб с различными аллергенами и 2 контроля. Положительный контроль содержит гистамин и указывает на то, что соблюдены все условия постановки теста. Отрицательный контроль содержит жидкость, которая не должна вызывать каких-либо кожных реакций (например, изотонический раствор хлорида натрия). Результаты постановки кожно-аллергических проб оцениваются относительно контролей. Если пациент перед проведением пробы принимал антигистаминные препараты, то положительный контроль и пробы на аллергены не дадут реакции.

Оценка результатов кожно-аллергических проб ГНТ проводится через 20 мин после контакта с аллергеном.

Положительный контроль должен показать реакцию на ++ или +++, а отрицательный контроль — ничего не показать.

Отрицательный (–) результат ГНТ аналогичен отрицательному контролю.

Сомнительный (±) результат ГНТ регистрируется при наличии только гиперемии до 20 мм (без везикулы).

Положительный результат ГНТ регистрируется, если:

- наблюдаются везикула (= волдырь) или везикула и гиперемия;
- наблюдается только гиперемия диаметром больше 20 мм;
- имеются признаки общей реакции (головокружение, тошнота).

Степень положительной кожной реакции на аллерген оценивают по шкале от одного (+) до четырех (++++) плюсов:

- + — везикула до 3 мм;

- ++ — везикула до 5 мм;
- +++ — везикула до 10 мм и гиперемия;
- ++++ — везикула более 10 мм и гиперемия.



Рис. 57. Результаты кожных проб

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

Если подозревалась аллергия на конкретный аллерген, а результат кожно-аллергической пробы отрицателен, это не исключает аллергию на этот аллерген. Проба может быть повторена с другими сериями того же аллергена, так как разные серии аллергенов в зависимости от стандартизации аллергенов и индивидуальной чувствительности могут действовать по-разному. Кроме того, следует учитывать, что чувствительность кожи и слизистых оболочек (конъюнктивы глаз, слизистой носа) отличаются друг от друга. Поэтому при несовпадении результатов или сомнении ставят элиминационно-провокационные пробы.

Необходимость в проведении элиминационно-провокационных тестов чаще всего возникает у больных с атопическим дерматитом, так как у них наблюдаются положительные кожно-аллергические пробы к множеству пищевых аллергенов, в то время как клинически значимыми обычно оказываются 1–3 пищевых продукта. Если в таких ситуациях, основываясь только на результатах кожных тестов, без проведения элиминационно-провокационного тестирования, исключить из питания множество продуктов, это будет неоправданным.

Третий этап АЛМИ — постановка провокационных проб предполагает воспроизведение симптомов аллергической реакции через принудительный контакт с аллергеном в период ремиссии.

Провокационные пробы применяют по строгим показаниям, когда имеются расхождения между данными анамнеза, результатами кожных проб и данными лабораторного обследования. При наличии аллергии на конкретный препарат, ставить провокационные тесты не рекомендуется. Провокационные пробы проводят в специализированных центрах, так как шоковая реакция возможна даже на микрограммы препарата.

Для провокационных проб могут быть использованы сублингвальный, конъюнктивальный, назальный, ингаляционный или холодовой тесты. Если в ответ на введение предполагаемого аллергена развивается аллергическая реакция, то аллерген может считаться причинно значимым.

Четвертый этап АЛМИ — постановка элиминационных тестов. Элиминационные тесты используют для подтверждения причинного аллергена, если пациент постоянно контактирует с ним (например, при пищевой аллергии). Элиминационная диета, исключая определённые продукты, обладающие сенсибилизирующим действием на организм пациента, назначается на 1–2 недели. При улучшении состояния пациента проводится провокационная проба, подтверждающая причинный аллерген.

Пятый этап АЛМИ — лабораторные методы выявления эффекторных молекул Ат и биологически активных аминов, а также сенсибилизированных лимфоцитов к аллергенам, опосредующих клинические проявления аллергических реакций. Лабораторные методы диагностики аллергии используются при наличии противопоказаний к кожным тестам (ранний детский возраст, непрерывно рецидивирующее течение, поливалентная сенсибилизация, невозможность прекращения лечения). Лабораторные методы диагностики аллергии подробно изучаются в курсе иммунологии.

После аллергологического обследования пациента врач заполняет паспорт больного аллергией — медицинский документ, содержащий все сведения об аллергическом заболевании, которым страдает данный человек. Паспорт (или его копию) страдающий аллергией должен всегда иметь с собой и предъявлять при обращении за медицинской помощью.

Оценка АЛМИ.

Достоинства:

1. *Кожно-аллергические пробы высоко чувствительны и специфичны*, они являются «золотым» стандартом при диагностике аллергических заболеваний.

2. *Ранний метод диагностики ГНТ.* При постановке кожно-аллергических проб можно выявить сенсибилизацию к определённому аллергену (например, домашней пыли, стрептококкам) даже без признаков реализации в аллергическую реакцию. Кожно-аллергические пробы используются также для определения состояния сенсибилизации к антибиотикам и гетерологичным сывороткам.

3. *Быстрота получения результатов* при постановке кожно-аллергических проб для диагностики ГНТ.

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

5. *Выявление причинного аллергена позволяет проводить патогенетически обоснованную десенсибилизирующую терапию*; этот подход наиболее успешно в настоящее время используется при поллинозах (пыльцевой аллергии).

Недостатки:

1. *Поздний метод исследования* для диагностики ГЗТ.

2. *Сложность стандартизации препаратов аллергенов.*

3. *Недостаточная чувствительность кожно-аллергических проб.* Кожные пробы не всегда дают достоверную информацию о наличии аллергии: у детей раннего возраста, иногда у пожилых людей при лекарственной аллергии кожные пробы могут быть отрицательны.

4. *Опасность осложнений при постановке кожно-аллергических проб:* клинически выраженную стадию разрешения аллергической реакции может индуцировать даже минимальное количество аллергена. Поэтому кожно-аллергические пробы проводятся только в лечебных учреждениях. Их нельзя использовать при выраженных поражениях кожи, при анафилактическом шоке в анамнезе.

5. *Недостаточно высокая чувствительность лабораторных методов диагностики аллергии* — при интерпретации результатов лабораторных методов следует помнить, что в случае отрицательных тестов возможность развития аллергической реакции не исключается.

Литература

1. *Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии* / под ред. А. А. Воробьева, А. С. Быкова. М. : Медицинское информационное агентство, 2003. 236 с.
2. *Лобзин, Ю. В.* Практика лабораторных исследований при инфекционных заболеваниях / Ю. В. Лобзин, Ю. П. Финогеев, В. Ф. Крумгольц. СПб : Элби-СПб, 2005. 274 с.
3. *Медицинская микробиология, вирусология и иммунология* / под ред. А. А. Воробьева. 2-е изд., испр. и доп. М. : Медицинское информационное агентство, 2006. 704 с.
4. *Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований* / под ред. А. С. Лабинской, Л. П. Блинковой, А. С. Ещиной. М. : Медицина, 2004. 576 с.
5. *Поздеев, О. К.* Медицинская микробиология / О. К. Поздеев ; под ред. акад. РАМН В. И. Покровского. М. : ГЭОТАР-Мед., 2001. 768 с.
6. *Brooks, G. F.* Medical Microbiology / G. F. Brooks, J. S. Butel, S. A. Morse. 24th ed. NY : McGraw-Hill, 2007. 832 p.
7. *Manual of Clinical Microbiology* / ed. P. Murray. 8th ed. NY : ASM Press, 2003. 2322 p.
8. *Molecular medical microbiology : 3 volumes* / ed. M. Sussman. San Diego, California, USA : Academic Press, 2002. 2223 p.
9. *Yuriev, A.* Methods in Molecular Biology / A. Yuriev. New Jersey : Humana Press-Totowa, 2003. 416 p.

Электронные источники научной информации

1. Web-ресурс по клинической лабораторной диагностике: <http://www.primer.ru/>
2. Базовые методы молекулярной генетики: <http://www.genoterra.ru/news/view/25/250>
3. Википедия — свободная энциклопедия: <http://wikipedia.org/>
4. Всероссийский медицинский портал: <http://www.bibliomed.ru/>
5. Методы, информация и программы для молекулярных биологов: <http://www.molbiol.ru/>
6. Оборудование для лабораторий: <http://www.promix.ru/>
7. ПабМед и Медлайн (Национальная медицинская библиотека и Национальный институт здравоохранения США): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=pubmed>
8. Федерация Европейских микробиологических обществ (FEMS): <http://www.fems-microbiology.org/website/nl/default.asp>

Оглавление

Список сокращений	3
Техника безопасности при работе с биологическим материалом.....	4
Забор, хранение и транспортировка материала для микробиологического исследования.....	9
Микроскопический (бактериоскопический) метод исследования.....	17
Культивирование микроорганизмов на питательных средах.....	35
Методы выделения чистых культур аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов.....	45
Методы выделения чистых культур облигатно-анаэробных микроорганизмов.....	46
Культуральный (бактериологический) метод исследования.....	50
Биохимическая идентификация микроорганизмов	59
Идентификация микроорганизмов без выделения чистой культуры	64
Принципы молекулярно-генетического анализа	65
Определение факторов патогенности бактерий.....	86
Методы изучения чувствительности бактерий к антибиотикам.....	90
Биологический (экспериментальный) метод исследования	101
Общие принципы серологического метода исследования	108
Общие принципы аллергологического метода исследования.....	113
Литература	122

Учебное издание

Шабан Жанна Георгиевна
Слизень Вероника Вячеславовна
Канашкова Татьяна Александровна
Крылов Игорь Александрович

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В МИКРОБИОЛОГИИ

Учебно-методическое пособие

Ответственная за выпуск Т. А. Канашкова
В авторской редакции
Компьютерная вёрстка Н. М. Федорцовой
Корректор Ю. В. Киселёва

Подписано в печать 25.03.10. Формат 60×84/16. Бумага писчая «Кюм Люкс».

Печать офсетная. Гарнитура «Times».

Усл. печ. л. 7,21. Уч.-изд. л. 6,55. Тираж 75 экз. Заказ 545.

Издатель и полиграфическое исполнение:
учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет».
ЛИ № 02330/0494330 от 16.03.2009.
ЛП № 02330/0150484 от 25.02.2009.
Ул. Ленинградская, 6, 220006, Минск.