

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ  
ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА  
Федеральное казённое учреждение здравоохранения  
«Иркутский ордена Трудового Красного Знамени  
научно-исследовательский противочумный  
институт Сибири и Дальнего Востока»

**Организация и проведение учебного процесса  
по подготовке специалистов в области  
биобезопасности и лабораторной диагностики  
возбудителей некоторых опасных инфекционных  
болезней**

(учебно-методическое пособие  
для врачей-бактериологов, эпидемиологов, лаборантов)



**Иркутск, 2012**

## АННОТАЦИЯ

Учебно-методическое пособие предназначено для использования при профессиональной переподготовке врачей-бактериологов (биологов), эпидемиологов и лаборантов по основным и дополнительным профессиональным образовательным программам (свыше 500 ч), на циклах повышения квалификации по профилю программ профессиональной переподготовки по опасным инфекционным болезням (144 ч, 72 ч), подготовке специалистов по программам послевузовского образования (аспирантура по специальностям 03.02.03 «микробиология», 14.02.02 «эпидемиология»), для практической работы специалистов, занимающихся диагностикой инфекционных болезней.

Пособие составили специалисты Федеральной службы по надзору в сфере защиты **прав потребителей и благополучия человека** (Г.Г. Онищенко, Е.Б. Ежлова, Ю.В. Демина, Н.В. Шеенков), **ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора** (Т.Ю. Загоскина, С.В. Балахонов, Л.Е. Токарева, Т.С. Тайкова, О.А. Носкова, Т.М. Долгова, Т.А. Иванова).

## Содержание

1.	ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ОРГАНИЗАЦИИ РАБОТ В БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРИЯХ	6
1.1.	Требования к помещению и оборудованию лабораторий .	6
1.2.	Обеззараживание помещений и оборудования лабораторий	13
1.3.	Обеззараживание и утилизация отходов деятельности лаборатории	18
2.	СРЕДСТВА ЗАЩИТЫ	23
3.	МЕТОДИЧЕСКИЕ ПРИЁМЫ И ОСОБЕННОСТИ РАБОТЫ С ВОЗБУДИТЕЛЯМИ I-II ГРУПП ПАТОГЕННОСТИ	33
3.1.	Организация рабочих мест и особенности методических приемов при посеве инфицированного материала	33
3.2.	Пипетирование заразного материала	41
3.3.	Микроскопические методы исследования	46
3.4.	Центрифугирование	56
3.5.	Основные методы изучения биологических свойств микроорганизмов	58
3.6.	Обеззараживание исследуемого материала при постановке ПЦР	66
4.	ОСОБЕННОСТИ ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОЙ РАБОТЫ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМИ ЖИВОТНЫМИ	67
4.1.	Требования к размещению и оснащению помещений блока инфицированных животных	67
4.2.	Вскрытие животных	73
4.3.	Заражение лабораторных животных	80
5.	ИММУНОСЕРОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ	87
5.1.	Теоретические основы взаимодействия антигена с антителом	88
5.1.1.	Антигены	88
5.1.2.	Антитела	97
5.1.3.	Взаимодействие антитела с антигеном	105
5.1.4.	Иммуносерологические методы исследования	112
5.1.5.	Методы иммунофлуоресценции	146
5.1.6.	Варианты иммуносорбентного анализа на твердой фазе	165
5.1.7.	Серологические реакции, протекающие с участием комплемента	184

5.1.8. Реакции нейтрализации	188
6. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЭНТЕРОБАКТЕРИОЗОВ	188
6.1. Характеристика семейства <i>Enterobacteriaceae</i>	189
6.2. Эшерихиозы	193
6.3. Шигеллезы	200
6.4. Сальмонеллезы	206
6.5. Приложение	225
7. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ХОЛЕРЫ	228
7.1. Биологические свойства холерных вибрионов	228
7.2. Бактериологический анализ	245
7.3. Серологическая диагностика	260
7.4. Приложение	265
8. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ТУЛЯРЕМИИ	270
8.1. Биологические свойства возбудителя туляремии	270
8.2. Лабораторная диагностика туляремии	281
9. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ	300
9.1. Биологические свойства возбудителя	300
9.2. Лабораторный диагноз	308
9.3. Приложение	321
10. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЧУМЫ	325
10.1. Биологические свойства возбудителя чумы	325
10.2. Контроль диагностических питательных сред	344
10.3. Приложение	371
11. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА БРУЦЕЛЛЕЗА	376
11.1. Биологические свойства возбудителя бруцеллеза	376
11.2. Лабораторная диагностика бруцеллеза	383
11.3. Приложение	402
12. Список использованной литературы	419

В настоящее время бесспорным является признание факта, что безопасность, в особенности биологическая, является важной в т.ч. международной проблемой. В последние десятилетия резко возрос интерес к биологическим поражающим агентам - вирусам, бактериям и их токсинам.

В Российской Федерации на государственном уровне принят ряд законодательных актов, директивных и инструктивно-методических документов, направленных на борьбу с биотерроризмом. Принимаются меры по повышению эффективности работы различных служб, в том числе медицинской, в условиях чрезвычайных ситуаций. В связи с этим, остро встает вопрос подготовки квалифицированных специалистов. Надлежащие микробиологические технологии, правильное использование оборудования для обеспечения биологической безопасности и хорошо обученный персонал остаются основными факторами биологической безопасности при работе в лабораторных условиях.

В связи с этим теоретические знания и практические навыки в этой области должны быть составной частью профессиональной подготовки врачей и среднего медицинского персонала по вопросам противодействия биотерроризму, биобезопасности, индикации и лабораторной диагностики ООИ.

Цель данного учебного пособия – обобщить имеющийся материал и использовать его для проведения обучения специалистов в области биобезопасности и лабораторной диагностики отдельных опасных инфекционных болезней.

Профессиональная переподготовка и повышение квалификации врачей и среднего медицинского персонала по особенностям работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) I-IV групп патогенности

и лабораторной диагностики опасных инфекционных болезней осуществляется на базе отдела подготовки и усовершенствования специалистов (ОПиУС) ФКУЗ Иркутского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора. Отдел является самостоятельным структурным подразделением. В своей деятельности он руководствуется действующим законодательством, Уставом института, приказами и распоряжениями администрации института, а также приказами и инструкциями Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, имеет лицензию Федеральной службы по надзору в сфере образования и науки на право осуществления образовательной деятельности. Основными задачами ОПиУС являются совершенствование существующих и внедрение новых методов организации учебного процесса, в том числе на основе использования современных информационных технологий, научно-методического обеспечения обучающихся, материально-технической и информационной базы, разработка учебно-методических пособий для преподавателей и слушателей циклов. Контингент обучающихся - врачи-бактериологи, эпидемиологи, биологи, средний медицинский персонал противочумных учреждений, ФБУЗ Управлений и Центров гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, лечебно-профилактических учреждений, ветеринарной службы и др.

Институт располагает квалифицированными профессорско-преподавательскими кадрами, обеспечивающими подготовку по всем циклам дисциплин, в соответствии с требованиями Рособрнадзора. Учебно-методическое и информационное обеспечение об-

разовательной деятельности осуществляется за счет приобретения новых современных изданий и путем выпуска собственной учебной литературы как на бумажных, так и электронных носителях. Оборудование учебных лабораторий обеспечивает возможность реализации всех заявленных в лицензии образовательных программ.

Проведение учебного процесса по вопросам профессиональной переподготовки и повышения квалификации специалистов проводится в соответствии с разработанными типовыми учебными программами для подготовки и повышения квалификации кадров, в том числе специалистов специализированных противоэпидемических бригад (СПЭБ), утвержденными Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, в частности:

Бактериология. Основы безопасной работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) I-II групп

Эпидемиология. Основы безопасной работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) I-II групп

Лабораторное дело. Особо опасные инфекции

Эпидемиология. Инфекционные болезни, требующие проведение мероприятий по санитарной охране территории Российской Федерации

Биологическая безопасность

Подготовка личного состава специализированных противоэпидемических бригад для работы в чрезвычайных ситуациях

Программа курсов повышения квалификации врачей-бактериологов и эпидемиологов по вопросам противодействия биотерроризму

Подготовка специалистов по Международным медико-санитарным правилам (2005 г.) и санитарной охране

территории Российской Федерации

Бактериология. Инфекционные болезни, требующие проведения мероприятий по санитарной охране территории Российской Федерации

Оценка знаний слушателей проводится после каждого пройденного цикла программы в форме зачетов, в конце обучения - заключительного государственного экзамена. По окончании курсов слушателям выдаются документы государственного образца.

Обучение слушателей основным правилам работы с ПБА I-IV групп патогенности – первоочередной и один из важнейших разделов всех образовательных программ. Теоретическая его часть составлена в соответствии с Санитарно-эпидемиологическими правилами (СП 1.3.1285-03) «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)» и СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

В ходе представления материала акцентируется внимание на вопросах организации работы режимных лабораторий, защиты от инфицирования биологическими поражающими агентами, методах и средствах обеззараживания различных объектов, основных методических приемах безопасной работы с материалом, зараженным или подозрительным на зараженность возбудителями I – II групп патогенности, при проведении бактериологических, иммуносерологических, молекулярно-генетических исследований.

Обучение слушателей проводится согласно составленному расписанию, включающему теоретические и практические занятия, семинары. При проведении практических занятий 1 преподаватель курирует 5 курсантов. Перед началом работы преподаватель ста-



вит цель и задачи каждого занятия, дает объяснение материала, методик работы с конкретизацией каждого этапа исследования, обучает правильному ведению необходимой документации.

Вопросам безопасной работы с ПБА уделяется большое внимание с первого дня обучения и до конца цикла. При этом общие положения Санитарно-эпидемиологических правил работы с микроорганизмами I-II и III-IV групп патогенности, планировка, оборудование лабораторий, порядок работы в них, виды допуска сотрудников к работе, виды аварий и мероприятия по ликвидации их последствий и т.п. излагаются в виде лекций, остальные разделы обсуждаются на практических занятиях в виде объяснений с одновременной демонстрацией соответствующих методических приемов безопасной работы.

# **1. ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ОРГАНИЗАЦИИ РАБОТ В БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРИЯХ**

## **1.1. Требования к помещению и оборудованию лабораторий**

Вся работа с патогенными микроорганизмами проводится в лабораториях, которые, в зависимости от основных задач, могут быть научно-исследовательскими, диагностическими или производственными. Кроме того, лаборатории, как правило, специализированы и работают преимущественно с той или иной группой микроорганизмов (бактериальная, вирусная, риккетсиозная, грибковая и др.). Существует и более узкая специализация лабораторий. Например, работа бактериологических лабораторий может быть направлена на изучение анаэробных бактерий, лептоспир, возбудителя туберкулеза и др.

Условия работы лабораторий регламентированы степенью опасности микроорганизмов для человека. По этому признаку выделено четыре группы возбудителей инфекционных заболеваний.

Группа I - возбудители особо опасных инфекций: чума, натуральная оспа, лихорадка Ласса, Эбола и др.

Группа II - возбудители высококонтагиозных бактериальных, грибковых, вирусных инфекций: сибирская язва, туляремия, бруцеллез, холера, лихорадка Скалистых гор, сыпной тиф, бешенство. В эту группу включен бластомироз, ботулотоксин.

Группа III - возбудители бактериальных, грибковых, вирусных и протозойных инфекций, выделенные в отдельные нозологические группы (возбудители коклюша, столбняка, ботулизма, туберкулеза, кандидоза, малярии, лейшманиоза, гриппа, полиомиелита и др.). В эту группу включены аттенуированные штаммы

бактерий I, II и III групп.

Группа IV- возбудители бактериальных, вирусных, грибковых септицемий, менингитов, пневмоний, энтеритов, токсикоинфекций и острых отравлений (возбудители анаэробных газовых инфекций, синегнойной инфекции, аспергиллеза и амебиаза; аденовирусы, герпес-вирусы и др.), относящиеся к условно-патогенным микроорганизмам.

Важнейшей особенностью работы в микробиологических лабораториях является риск инфицирования персонала и возможность заражения окружающей среды. Исходя из этого, лаборатории подразделяются, по классификации ВОЗ, на четыре группы риска.

Первая группа риска: лаборатории особого режима работы (максимально изолированные) с высоким индивидуальным и общественным риском.

Вторая группа риска: лаборатории (изолированные) с высоким индивидуальным и низким общественным риском.

Третья группа риска: базовые (основные) лаборатории с умеренным индивидуальным и ограниченным общественным риском.

Четвертая группа риска: базовые (основные) лаборатории с низким индивидуальным и общественным риском.

Большая часть микробиологических лабораторий работает с патогенными биологическими агентами (ПБА) III и IV групп и только специализированные лаборатории с возбудителями I и II групп патогенности.

Любая микробиологическая лаборатория, в которой проводится работа с патогенными микроорганизмами, должна соответствовать принятым нормам и правилам и располагать соответствующими оборудованием и материалами для исследования, а также иметь подготовленные кадры.

Особые требования предъявляют к лабораториям, в

которых проводят работу с ПБА I-II групп патогенности – микроорганизмами (бактериями, вирусами, риккетсиями, грибами, хламидиями), включая генно-инженерно-модифицированные; ядами, биологического происхождения (токсинами); любыми объектами и материалами (полевой, клинический, секционный), подозрительными на содержание перечисленных агентов (СП 1.3.1285-03). Эти лаборатории размещают в отдельно стоящем здании или в изолированной части здания. Желательно располагать такие лаборатории на окраине города или за его пределами, а территорию, на которой расположена стационарная лаборатория, ограждать забором с камерами видеослежения. Лабораторию обеспечивают круглосуточной военизированной охраной, средствами сигнализации и пожаротушения. Входная дверь лаборатории обозначена знаком «Биологическая опасность», и должна быть постоянно закрыта. На окна первого и цокольного этажей здания устанавливают металлические решетки.

Лабораторию обеспечивают, не нарушая правил безопасности, водопроводом, канализацией, электроэнергией, отоплением, вентиляцией и телефонной связью. Желательно иметь отдельный вход для выполнения производственной работы (доставка чистых биопробных животных, фуража и другого чистого материала).

Помещение лаборатории разделяют на «заразную» зону, где проводят манипуляции с ПБА и их хранение, и «чистую» зону, где не работают с ПБА. В «заразной» зоне располагают блок для работы с инфицированными животными (вскрытие, заражение, зоолого-паразитологические исследования); боксированные помещения для различных микробиологических манипуляций; комнаты для иммуно-серологических исследований; помещение для ПЦР-диагностики; комнаты, оснащенные

ные боксами биологической безопасности (БББ), для работы, связанной с высоким риском образования аэрозоля (центрифугирование, гомогенизация, измельчение, интенсивное встряхивание, обработка ультразвуком, вскрытие ампул с ПБА, манипуляции с большими объемами и концентрациями ПБА); автоклавная для обеззараживания материала; термальная (при необходимости); комната для ведения записей; туалет.

Набор помещений и их оснащение могут варьировать в зависимости от целей и задач лаборатории.

В «чистой» зоне предусмотрены: гардероб для верхней одежды, препараторская, моечная, средоварня, стерилизационная, помещение с холодильной камерой, кабинеты для работы с документами, подсобные помещения, туалет. Вход в «заразную» зону и выход из нее осуществляют через санитарный пропускник. При входе обязательно полное переодевание сотрудников в специальную одежду, при выходе перед переодеванием в личную одежду персонал проходит целевую санитарную обработку.

Помещение, где непосредственно проводится работа с ПБА, герметизируют и оснащают автономной системой приточно-вытяжной вентиляции, изолированной от других вентиляционных систем здания. Эту систему вентиляции оборудуют на выходе (каскадом фильтров) и на входе фильтрами тонкой очистки (ФТО), проверенными на защитную эффективность. Периодически, по плану, контролируют эффективность работы фильтров. Эксплуатацию систем приточно-вытяжной вентиляции лабораторий осуществляют в соответствии с инструкцией, составленной на основании требований соответствующих нормативных документов.

Замену ФТО приточных и вытяжных систем проводят при планово-предупредительных ремонтах при

достижении предельно допустимого перепада давлений, установленных проектом. Перед демонтажем фильтры и магистральный воздуховод обрабатывают парами формалина или аэрозолями дезинфектантов. Снятый фильтр помещают в крафт-мешок или другую упаковку и автоклавируют или сжигают. Работу по демонтажу фильтра проводят в костюме IV типа с использованием респиратора и резиновых перчаток (под рабочими рукавицами).

Проверка боксов биологической безопасности II и III классов проводится при их установке и в процессе эксплуатации (ежегодно).

В помещениях «заразной» зоны лаборатории, за исключением комнат для содержания биопробных животных, в исключительных случаях (работа в условиях жаркого климата) допускается кондиционирование воздуха. При этом кондиционеры устанавливают на приточных вентиляционных системах до ФТО. Категорически запрещается работать с ПБА при включенных кондиционерах.

Водоснабжение лаборатории должно быть обеспечено техническими средствами защиты от подсоса и обратного тока воды. Категорически запрещен слив (сток) необеззараженных жидкостей в общую канализацию. Как правило, сточные воды перед сбросом в общегородской канализационный коллектор обеззараживают химическим, физическим или термическим способами. Периодически (не реже 1 раза в месяц) эффективность обеззараживания контролируют бактериологическим методом, а также проверяют на остаточную концентрацию активного вещества применяемого дезинфицирующего средства.

Лаборатории, проводящие работу с ПБА I-II групп патогенности, обязательно исследуют сточные воды на

содержание в них специфической микрофлоры. Кратность исследования проб сточных вод зависит от вида возбудителя, характера и объема проводимых работ.

Аварийную звуковую и/или световую сигнализацию устанавливают в комнатах, где проводят работу с ПБА. Кроме того, лабораторию оборудуют пожарной сигнализацией и средствами пожаротушения.

Помещение лаборатории должно быть светлым и достаточно просторным для обеспечения безопасного проведения лабораторной работы. Ширина проходов к рабочим местам – не менее 1,5 метров. Стены, потолок, пол должны иметь гладкую поверхность, легко моющуюся, непроницаемую для жидкостей и устойчивую к дезинфицирующим средствам. Стены и потолки окрашивают масляной краской светлых тонов или облицовывают глазурованной плиткой. Полы покрывают нескользкой плиткой, пластиком или линолеумом, тщательно заделывая швы, поскольку помещение должно быть непроницаемым для грызунов и насекомых.

Лабораторное оборудование и мебель должны быть гладкими, без острых краев, шероховатостей и иметь покрытие, устойчивое действию моющих и дезинфицирующих веществ. Для рабочих поверхностей столов используют химически - и термоустойчивые (выдерживающие действие температур до 170 – 200°C) материалы. Следует создать хорошую освещенность для всех видов работ, обратив внимание на нежелательность бликующих поверхностей. Согласно рекомендациям *IES – RP – CC012* (США), типовые значения освещенности должны составлять 770 – 880 лк на высоте рабочего места.

Если окна лаборатории ориентированы на юг, необходимо предусмотреть защиту рабочих столов от пря-

мых солнечных лучей путем использования жалюзи из материала, устойчивого к дезинфектантам.

Лаборатории оснащают вытяжными шкафами, где проводят работу с кислотами, щелочами и растворителями. Вытяжной шкаф оборудуют светильниками, кранами горячей и холодной воды, сигнальной лампой вытяжного вентилятора, заземленными розетками.

Химические реактивы хранят в вентилируемых шкафах из нержавеющей стали или дерева, которые оснащают вентиляционной системой. Скорость потока воздуха в различных моделях должна составлять от 85 до 125 м<sup>3</sup>/ч.

Весы устанавливают на специальные антивибрационные столы, которые позволяют их правильно эксплуатировать.

Приборы, оборудование и средства измерения, используемые в работе лаборатории, должны быть аттестованы, технически исправны, иметь технический паспорт и рабочую инструкцию по эксплуатации с учетом требований биологической безопасности. Средства измерения регулярно подвергают метрологическому контролю. Используемые приборы должны соответствовать нормам безопасности и электромагнитной совместимости.

Работа с ПБА I-II групп может проводиться только в лицензированных лабораториях, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение о возможности проведения определенного вида исследований с конкретными микроорганизмами. Разрешение на работу утрачивает силу, если в лаборатории проведена перепланировка.



## **1.2. Обеззараживание помещений и оборудования лабораторий**

Под микробным обеззараживанием понимается комплекс мероприятий, средств и методов, обеспечивающих снижение воздушного и поверхностного загрязнения рабочих помещений до требуемых уровней. Это понятие более широкое, чем понятие дезинфекция, которая служит лишь одним из элементов микробного обеззараживания.

Для обеззараживания различных объектов имеется большой выбор дезинфицирующих средств, а также комбинаций дезинфектантов и детергентов с приемлемой бактерицидной активностью и незначительным коррозионным действием. Однако средства и методы обеззараживания определяются в каждом конкретном случае в зависимости от вида ПБА и характера обрабатываемого объекта (СП 1.3.1285-03).

Например, при работе с вегетативными формами бактерий I – II групп патогенности обеззараживание поверхностей (стол, оборудование, стены, двери) в помещениях «заразной» зоны лаборатории проводят 1% раствором хлорамина Б, 3% раствором перекиси водорода (время экспозиции 60 мин), 0,2% раствором ДП-2 (экспозиция 30 мин) или другим дезинфицирующим средством, обладающим бактерицидной активностью в отношении указанных агентов.

Режим обеззараживания аналогичных объектов в лаборатории, проводящей исследование со спорообразующими бактериями, отличается. В этом случае стол, стены, двери, оборудование др. протирают двукратно с интервалом 30 мин 6% раствором перекиси водорода с 0,5% моющего средства (экспозиция 120 мин) или двукратно с интервалом 30 мин орошают 1% активированным раствором хлорамина Б (экспозиция 120

мин), используя гидропульт, автомакс или распылитель типа «Квазар» (рис. 1).

Каждая серия поступающего в лабораторию дезинфицирующего средства должна проверяться на бактерицидную активность и процентное содержание активного вещества. Так, содержание активного хлора (АХ) в хлорамине Б должно быть не менее 24%. Перекись водорода медицинская может быть использована с содержанием перекиси водорода не менее 30%.

Дезинфицирующие растворы для лабораторного использования готовит лаборант или дезинфектор под руководством врача или научного сотрудника в специально оборудованном помещении, надев халат, очки, маску, резиновые перчатки. Сроки использования готовых (рабочих) дезинфицирующих растворов регламентированы нормативными документами. Например, рабочий раствор велтолена, хлорамина необходимо менять на свежеприготовленный каждый день.

В лаборатории хранят не менее чем недельный запас дезсредств. Следует отметить, что запрещено одновременное использование 6% раствора перекиси водорода и 3% раствора хлорамина в пределах лаборатории в связи с взрывоопасным характером протекания химической реакции при смешивании этих растворов.

Спецобработка помещений, оборудования и различных объектов лаборатории подразделяется на ежедневную (текущую) и периодическую (генеральную). В случае возникновения аварии, при которой создается реальная или потенциальная возможность попадания ПБА в воздух или на поверхность оборудования лаборатории, обеззараживание проводится незамедлительно.

Текущую дезинфекцию рабочих поверхностей в микробиологических комнатах (боксах) проводит лаборант под контролем врача, используя соответствую-

ющий виду ПБА дезинфектант и режим обработки. После необходимой экспозиции младший персонал под наблюдением лаборантов делает влажную уборку помещения.

Каждую рабочую зону лаборатории обеспечивают индивидуальным промаркированным набором уборочного инвентаря, который не разрешается использовать для уборки других помещений. После каждой уборки ветошь обрабатывают дезраствором, прополаскивают в воде и просушивают. Емкости также подвергают обработке.

Еженедельно в помещениях «заразной» зоны проводят генеральную уборку, используя дезинфицирующие средства. Протирают стены на высоту до 2 м, мебель, приборы, аппараты и др. Термостаты и холодильники (после очищения от наледи) один раз в месяц подвергают дезинфекционной обработке.

После влажной уборки проводят обеззараживание воздуха и поверхностей помещений «заразной» зоны ультрафиолетовыми лучами (УФ).

Бактерицидным действием обладает ультрафиолетовое излучение с диапазоном длин волн 205-315 нм, которое проявляется в деструктивно-модифицирующих фотохимических повреждениях ДНК клеточного ядра микроорганизма, что приводит к гибели микробной клетки в первом или последующем поколении. Однако следует учитывать, что УФ-излучение оказывает на микроорганизмы не только бактерицидное, но и мутагенное действие, приводя к появлению резистентных к данному фактору форм.

Более чувствительны к воздействию ультрафиолетового излучения бактерии в вегетативной форме и вирусы. Менее чувствительны грибы и простейшие микроорганизмы. Наибольшей устойчивостью обладают

споровые формы бактерий.

Бактерицидные лампы вмонтированы в бактерицидные облучатели, которые подразделяются на открытые (потолочные, напольные или настенные), комбинированные (настенные) и закрытые. Открытые и комбинированные облучатели предназначены для обеззараживания помещения только в отсутствии людей или при кратковременном их пребывании в помещении в защитных очках со светофильтрами. Бактерицидные облучатели устанавливаются в соответствии с нормативными документами по их установке и эксплуатации.

Время УФ-облучения зависит от профиля лаборатории, габаритов помещения, типа бактерицидной установки, объекта обеззараживания (воздух, поверхность) и других показателей.

На каждый бактерицидный облучатель заводят журнал регистрации и контроля эксплуатации лампы. В журнале фиксируются время их горения и бактерицидная эффективность облучения.

При оценке бактерицидной эффективности ультрафиолетового облучения воздушной среды помещения или поверхностей в качестве санитарно-показательного микроорганизма принимается *Staphylococcus aureus*. Для контроля обсемененности воздуха в помещениях бактериологических и вирусологических лабораториях может быть использован седиментационный метод. В соответствии с этим методом на рабочий стол ставят две чашки Петри с 2% питательным агаром и открывают их на 15-20 минут. Посевы инкубируют при температуре 37°C в течение 48 часов. При росте не более 4 колоний *S. aureus* на чашке, уровень микробной обсемененности воздуха считается допустимым.

Бактерицидные лампы, отработавшие гарантийный срок службы, указанный в паспорте, должны заменять-

ся на новые. Для определения окончания срока службы могут быть использованы электрические счетчики, суммирующие общую наработку ламп в часах, или замеры радиометров, свидетельствующие о падении бактерицидного потока ниже номинального. Периодически (не реже одного раза в неделю) лампы следует очищать от пыли ветошью, смоченной спиртом.

При экстремальных ситуациях для обеззараживания воздуха и поверхностей в боксированных комнатах «заразной» зоны лаборатории применяют аэрозольную дезинфекцию при условии герметизации помещения и отключении приточно-вытяжной вентиляции.

Аэрозоли представляют собой гетерогенные аэродисперсные системы с размерами частиц жидкой дисперсной фазы от 0,1 до 1 000 мкм. Для аэрозольной дезинфекции выбирают системы с диаметром частиц 5 -25 мкм. Распыление дезинфектанта проводят с помощью пневматической (ПВАН) или тубулирующей (ТАН) аэрозольных насадок. Источником сжатого воздуха для распыления служит компрессор производительностью не менее 300 м<sup>3</sup>/ч при рабочем давлении 3-4 атм или аэрозольный генератор. Можно пользоваться аппаратами типа «Квазар».

При аэрозольной дезинфекции наиболее приемлемы жидкие химические препараты (формальдегид, перекись водорода медицинская, велтолен и др.). Концентрация дезинфектанта и режим обеззараживания зависит от вида ПБА, с которым велась работа в лаборатории.

Во время обеззараживания аэрозоль заполняет обрабатываемое помещение, оседает мельчайшими каплями на поверхностях стен, пола, оборудования и воздействует на обсеменяющие их микроорганизмы. Частично аэрозольные капли испаряются и в виде пара проникают в трудно доступные места.

При работе с формальдегидом после необходимой дезинфекционной экспозиции следует провести его нейтрализацию раствором аммиака.

Персонал, проводящий обработку, должен иметь кроме халата средства защиты органов дыхания, глаз и кожи.

### **1.3. Обеззараживание и утилизация отходов деятельности лаборатории**

Все отходы деятельности лаборатории по степени эпидемиологической и токсикологической опасности подразделяются на следующие классы (СанПиН 2.1.7.2527-09, СанПин 2.1.7.728-99):

- класс А (неопасные) – отходы, не имеющие контакта с зараженными или условно зараженными ПБА I-IV групп патогенности (различная макулатура, упаковочный материал, негодная мебель, строительный мусор и др.);

- класс Б (опасные) – биологические отходы вивариев, иммуноклиник, мусор из помещений лаборатории, где не проводится работа с живыми ПБА I-IV групп патогенности, стеклянная лабораторная посуда из препаративных, стерильные отработанные ватно-марлевые материалы, бумажная макулатура из письменных комнат и др.;

- класс В (чрезвычайно опасные) – медицинские отходы из лабораторий, работающих с ПБА I-IV групп патогенности: отработанные посевы, остатки диагностического материала (сыворотки, сгустки крови, трупный материал и др.), вскрытые биопробные животные, остатки их корма, подстилочный материал от экспериментальных животных, пипетки, шприцы, тест-контроли работы автоклавов, ампулы из-под лиофилизированных культур, ватно-марлевый материал, макулатура из письменных комнат и другой отработанный материал, зараженный или подозрительный на заражен-

ность бактериальными и вирус содержащими ПБА;  
- класс Г – просроченные медицинские и иммунобиологические препараты (МИБП), питательные среды с истекшим сроком годности, химические реактивы, ртутьсодержащие предметы, приборы, оборудование.

К отходам деятельности лаборатории, в зависимости от их класса, предъявляют различные требования по обеззараживанию, сбору, временному хранению, транспортированию и утилизации.

Отходы класса А (неопасные) не требуют специального обеззараживания. Их собирают в пластиковые пакеты белого цвета, герметично закрывают и в твердых емкостях (например, баках) с крышками переносят к мусороприемнику для дальнейшего вывоза на полигон твердых бытовых отходов (ТБО).

Отходы класса Б (опасные) подвергают обязательной дезинфекции на месте их образования в соответствии с действующими нормативными документами (СП I. 3.1285-03). Обеззараженные отходы собирают в одноразовую герметичную упаковку желтого цвета. Для твердых отходов, имеющих острые края (битая стеклянная посуда, пипетки и т.п.), используют твердую упаковку, для игл от шприцов используют специальные одноразовые контейнеры. Одноразовые емкости желтого цвета с отходами класса Б маркируют надписью «Опасные отходы – «Класс Б» с указанием названия лаборатории, кода учреждения, даты, фамилии ответственного за сбор отходов лица. Заполненные емкости помещают во влагонепроницаемые баки желтого цвета с той же маркировкой, герметично закрывают крышкой и переносят к металлическим контейнерам, которые размещены на специальной площадке хозяйственного двора учреждения (лаборатории). Дальнейшую утилизацию отходов проводят централизованно



специальным автотранспортом на полигон ТБО или децентрализованно к месту кремации, если учреждение имеет крематорий для сжигания отходов.

Использованные для переноса (перевоза), временного хранения многоразовые емкости (баки, контейнеры) дезинфицируют и моют.

Отходы класса В (чрезвычайно опасные) подвергают обязательной дезинфекции на месте их образования в соответствии с действующими нормативными документами (СанПиН 2.1.7.2527-09, СП 1.3.1285-03; СанПин 2.1.7.728-99). Обеззараживание отходов проводят автоклавированием или обработкой дезрастворами. Эффективность работы автоклавов контролируют с помощью химических (каждый цикл автоклавирования) или биологических (ежемесячно) тестов. Путем автоклавирования обеззараживают жидкие и плотные питательные среды с посевами ПБА I-IV групп патогенности и без посевов; вскрытые ампулы из-под лиофилизированных культур (предварительно обеззараженные в дезрастворе); пробирки, флаконы, колбы с бактериальными взвесями; сыворотки; лабораторную посуду; обгоревшие ватно-марлевые пробки и другой материал, инфицированный или подозрительный на зараженность ПБА I-IV групп.

Жидкие питательные среды с посевами микроорганизмов после обеззараживания автоклавированием разводят водопроводной водой 1:2 и сбрасывают в канализацию. Рабочие растворы отработанных дезсредств после экспозиции в течение не менее 24 ч разводят водопроводной водой 1:2 и сливают в канализацию.

Лабораторные отходы класса В (из блока для работы с инфицированными животными) после обеззараживания в дезрастворах могут содержать ватные и ватно-марлевые тампоны, салфетки, вскрытые трупы мелких



экспериментальных животных, трупы отловленных в природе грызунов, остатки корма и подстилочный материал из садков, где содержались лабораторные животные до и после экспериментов, шприцы, ампулы и флаконы с остатками вакцинных препаратов, сколы концев пастеровских пипеток и ампул и др.

После обеззараживания отходы класса В собирают в одноразовую упаковку красного цвета. Одноразовая упаковка может быть мягкой (пакеты) и твердой (одноразовые емкости). Каждая упаковка маркируется надписью «Чрезвычайно опасные отходы – «Класс В» с указанием названия лаборатории, кода, даты и фамилии ответственного сотрудника. Бактериальные культуры, вирусологически опасный материал, различные острые предметы, экспериментальных животных складывают в твердую герметичную упаковку, нетвердые отходы – в герметичную мягкую упаковку.

Все заполненные емкости укладывают в маркированные водонепроницаемые металлические баки (контейнеры) с плотно закрывающимися крышками и хранят до кремирования в специально отведенном месте в пределах лаборатории. Транспортирование отходов класса В для утилизации осуществляют только в закрытых кузовах специально применяемых для этих целей автомашинах, которые после вывоза подвергаются спецобработке.

Подготовку обеззараженных отходов лабораторной деятельности к утилизации (сбор, упаковка, герметизация, размещение в емкости для временного хранения) осуществляет ответственное лицо из числа работников лаборатории в средствах индивидуальной защиты (противочумный костюм III типа, дополненного при необходимости респиратором и прорезиненным фартуком).

Отходы лаборатории класса Г по степени токсично-

сти делятся на следующие подклассы (Сан ПиН № 4286-87, Приказ МПР РФ от 02.12.2002 г. № 786):

- 1 – ртуть, термометры, лампы люминесцентные
- 2 – масла, серная кислота, электролиты
- 3 – медицинские отходы
- 4 – картонная упаковка

Использованные люминесцентные лампы, ртутьсодержащие приборы собирают в закрытые влагонепроницаемые емкости черного цвета с маркировкой «Отходы – «Класс Г» и хранят в специально выделенном помещении до утилизации, которая осуществляется в соответствии с действующими нормативными документами. Если во время работы повреждена целостность ртутьсодержащих приборов или термометров и ртуть вылилась, необходимо немедленно провести демеркуризацию.

Масла, минеральные (хлороводородная, азотная, серная) и сильные органические кислоты, щелочи утилизируют согласно действующим нормативным документам.

Вакцинные, диагностические и лекарственные препараты с истекшим сроком годности после обеззараживания путем автоклавирования измельчают, помещают в пакеты черного цвета и хранят до утилизации в водонепроницаемом герметически закрытом контейнере с маркировкой «Отходы – «Класс Г». В эти же контейнеры складывают ненужную картонную упаковку в мягких одноразовых маркированных пакетах черного цвета. Вывоз этих отходов на полигон ТБО осуществляют централизованно специализированным автотранспортом.

## 2. СРЕДСТВА ЗАЩИТЫ

Основным правилом работы в режимных лабораториях является эффективная первичная изоляция персонала от ПБА, которая обеспечивается использованием одного (или более) из перечисленных средств:

- средства индивидуальной защиты (СИЗ)
- боксы биологической безопасности (БББ)
- изоляты из гибкой пленки аналогичного боксам стандарта.

Любые лабораторные манипуляции с микроорганизмами приводят к их рассеиванию в большей или меньшей степени во внешнюю среду. В связи с этим все работники микробиологических и вирусологических лабораторий, вне зависимости от их устройства и оборудования, должны применять средства индивидуальной защиты. Это предполагает использование той или иной спецодежды: противочумного костюма, пневмокостюма (типа «Антибелок»), изолирующего костюма типа КЗМ-1 с противогазом, пневмошлема, различных респираторов и т.п. Тип применяемой спецодежды зависит от вида ПБА, с которым ведется работа, и характера выполняемых манипуляций.

Например, при работе в стационарных, полевых или передвижных лабораториях сотрудники надевают противочумные костюмы I-IV типов, изолирующие костюмы типа КЗМ-1 и другие, разрешенные к применению защитные средства (рис. 1,2). В стационарных максимально изолированных лабораториях при работе с ПБА I-II групп патогенности персонал использует пневмокостюмы типа «Антибелок-5», пневмосистемы (типа ЛИЗ) или их аналоги (рис. 3,4,5).

При экстремальных ситуациях (например, авариях) работники применяют аварийный комплект защитной одежды типа Л-1, «Корунд» или их аналоги с

фильтрующим противогазом (рис. 1,6).



Рис.1.  
Костюм изолирующий с автономным обеспечением подачи воздуха.



Рис. 2.  
Одноразовый костюм «Тайкем».



Рис.3.  
Защитный костюм «Кварц».



Рис. 4.  
Комбинезон защитный и панорамная полумаска со сменными фильтрами.



Рис.5.  
Защитный колпак с принудительной подачей воздуха.



Рис. 6.  
Защитный костюм «Л-1».

Существуют 4 основных типа противочумных костюмов: *I тип* – комбинезон (пижама), носки, тапочки, большая противочумная косынка (120 x 120 x 150 см) или капюшон, противочумный халат, ватно-марлевая маска (из марли 125 x 50 см со слоем ваты 25x17x1,5 см весом 20 г) или противопылевой респиратор, или фильтрующий противогаз, плотно прилегающие очки-консервы или полимерная пленка одноразового использования (17 x 39 см с учетом 6 см с каждой стороны для привязывания тесёмок длиной по 30 см), резиновые перчатки, сапоги резиновые или водонепроницаемые бахилы, полотенце. При необходимости (вскрытие трупов людей или крупных животных) дополнительно надеваются прорезиненные фартук, нарукавники и вторая пара перчаток.

*II тип* – комбинезон (пижама), носки, тапочки, большая косынка (капюшон), противочумный халат, ватно-марлевая маска (респиратор), резиновые перчатки, сапоги (водонепроницаемые бахилы), полотенце. Отличается от костюма I типа отсутствием очков.

*III тип* - комбинезон (пижама), носки, тапочки, большая косынка, противочумный халат, резиновые перчатки, защитная обувь (глубокие галоши, сапоги или водонепроницаемые бахилы), полотенце.

*IV тип* – комбинезон (пижама), носки, тапочки, шапочка (малая косынка), противочумный (хирургический) халат.

Разработан порядок надевания и снятия противочумного костюма.

К работе в пневмокостюмах допускаются только лица, не имеющие медицинских противопоказаний к ношению этого типа защитной одежды, прошедшие специальное обучение, инструктаж по правилам работы и сдавшие зачёт. На централизованном специальном участке перед использованием пневмокостюм проверяют на целостность, а комплектные к ним фильтры ТОВ (В-0,4) – на оценку коэффициента проскока и фиксируют результаты в специальном журнале. Сотрудник лаборатории получает пневмокостюм под личную роспись и визуально проверяет его на целостность перед непосредственной работой. В соответствующих инструкциях регламентируется порядок надевания-снятия пневмокостюмов и правила работы в них.

После использования пневмокостюмы обрабатывают в дезинфицирующей душе, в парагазовых передаточных камерах и затем проверяют на целостность.

Для защиты органов дыхания надевают различные респираторы. Респираторы-капюшоны положительного давления представляют собой легкий капюшон из прозрачного материала, покрывающий голову, шею и плечи. Подача воздуха осуществляется из переносных баллонов со сжатым воздухом (запас воздуха на 15-20 мин) или через шланги, связанные с небольшим компрессором с ВД (высокого давления) - фильтрами,

который питается от батарей. Продолжительность их работы (6-7 ч) зависит от качества фильтров.

Маска-респиратор закрывает большую часть лица, обеспечивая надежную защиту глаз и дыхательных путей. Маска может иметь одновременно биологический фильтр системы ВД и химический патрон. Наличие химического патрона не обязательно, если респиратор применяется при биологической защите. Маска-респиратор должна плотно прилегать к лицу, чтобы обеспечить необходимую герметичность. При слабом натяжении крепящих маску лент вдыхаемый воздух минует фильтрующие элементы и снижает защитную способность маски. В помещениях, где содержание кислорода не соответствует нормативам, не разрешается применять респираторы с химическим патроном.

Полумаска-респиратор не защищает глаза, прикрывая только рот и нос. Блок с фильтрами системы ВД, размещенный сбоку маски, обеспечивает лучшую видимость, чем в случае его расположения впереди. Наличие химического фильтра-патрона в полумаске-респираторе необязательно, если нет угрозы применения ОВ.

При необходимости защитить глаза можно использовать «очки-консервы», которые должны плотно прилегать к коже в области глаз.

Если нет опасности воздушной микробной инфекции для защиты глаз от химических веществ (в виде брызг) можно рекомендовать специальные козырьки (щитки). Козырьки должны полностью закрывать лицо и при необходимости легко откидываться назад.

Большинство лабораторных манипуляций, когда смешивают, встряхивают, измельчают или центрифугируют инфицированный материал, сопровождается образованием случайных аэрозолей. Неправильная



работа бактериологической петлей, пипеткой также создают целый ряд возможностей образования аэрозолей. Использование современных защитных боксов при работе с инфицированными материалами обеспечит удержание и контролируемое удаление из рабочей зоны образовавшихся аэрозолей. Выбор конструкции защитного бокса определяется степенью опасности ПБА, с которым предстоит работа.

Различают боксы с частичным удержанием микроорганизмов (боксы I и II классов) и с полным их удержанием или изолирующие боксы (III класса).

Эффективность боксов биологической безопасности (БББ) контролируется проверкой работы фильтров, определением скорости потока воздуха, надежностью общей изоляции и других инженерно-технических характеристик.

БББ I класса – это открытая спереди рабочая камера с принудительным удалением через ВД-систему отработанного воздуха. Удаляемый воздух очищается от частиц аэрозоля в предфильтре и в специальном фильтре тонкой очистки (ФТО) и выводится в центральную вытяжную систему лаборатории. Скорость движения воздуха в проёме передней панели бокса должна составлять 0,5-1,0 м/с, а высота проёма  $\approx$  20 см. Снижение или повышение скорости движения воздуха в проёме недопустимо.

Боксы I класса предназначены для работы с агентами низкой (микроорганизмы, которые обычно не вызывают заболеваний человека или животных) или умеренной (микроорганизмы, которые могут вызывать не представляющее серьезной опасности заболевание человека или животного и риск распространения инфекции невысокой) степени риска, согласно классификации ВОЗ.

Боксы II класса представляют собой защитные кон-



струкции также с проёмом в передней панели для рук работающего. В этих боксах создается нисходящий вертикальный ламинарный воздушный поток благодаря рециркуляции части засасываемого в бокс воздуха. Рециркулируемый и выводимый из бокса воздух очищается в высокоэффективных аэрозольных фильтрах.

Разработано два типа БББ II класса: тип А и тип Б. В боксах типа А минимальная скорость поступающего воздуха через рабочий проём высотой 20 см составляет 0,4 м/с. Скорость вертикального нисходящего потока воздуха внутри камеры такая же. Конструкция обеспечивает рециркуляцию около 70% всего воздуха. В боксах типа Б воздух поступает внутрь устройства через изменяемый по вертикали рабочий проём со скоростью 0,5 м/с, а средняя вертикальная скорость нисходящего потока воздуха внутри камеры равна 0,25 м/с. Эта конструкция обеспечивает удаление около 70% всего воздуха, протекающего через рабочую зону, и является предпочтительней конструкции типа А, поскольку исключает накопление в высоких концентрациях опасных и токсичных агентов при работе с ними. Эффективная работа защитных боксов II класса достигается только при хорошо сформированном и тщательно поддерживаемом ламинарном потоке воздуха.

Все манипуляции в боксах проводятся ближе к задней стенке камеры на специальных поддонах с салфетками, смоченными дезинфицирующим раствором.

Работа с ПБА проводится в противочумном костюме IV типа, поскольку не исключается загрязнение рук экспериментатора, необходимо использование резиновых перчаток. После окончания работы все извлекаемые из боксов предметы и материалы подвергаются предварительному обеззараживанию непосред-

ственно в боксах путем протирания или погружения в соответствующие дезинфицирующие растворы и заключительной дезинфекции вне боксов. СИЗ после окончания работы помещают в контейнеры для последующего обеззараживания.

Защитные боксы II класса используют для работ с микроорганизмами низкой категории риска, если лабораторные манипуляции сопровождаются массовым образованием аэрозолей, или агентами с высоким уровнем риска для индивида и низким – для общества.

В боксах БББ II Б класса проводят диагностические исследования, связанные с изоляцией вирусов и риккетсий II группы патогенности. Если в помещении блока для работы с животными отсутствует приточно-вытяжная вентиляция или фильтры тонкой очистки на выходе вытяжной вентиляции, разрешается проводить работу с инфицированными (кроме вирусов I группы патогенности) животными в боксах БББ II (А, Б) класса, а исследование на чуму – в боксах БББ II Б или III класса.

Защитные боксы III класса – полностью изолированная воздухонепроницаемая камера, внутри которой создается пониженное давление (на 0,1-0,24 кПа ниже окружающего), что обеспечивает надежный барьер между инфицированным материалом и экспериментатором. Резиновые перчатки плечевого типа герметично заделаны в передней, а иногда и задней (при боксах двустороннего типа) панелях камеры. Засасываемый в бокс и выводимый из него вентилятором воздух очищается в предфильтре и в двух последовательно установленных высокоэффективных фильтрах. Жидкие отходы из бокса собирают в специальную емкость и подвергают термической обработке.

Для проведения специальных исследований боксы

III класса можно объединять в защитные технологические линии. Эти линии оснащают изолированными от окружающей среды и друг от друга инкубаторами, центрифугами, измельчителями, гомогенизаторами, рефрижераторами и другим оборудованием и приборами. Возможно изолированное содержание подопытных животных. Соединение отдельных элементов в линии осуществляется с помощью камер-шлюзов.

Камеры-шлюзы могут быть оформлены в виде автоклавов проходного типа. Места ввода коммуникаций и соединения боксов между собой герметизируют, чтобы исключить возможность утечки аэрозолей, как при работающих вентиляторах, так и в случае их неисправности или перерыва в подаче электроэнергии.

Перед началом работы в боксе включают вентиляцию, проверяют наличие отрицательного давления по шкале боксового манометра, наличие запаса дезинфицирующих средств и загружают материал.

Время непрерывной работы ограничивают четырьмя часами, после которых устанавливают 30-60-минутный перерыв.

Защитные боксы III класса предназначены для работы с ПБА любого уровня опасности, являясь в этом отношении универсальными для всех современных микробиологических и вирусологических лабораторий.

Максимально изолированные лаборатории оборудуют боксами биологической защиты III класса. В них проводят исследование материала от больных людей с подозрением на особо опасное инфекционное заболевание, заражение культур ткани, членистоногих (на биомембране), биопробных животных (материалом из объектов окружающей среды, диких грызунов и членистоногих), заражение и вскрытие куриных эмбрионов, постановку серологических реакций с необеззаражен-

ными пробами. Исследование материала от больных с неясной этиологией, когда невозможно исключить наличие вирусов I группы патогенности, также проводят в БББ III класса.

В БББ III класса или отдельных боксированных помещениях проводят все манипуляции, связанные с высоким риском образования аэрозоля: центрифугирование, гомогенизация, измельчение, интенсивное встряхивание, обработка ультразвуком, вскрытие объектов с зараженным материалом, работа с большими объемами и высокой концентрацией ПБА и др.

Микологические лаборатории также оборудуют БББ III класса, поскольку отдельные манипуляции при работе с возбудителями глубоких микозов требуют максимальной изоляции. Так, все манипуляции с культурами мицелиальной фазы, изучение выживаемости грибов во всех фазах проводят в БББ III класса. Не разрешается открывать пробирки и матрасы с посевами мицелиальной фазы грибов вне БББ.

При работе в БББ III класса сотрудники надевают противочумный костюм IV типа дополненный резиновыми перчатками.

Изоляторы отрицательного давления из мягкой пленки представляют собой в основном бокс биологической безопасности III класса. Эта конструкция выполнена в виде мешка из мягкой пленки, смонтированного и укрепленного на металлической раме. В переднюю стенку изолятора герметично заделаны резиновые перчатки плечевого типа. Ввиду недостаточной прочности его использование ограничено. Только хорошо обученный и опытный персонал может быть допущен к работе с этим оборудованием.

### **3. МЕТОДИЧЕСКИЕ ПРИЁМЫ И ОСОБЕННОСТИ РАБОТЫ С ВОЗБУДИТЕЛЯМИ I-II ГРУПП ПАТОГЕННОСТИ**

#### **3.1. Организация рабочих мест и особенности методических приемов при посеве инфицированного материала**

Безопасность работ с возбудителями особо опасных инфекций обеспечивается строгим соблюдением правил работы, требованием к лабораторным помещениям и их оснащению (см. выше), обучением и тренировкой персонала, а также диспансерным наблюдением за состоянием здоровья сотрудников. К работе с ПБА допускаются лица не моложе 18 лет с высшим и средним медицинским, биологическим, ветеринарным образованием, которые окончили соответствующие курсы профессиональной переподготовки и не имеют противопоказаний к лечению специфическими препаратами и к работе в СИЗ. Сотрудников лаборатории, работающих с ПБА (кроме возбудителя холеры) и посещающих помещения «заразной» зоны, где ведутся исследования с заразным материалом, вакцинируют, предварительно проведя оценку уровня иммунитета одним из стандартных методов до и после вакцинации (ревакцинации). В исключительных случаях (наличие эффективных специфических средств лечения и длительный опыт работы с ООИ) к работе допускают лиц, имеющих медицинские противопоказания. Сотрудник лаборатории обязан немедленно сообщать руководителю подразделения о появлении симптомов заболевания, вызываемого возбудителем, с которым проводились исследования. В этом случае руководитель учреждения решает вопрос о необходимости изоляции и проведении специфического лечения.

Микробиологические лаборатории, в зависимости

от их назначения, имеют тот или иной набор помещений: боксы с предбокскими, комнаты для проведения серологических исследований и люминесцентной микроскопии, помещение для ПЦР-диагностики и др.

Боксы с предбоксами, где проводятся манипуляции с ПБА, должны быть достаточно просторны, оснащены только необходимыми лабораторной мебелью и приборами. У входной двери помещают смоченный дезинфицирующим раствором коврик. Входная дверь бокса и все объекты с ПБА обозначены знаком биологической безопасности. В предбоксах, оснащенных водопроводом и раковиной для мытья рук, желательно с краном ножного управления, персонал одевает и снимает СИЗ. На случай аварии в предбоксах предусмотрены емкости с дезинфицирующим средством и гидропульт.

Оснащение бокса должно способствовать предупреждению контакта исследователя с инфицированным материалом. Оборудование (в том числе лабораторные столы) изготавливается из материалов, непроницаемых для жидкостей, устойчивых к коррозирующему действию дезинфицирующих средств.

Некоторые виды лабораторной работы и использование того или иного оборудования могут создавать опасность заражения бактериолога. Обычная проволочная бактериологическая петля, являясь традиционным лабораторным инструментом, при неправильном и невнимательном использовании может приводить к образованию аэрозоля. При быстром прожигании петли с жидким инфицированным материалом происходит его вскипание, пленка лопается и образуется бактериальный аэрозоль. Для предотвращения этого явления предложены газовые и электрические приспособления для прожигания петли в экранированном простран-

стве. Безопасной альтернативой является применение пластиковых петель одноразового использования.

Предотвратить образование аэрозолей при обжиге бактериологической петли может применение правильной техники обеззараживания. Петлю подносят к пламени горелки так, чтобы между ней и оператором находилось пламя горелки. Осторожно нагревают сначала иглодержатель, затем саму петлю в нижней части пламени (где наиболее низкая температура) и постепенно переводят петлю в верхнюю часть пламени спиртовки. Таким образом, петлю прокаливают докрасна 2-3 раза.

Образованию аэрозолей при работе с бактериологической петлей способствует оставленное при изготовлении незамкнутым проволочное кольцо петли. Стандартная бактериологическая петля имеет диаметр замкнутого кольца 3 мм и, так называемый, хвостик, не превышающий 6 см.

Аварийная ситуация возникает, когда экспериментатор неправильно (без предварительного осторожного подсушивания) обжигает петлю с остатком агаровой бактериальной культуры: материал может обуглиться, отскочить от петли и упасть на стол. В этом случае необходимо прекратить работу, осмотреть поверхность стола, найти упавший комочек и убрать его с помощью пинцета и ватного тампона, смоченного в дезинфицирующем растворе, т.к. внутри комочка микроорганизмы остаются жизнеспособными. На место падения патогена накладывают свежий тампон с дезсредством на 1 час, а находящиеся на столе предметы обрабатывают дезинфицирующим раствором. Ватные тампоны, бывшие в употреблении, опускают в емкость для отходов с дезраствором.

Не исключается образование бактериальных аэрозо-

лей при посевах жидкой культуры и отборе с чашек Петри колоний микроорганизмов, если пользоваться не остывшей петлей. Во избежание этого достаточно работать одновременно двумя бактериологическими петлями, одна из которых остывает после прожигания, или применять одноразовый инструмент. Не рекомендуется остужать петлю о поверхность плотного агара с посевом во избежание разбрызгивания или гибели патогена, а также возможности его загрязнения посторонней микрофлорой, не заметной невооруженным глазом. Остудить петлю можно прикосновением её к внутренней поверхности крышки чашки Петри.

Образование бактериальных аэрозолей возможно также при изготовлении мазков на предметных стеклах, постановке ориентировочной реакции агглютинации на стекле, смывах бактериальной культуры с поверхности агара, пипетировании инфицированного материала и других манипуляциях, наиболее часто применяемых в практике бактериологических исследований.

До начала работы с материалом, зараженным или подозрительным на зараженность возбудителями инфекционных заболеваний I-II групп патогенности, следует подготовить всё необходимое.

На лабораторном столе справа от центра (условно «заразная» зона) размещают: фиксатор для мазков (банка с притертой или плотно закрывающейся крышкой с фиксирующей жидкостью), ёмкости с дезинфицирующими растворами для погружения отработанных предметных стекол, инфицированных отбросов, обработки рук, большой стерилизатор или высокий стеклянный цилиндр в металлическом корпусе для погружения использованных пипеток; от центра слева (условно «чистая» зона) помещают банки с предмет-



ными стеклами в 96 ° спирте, банку со стерильными и нестерильными ватными тампонами, чашки Петри с ватными тампонами, смоченными 70 ° спиртом (для текущей дезинфекции), бактериологические петли и иглы, пастеровские и градуированные пипетки, пинцет анатомический и скальпель, карандаш (ручка) по стеклу, спички. Все предметы на лабораторном столе расставляют таким образом, чтобы исключить перекрещивание рук в процессе работы и тем самым обеспечить удобство и безопасность манипуляций (рис. 7).

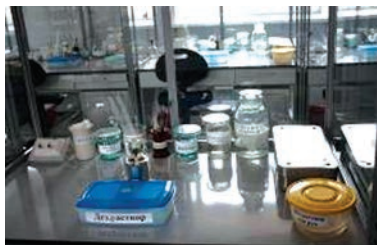


Рис.7. Оборудование лабораторного стола

В центре стола на расстоянии не менее 30 см от края со стороны оператора размещают спиртовку на устойчивой подставке или горелку. Между работающим и спиртовкой на расстоянии не менее 10 см от края стола должна находиться широкая низкая кювета с дезинфицирующим раствором, над которой проводят все манипуляции с жидким материалом.

При работе с агаровой культурой и постановке некоторых лабораторных тестов вместо кюветы используют многослойные марлевые салфетки, смоченные дезинфицирующим средством.

Около бактериологического стола устанавливают бак с педалью или ведро для сбора незаразных отходов. Все ёмкости, используемые в работе, маркируют.

На специальном столике организуют покраску мазков.

Все виды работ с ПБА проводят по принципу парности (не менее двух человек, один из которых врач или научный сотрудник).

В зависимости от целей и задач исследования врач (научный сотрудник) и лаборант заранее готовят всё необходимое для практических занятий. Для проведения посевов отбирают и тщательно осматривают лабораторную посуду, поскольку незамеченный дефект может стать причиной инфицирования посуды, рук, окружающих предметов. Каждую бактериологическую пробирку осторожно простукивают о твердую поверхность, чтобы исключить невидимые трещины. Пробирки выбраковывают, если в стекле видны трещины, царапины, пузырьки воздуха. Колбы и флаконы также подлежат осмотру. Не используют сосуды со сколом в области горлышка. Тщательно осматривают посуду со средами. Если крышка чашки Петри с плотной средой запотела, её заменяют на новую, взяв со стерильной чашки. Визуально просматривают все среды на наличие посторонней микрофлоры. Пробирки со средами предварительно проверяют на целостность и размещают в штативы. Пробирки должны входить в штативы без усилий. Рекомендуют на дно штатива класть фильтровальную бумагу, что позволит быстро обнаружить нарушение целостности пробирки при неосторожной работе. Если пробирки помещают в банку или стакан, то обязательно дно емкости выстилают слоем ваты или марли. Можно взять кружочек поролона. Все объекты, используемые для посева, маркируют: указывают название микроорганизма (материала), номер штамма (анализа), дату (при необходимости – время) проведения работы. В отдельных случаях указывают особенности штамма (антибиотикоустойчивость, вирулентность и др.). Надписи делают таким образом,

чтобы они не мешали в работе: на пробирках – в средней части, флаконах и колбах – ниже горлышка, на чашках Петри – на доньшке чашки по краю. Надписи должны быть четкими.

Необходимые для работы объекты с незаразным материалом (физиологический раствор, дистиллированная вода, бакпрепараты, реактивы) также маркируют. Если посуда с питательными средами подписана, но ещё не засеяна и остаётся на лабораторном столе на какой-то срок, необходимо положить записку: «Подписано, но не засеяно».

Перед работой поверхность лабораторного стола протирают ватным тампоном, смоченным 70° спиртом. С левой стороны стола, отступив от края, помещают среды и исследуемый материал. При необходимости засеять большое количество объектов на стол не ставят всё сразу.

Техника посева зависит от характера высеваемого материала, консистенции питательной среды и цели исследования. Жидкий материал берут петлей или пипеткой. Пипеткой пользуются в том случае, когда материал засевают в большом количестве или точно отмеряемом объеме.

При посеве жидкого материала в жидкие среды обжигают петлю, большим, указательным и средним пальцами левой руки берут пробирку с исследуемым содержимым ниже горлышка так, чтобы рука была сверху, но не мешала наблюдению за движением петли. Пробирку подносят к пламени спиртовки. Безымянным пальцем и мизинцем правой руки захватывают пробку и, прижимая её к ладони, вынимают. После забора материала горлышко пробирки обжигают, пробкуют и возвращают на прежнее место. Применяя такую же технику, проводят посев в пробирку мате-

риала, находящегося на петле. Аналогичным образом засевают флаконы и колбы.

Все манипуляции с заразным материалом проводят у пламени горелки строго над кюветой с дезинфектантом. При посеве в жидкие среды пробирку слегка наклоняют так, чтобы избежать выливания жидкости.

Во время работы бактериологическая петля должна постоянно находиться под визуальным наблюдением, чтобы исключить инфицирование верхней внутренней части пробирки или каких-либо предметов. Желательно оставлять остаток посевного материала прикосновением петли к внутренней стенке пробирки, флакона или колбы ближе к поверхности жидкости. При посеве агаровой культуры в жидкие среды необходимо тщательно растереть комочек посевного материала о внутреннюю стенку пробирки (флакона, колбы), постепенно смывая петлей микробную массу.

В случае попадания материала на внутреннюю верхнюю часть пробирки (флакона, колбы) перед пробкованием необходимо обжечь (прокалить) горлышко посуды, остудить и запробковать. Если пробка при этом обгорит, её следует заменить на новую стерильную. При малейшем подозрении на прикосновение петли к заразному материалу к наружной поверхности посуды её обеззараживают, погружая в дезинфицирующий раствор.

При посеве исследуемого материала на пластинчатый агар чашку Петри держат в левой руке таким образом, что дно её лежит на ладони, а крышка слегка приподнята большим, указательным и средним пальцами (рис. 8). Крышку открывают с таким расчетом, чтобы можно было, не задевая края чашки и внутреннюю поверхность крышки, произвести посев петлей, пипеткой или шпателем. Таким образом, все манипуляции

проводят под защитой крышки. Засеянную бактериологической петлей или шпателем чашку сразу переворачивают крышкой вниз и ставят на стол.



Рис.8. Посев заразного материала на пластинчатый агар

### **3.2. Пипетирование заразного материала**

При посеве бактериальной взвеси, титровании сывороток и проведении других исследований пользуются различными пипетками. Работа с пипеткой, как упоминалось выше, создает целый ряд возможностей образования бактериальных аэрозолей. В ряде случаев бактериолог может заразиться в результате ранения острыми краями или концами разбитой инфицированной пипетки. Наибольшую опасность представляет пипетирование ртом. Вместе с тем строгое соблюдение технических приёмов при проведении лабораторных исследований с помощью пипеток предупреждает или сводит до минимума наиболее распространенные аварийные ситуации. Основное правило при пипетировании – пользоваться специальными устройствами даже при работе с незаразным материалом (розлив физиологического раствора, титрование диагностических сывороток и др.).

Для работы с пипетками разработано и введено в практику много специальных приспособлений. Однако наиболее распространение получил резиновый баллон, герметично соединенный с резиновым шлан-

гом, состоящим из трех отрезков (два по 80-90 см и один 30-40 см). Резиновые трубки соединены между собой двумя так называемыми контролками из пастеровского стекла (4-5 см), рыхло заполненными серой ватой. Они способны задержать исследуемый материал при случайном его засасывании дальше пипетки. В просвет третьего отрезка шланга в 7-15 см от его конца вставлен хорошо опаянный равномерно круглый стеклянный шарик. Его диаметр строго соответствует просвету резиновой трубки. Для удобства работы баллон можно, но необязательно, поместить в деревянную оправу в виде ножной педали. Вместо резиновой груши рекомендуют брать помпу для надувания резиновых изделий.

Перед непосредственной работой смонтированное или не использованное в течение 2-3 дней пипетирующее устройство проверяют на незаразном материале (вода, физиологический раствор).

При пипетировании применяют различную лабораторную посуду, в том числе пипетки: стеклянные градуированные и неградуированные, одноразового использования, пастеровские, изготовленные в лабораторных условиях из стеклянных трубок (дрота) различного диаметра. Для особо точной мерной работы необходимы градуированные пипетки с указанием ГОСТа.

Пипетки должны быть абсолютно чистыми и хорошо обезжиренными. На стекле плохо обезжиренной пипетки при выливании содержимого остается большое количество капель, вследствие чего слитый объем жидкости не будет соответствовать тому количеству, которое указано на шкале деления.

Перед стерилизацией верхнее отверстие пипетки, которое должно быть равномерно оплавлено и не иметь сколов, рыхло заполняют ватой на 10-15 мм. Это не-

обходимо, чтобы задержать заразный материал при случайном засасывании его до конца пипетки. Пипетки упаковывают в специальные металлические пеналы или заворачивают в бумагу индивидуально или по 5-10 штук, делая пометку на пакетах о расположении верхней части пипеток, и стерилизуют.

Необходимую для работы лабораторную посуду тщательно просматривают (см. выше), маркируют и расставляют на столе слева. Слева помещают пипетки, разводящую жидкость, исследуемый материал и др. Правая часть стола остается свободной. Перед работой открывают стерилизатор с дезинфектантом.

Для того чтобы начать пипетирование необходимо нажатием ногой на баллон выпустить из него часть воздуха. При этом одновременно большим и указательным пальцами правой руки сдавливают стенку резинового шланга у бусинки, и в образовавшийся просвет воздух выходит из груши. После этого убирают ногу с резинового баллона. На пипетку надевают конец шланга и располагают ее между средним и безымянным пальцами правой руки. Между большим и указательным пальцами находится шланг с бусинкой, при этом мизинец и безымянный пальцы остаются свободными (рис.9). Левой рукой берут пробирку с жидким содержимым (исследуемый материал, сыворотка и др.), мизинцем и безымянным пальцами правой руки распробковывают её у пламени горелки. Конец пипетки опускают в жидкость и слегка нажимают большим и указательным пальцами на бусинку. В образовавшееся пространство поступает воздух, увлекая за собой материал. После того, как достаточное количество жидкости набрано, шланг над бусиной опускают и она закрывает просвет трубки. Воздух в неё больше не поступает, а жидкость в пипетке удерживается



на нужном уровне. Осторожно, не касаясь внутренней стенки пробирки, вынимают пипетку и, после обжигания горлышка пробирки и последующего пробкования, ставят ее в штатив, далее берут ту пробирку, в которую переносят исследуемый материал. Осторожно, не касаясь стенок пробирки, вводят в неё пипетку. Кончик пипетки опускают ниже уровня жидкости в пробирке и начинают осторожно выпускать содержимое пипетки. Можно сливать материал по внутренней стенке сосуда, надавливая ногой на резиновый баллон и одновременно расслабляя резиновый шланг у бусины. В результате давления на баллон воздух из него поступает в шланг и через щель над бусиной в пипетку, выдавливая из неё жидкость. После посева одновременно убирают ногу с баллона и отпускают бусину. Осторожно вынимают пипетку, обжигают, пробкуют пробирку и возвращают её в штатив. После этого конец пипетки опускают в дезинфектант, находящийся в стерилизаторе, выпускают содержимое и набирают в пипетку на 2/3 объёма дезинфицирующего раствора. Затем осторожно двумя руками снимают шланг пипетирующего устройства и легким движением руки затапливают пипетку.



Рис.9. Пипетирование

Аналогичным образом засевают флаконы и колбы. При посеве исследуемого материала с помощью пи-



петки на пластинчатый агар применяют метод раскатывания или рассева шпателем. После внесения материала чашку Петри, не переворачивая, необходимо поставить на салфетку, смоченную дезраствором, и погрузить пипетку в дезинфектант. Только после этого, держа чашку двумя руками, инокулированный материал осторожно раскатывают по поверхности среды до полного впитывания или распределяют его стерильным шпателем. Стерилизацию шпателя можно провести непосредственно перед рассевом. Шпатель помещают в стакан со спиртом и обжигают его перед непосредственной манипуляцией.

Очевидно, что технически сложно проводить посев пипеткой в пробирки, флаконы, колбы, поскольку в правой руке необходимо держать пипетку и пробку и одновременно работать левой.

Работа в паре более безопасна и удобна. Врач, проводящий пипетирование, садится справа, а помощник, распробковывающий пробирки, флаконы, колбы, распределяющий материал по агару, слева.

При работе с пипеткой надо внимательно следить за тем, чтобы заразный конец пипетки не пачкал горлышко посуды, чтобы с пипетки не падали капли заразного материала на стол и окружающие предметы. Необходимо, чтобы правая рука бактериолога всегда находилась в фиксированном неподвижном положении, а конец пипетки – над центром кюветы с дезраствором. Категорически запрещается подносить пипетку с инфицированным материалом к огню или проводить её через пламя горелки.

В процессе пипетирования не допускаются резкие движения, чрезмерное оттягивание стенки шланга над бусиной, сильное нажатие ногой на баллон.

После окончания пипетирования конец шланга, в ко-

торый вставлялась пипетка, протирают 70 ° спиртом, дезинфектантом или обрабатывают обжиганием после опускания в 96 ° спирт. Периодически всю систему обеззараживают кипячением.

Для работы ножным пипетирующим устройством необходим определенный навык, который обычно приобретается быстро. Ручное пипетирующее устройство более простое и кажется более удобным. Однако ручной баллон более опасен в работе, чем ножное устройство. Поскольку в нем нет предохранителя (бусины), очень трудно во время различных манипуляций с пипеткой, содержащей заразный материал, удерживать грушу в одной и той же степени сжатия. При малейшем нарушении этого условия заразный материал попадает в баллон или выпрыскивается наружу, образуя бактериальный аэрозоль.

### **3.3. Микроскопические методы исследования**

При микробиологической диагностике бактериальных инфекций используют различные методы, в том числе бактериоскопический. Он основан на изучении морфологических признаков возбудителя, тинкториальных свойств, особенностей локализации в тканях и клетках пораженного макроорганизма. Использование специальных методов окраски позволяет выявить некоторые морфологические структуры микроба (наличие спор, включений, капсул, жгутиков и др.).

В микробиологических лабораториях применяют как обычные методы оптической микроскопии окрашенных препаратов, так и специальные: в темном поле зрения, фазово-контрастный, люминесцентный и электронный. Темнопольная микроскопия применяется для обнаружения в неокрашенных препаратах (раздавленная или висячая капли) возбудителей сифилиса,

возвратного тифа, лептоспироза и других болезней, а также для изучения подвижности микроорганизмов (например, холерного вибриона).

Приготовление мазков осуществляют на заранее подготовленном рабочем месте. На лабораторном столе должны находиться только материалы и предметы, необходимые для данного исследования: изучаемый объект, пробирка с физиологическим раствором, бактериологическая петля, пастеровские пипетки, анатомический пинцет, банка с чистыми обезжиренными предметными стеклами, простой карандаш, спиртовка, чашка Петри, салфетка, емкость с дезинфектантом, кювета с дезраствором, на которую устанавливают специальный мостик для размещения предметных стекол.

Отдельно оборудуют место для окраски мазков.

Мазки для микроскопии готовят из культур микробов, выращенных в жидкой питательной среде или на агаре, различного клинического материала (кровь, мокрота, гной, моча, смывы из зева и носа и др.), органов трупа (животного, человека) и др.

На поверхность лабораторного стола расстилают марлевую салфетку, смоченную дезинфицирующим раствором. На салфетку помещают крышку от чашки Петри, на которую кладут предметное стекло. Предметное стекло или несколько стекол можно разместить на мостике. Предварительно на зашлифованном крае стекла простым карандашом делают необходимую маркировку (вид исследуемого материала, номер анализа, дату и др.).

Объекты, из которых предполагают делать мазки, располагают слева от спиртовки.

Техника приготовления препаратов определяется физическими свойствами исследуемого материала. Жидкий материал наносят в центр предметного стекла бактериологической петлей и плавными круговы-

ми движениями распределяют по поверхности в виде кружка диаметром 8-10 мм. Нельзя допускать резких прерывистых движений, которые приводят к разбрызгиванию заразного материала и образованию аэрозоля. Если мазок делают из агаровой культуры, то сначала на предметное стекло бактериологической петлей или пастеровской пипеткой наносят каплю или несколько капель (если на одном стекле делают несколько мазков) физиологического раствора. Затем бактериологической петлей, слегка прикоснувшись к посеву, забирают небольшое количество агаровой культуры и тщательно растирают ее в капле жидкости. Необходимо следить за тем, чтобы заразный материал не располагался близко к краям предметного стекла.

Приготовляя мазки из мокроты или гноя, посуду с исследуемой пробой располагают как можно ближе к предметному стеклу. Исследуемый материал переносят бактериологической петлей или стерильным анатомическим пинцетом на стекло и осторожно растирают в капле физиологического раствора. Категорически запрещается раздавливать исследуемый материал между двумя стеклами.

После подсушивания (на воздухе!) мазков стекла, размещенные на мостике, с помощью анатомического пинцета захватывают за край и над кюветой с дезинфицирующим раствором опускают в емкость с фиксирующей жидкостью. Аналогичным образом поступают с готовыми препаратами, находящимися в чашке Петри.

Категорически запрещается фиксировать мазки в пламени горелки, поскольку микроорганизмы при этом не погибают.

При погружении в фиксирующую жидкость нескольких предметных стекол с мазками, необходимо следить за тем, чтобы они не слипались, иначе не про-

изойдет обеззараживание материала.

Пинцет после каждой манипуляции опускают в спирт, а затем обжигают. Крышку чашки Петри или мостик, которые использовали для приготовления препаратов, также дезинфицируют: мостик протирают влажным тампоном, смоченным в дезинфектанте, а чашку Петри погружают в дезинфицирующий раствор. То же самое делают с марлевой салфеткой. Использованный физиологический раствор подлежит обеззараживанию путем автоклавирования.

В качестве фиксирующей жидкости при исследовании материала, зараженного или подозрительного на зараженность бактериальными возбудителями I-II групп патогенности, используют метиловый или этиловый спирты, смесь Никифорова (равные объемы этилового спирта и эфира), ацетон, пары формалина.

Чаще всего препараты фиксируют в 96 ° этиловом спирте и в смеси Никифорова. Мазки из культуры микроорганизмов фиксируют не менее 20 мин; из материала, содержащего белковое вещество (мокрота, гной и др.), – не менее 40 мин; мазки-отпечатки органов – не менее 1 часа. Мазки из споровой культуры, материала, подозрительного на зараженность спорообразующими бактериями (например, возбудителем сибирской язвы), материала от больных с неясной этиологией необходимо фиксировать в 96 ° этиловом спирте, содержащем 3%  $H_2O_2$ .

После окончания срока фиксации мазка предметное стекло вынимают пинцетом из фиксирующей жидкости и обжигают в пламени спиртовки.

Препараты для МФА вынимают из фиксирующей жидкости и не обжигают. В этом случае время фиксации мазков увеличивают на 5 – 10 минут.

Фиксированные мазки окрашивают. Метод окраски определяется целью и задачами исследования.

Фильтровальная бумага, использованная для просушивания стекол с мазками в процессе окрашивания, подлежит автоклавированию или обеззараживанию в дезинфектанте. Смывные воды (после обработки мазков) обеззараживают в соответствии с видом возбудителя.

Стекла с мазками после просмотра погружают в дезинфицирующий раствор.

Способы окрашивания мазков делятся на простые и сложные. Простая окраска позволяет быстро визуализировать морфологию микробов и их расположение в мазке.

Сложные или дифференциальные методы основаны на особенностях физико-химического строения микробной клетки. Они применяются для детального изучения структуры клетки, а также для характеристики и дифференциации одних видов бактерий от других.

#### *Простой метод окраски.*

Фиксированный мазок красят каким-либо одним красителем, например, фуксином водным (1-2 мин) или метиленовым синим (3-5 мин), промывают водой, высушивают с помощью фильтровальной бумаги и микроскопируют.

#### *Окраска по Граму*

Метод окраски по Граму является самым универсальным из сложных способов окраски. Все бактерии по своему отношению к этому методу разделяются на грамположительные (грамположительные) – окрашивающиеся по Граму (микробы сине-фиолетового цвета) и грамотрицательные (грамнегативные) – неокрашивающиеся по Граму (микробы красно-сиреневого цвета).

Окраска по Граму имеет важное дифференциально-диагностическое значение и широко используется в микробиологии. К грамположительным микроорганизмам относятся стафилококки, стрептококки, возбудители дифтерии, сибирской язвы и др., к грамо-

трицательным – гонококки, менингококки, кишечная палочка, возбудители холеры, чумы, туляремии, бруцеллеза и др.

Основная ошибка, допускаемая при окраски по Граму, состоит в переобесцвечивании мазка этиловым спиртом. В этом случае грамположительные бактерии утрачивают первоначальную окраску генциановым фиолетовым и воспринимают окраску фуксином. Грамотрицательные микроорганизмы в свою очередь могут сохранять сине-фиолетовый цвет. Чтобы избежать этих ошибок необходимо строго соблюдать технику обесцвечивания мазка.

Окраска по Граму проводится следующим образом:

- на фиксированный мазок помещают полоску фильтровальной бумаги 2x4 см и наливают на нее карболово-спиртовый раствор генцианового фиолетового на 1 – 2 мин;
- снимают бумажку, сливают остаток краски, не промывая препарат водой, наливают раствор Люголя на 1-2 мин;
- раствор Люголя сливают, предметное стекло с помощью пинцета погружают 2 – 3 раза в стаканчик со спиртом (до отхождения фиолетовых струек красителя);
- препарат тщательно промывают водопроводной водой;
- докрашивают мазок водно-спиртовым раствором фуксина в течение 2 мин;
- окрашенный препарат после промывания водой высушивают на воздухе или фильтровальной бумагой и микроскопируют.

Удобной модификацией метода является способ Синева, при котором пользуются заранее приготовленными полосками фильтровальной бумаги, пропитанными красками и затем высушенными. Полоски кладут на фиксированный мазок, смачивают водой и

прижимают их пинцетом к стеклу. Излишнюю воду сливают. В остальном техника окраски аналогична оригинальному методу.

*Выявление капсул по методу Бурри-Гинса.*

На предметном стекле бактериологической петлей смешивают каплю взвеси микробных клеток с каплей туши и при помощи стекла со шлифованным краем делают мазок таким же образом, как мазок из крови, высушивают и фиксируют.

На мазок наносят водный растров фуксина на 1-2 мин, промывают водой, высушивают на воздухе и микроскопируют.

Бактерии окрашиваются в красно-сиреневый цвет, а неокрашенные капсулы контрастно выделяются на черном фоне.

*Окраска спор по Пешкову.*

Фиксированный мазок окрашивают синькой Леффлера в течение 20 с, нагревая стекло над пламенем горелки до закипания краски. Далее мазок промывают водой и докрашивают 0,5% водным раствором нейтрального красного в течение 30 с. Краску смывают водой. Мазок высушивают и микроскопируют.

Споры окрашиваются в голубой или синий цвет, вегетативные формы микробов – в розовый.

*Окраска по методу Романовского-Гимзы.*

Этот метод окраски применяют главным образом при микроскопии мазков-отпечатков из органов и мазков крови.

Краситель Романовского-Гимзы состоит из метиленового синего, эозина и азура, благодаря чему он окрашивает элементы крови, ткани органов, микроорганизмы в разные цвета. Перед окраской препаратов краситель разводят 10-20 раз дистиллированной водой (рН 7,0 – 7,2). Степень разведения меняется в зависимости от серии красителя и рН воды. Поэтому каждую новую серию



краски рекомендуют проверять на контрольных мазках.

Фиксированный препарат помещают в чашку Петри мазком вниз на две подставки (из предметного стекла, разрезанного вдоль пополам, или двух спичек).

Краску подливают сбоку препарата так, чтобы мазок полностью соприкасался с краской. Окраска длится от 30 мин до одного или нескольких часов, после чего мазок промывают дистиллированной водой (рН 7,0 – 7,2) и высушивают на воздухе.

Можно проводить окрашивание препарата, погружая стекло в стаканчик с красителем.

Краситель Романовского-Гимзы окрашивает протоплазму форменных элементов ткани в голубовато-синий цвет, ядра клеток – в фиолетово-красный. Тела микробных клеток приобретают нежно-фиолетовый цвет. Например, в мазках-отпечатках органов погибших от туляремии грызунов хорошо видны нежно-фиолетовые бактерии туляремии на фиолетово-красном или голубовато-синем фоне клеточных элементов ткани.

*Приготовление раздавленной и висячей капли.*

Для приготовления раздавленной капли используют хорошо обезжиренное стекло, так как на поверхности пыльных и жирных стекол микробы не фиксируются.

Для проверки чистоты стекла достаточно нанести на него каплю водопроводной воды или физиологического раствора. На чистом стекле капля растекается по всей поверхности, на жирном – дробится на множество мелких капель или приобретает шаровидную форму.

Обычно чистые обезжиренные стекла хранят в контейнере со спиртом или со смесью Никифорова, а перед приготовлением препаратов их извлекают пинцетом и насухо вытирают. Держат стекла пальцами за края.

На середину предметного стекла, помещенного на специальный мостик (см. выше), бактериологической

петлей диаметром 3-4 мм или стерильной пастеровской пипеткой наносят каплю жидкого исследуемого материала (бульонная культура, моча, спинномозговая жидкость и др.). При исследовании агаровой культуры предварительно готовят взвесь микроорганизмов в небольшом количестве физиологического раствора. Затем с помощью анатомического пинцета каплю накрывают чистым покровным стеклом таким образом, чтобы его края не выступали за края предметного стекла. Желательно разместить покровное стекло по отношению к предметному «ромбом».

При приготовлении висячей капли чистое покровное стекло помещают на крышку от чашки Петри, наносят в центр каплю исследуемого материала и накрывают его предметным стеклом с луночкой. Предварительно края луночки смазывают вазелиновым маслом. Предметное стекло с луночкой накладывают на покровное так, чтобы капля находилась в центре лунки. Затем стекло осторожно переворачивают и капля свисает в центре герметически закрытой полости лунки, что предотвращает ее высыхание.

Препараты висячей или раздавленной капли микроскопируют, слегка затемняя поле зрения, конденсор при этом опускают, регулируя поступление света вогнутым зеркалом.

При просмотре микроорганизмов в висячей капле под малым увеличением микроскопа (8х) находят край капли. Установив резкость изображения, поднимают вверх объектив и наносят на покровное стекло каплю иммерсионного масла. Под контролем зрения опускают иммерсионный объектив (90х) до легкого соприкосновения с маслом. Затем очень медленно, поднимая объектив, устанавливают фокус изображения и доводят четкость микровинтом. Если изображение не по-

лучено, все манипуляции повторяют вновь. При утрате ориентировки, наугад поднимать и опускать иммерсионный объектив запрещено, т.к. такой прием приводит к аварийной ситуации – раздавливанию стекла.

Если пользоваться сухим объективом, то вначале под малым увеличением (8х) находят край капли, устанавливают объектив 40х и под контролем зрения опускают объектив почти до соприкосновения линзы со стеклом (умышленно переходя фокусное расстояние). Затем, наблюдая в окуляр, поднимают объектив вверх до появления изображения. Четкость устанавливают микровинтом.

После окончания просмотра препарата объектив следует высоко поднять и снять стекло с предметного столика.

Препарат с раздавленной каплей разбирают, проводя все манипуляции над емкостью с дезинфицирующим раствором. Анатомическим пинцетом слегка сдвигают покровное стекло за край предметного. Сдвинутый край покровного стекла захватывают пинцетом и осторожно отделяют от предметного. Покровное стекло с заразным материалом и предметное стекло с луночкой аккуратно опускают в дезинфектант. Пинцет обжигают в пламени спиртовки, предварительно смочив спиртом. Аналогичным образом разбирают камеру с висячей каплей.

В том случае, если луночка предметного стекла в процессе работы не инфицирована, его можно использовать для приготовления висячих капель из следующих проб. Вместе с тем, луночка считается условно заразной, поэтому не следует прикасаться к ней перчатками работника и предметами, находящимися на лабораторном столе, а по окончании работы предметное стекло с луночкой необходимо погрузить в дезраствор.

### 3.4. Центрифугирование

Проведение некоторых генетических, биохимических, вирусологических и других исследований возбудителей I – II групп патогенности, а также получение биомассы при производстве медицинских иммунобиологических препаратов предусматривают использование специальных методик, включая центрифугирование.

Наиболее часто в лаборатории используют типы центрифуг:

ЦУМ-1 (центрифуга угловая малогабаритная настольная) предназначена для разделения неоднородных жидких систем с удельной массой не более 2 г/см<sup>3</sup> (для полимерных материалов) и не более 1,5 г/см<sup>3</sup> (для стеклянных пробирок) с максимальным объемом центрифугата 180 мл, скоростью вращения от 2000 до 8000 об/мин и фактором разделения 6000.

J2-21 (Beckman) – предназначена для высокоскоростного осаждения материала из жидкостей с удельной плотностью не выше 1,2 г/мл. Скорость вращения до 12000 об/мин.

Центрифугирование инфицированного материала связано с высоким риском образования аэрозоля. Во время работы центрифуги вращение ротора создает воздушные потоки, которые проникают в отверстие для вентиляции, в щели под крышкой центрифуги и т.д. При различных экстремальных (аварийных) ситуациях – разрушение сосуда (пробирки), выскакивание пробки, трещине в пробирке или флаконе, загрязнении наружной поверхности пробирки, инфицированный материал попадает в воздушные потоки, что приводит к образованию аэрозоля и широкому его рассеиванию во внешней среде. Образование аэрозоля создается также при открывании пробок и отсасывании из центрифужных емкостей жидкости.

Одно из основных требований по обеспечению биологической безопасности при центрифугировании заразного материала – проведение всех манипуляций в отдельном боксированном помещении в противочумном костюме I типа или оборудование лабораторий боксами ББ III класса. Боксы ББ, соединенные между собой в единую технологическую линию с герметично обработанными соединениями, являются оптимальными в режимном отношении, так как все манипуляции, связанные с опасностью заражения или контаминации (загрузка ротора, центрифугирование, извлечение пробирок и флаконов, проверка их на целостность), проводят в полной изоляции от окружающей среды. К работе с центрифугами допускают только обученный персонал.

Центрифугирование заразного материала рекомендуется проводить в металлических или пластмассовых стаканах, а также пробирках с безопасными завинчивающимися крышками или герметичными пробками. Перед началом работы внутреннюю часть металлических или пластмассовых центрифужных стаканов осматривают на наличие шероховатостей на стенках. Емкости для центрифугирования заполняют материалом на  $\frac{1}{2}$  объема и тщательно уравнивают. При неполной загрузке ротора пробирки размещают симметрично, чтобы обеспечить равномерное распределение пробирок относительно оси вращения ротора. После распределения емкостей с заразным материалом в роторе, центрифугу герметично закрывают зажимами и включают. Необходимую скорость центрифугирования устанавливают постепенно.

После окончания работы центрифугу открывают только через 20-30 мин (время, необходимое для полного осаждения аэрозоля). Аккуратно извлекают емко-

сти (пробирки, контейнеры) с образцами и просматривают их. При отсутствии повреждений обрабатывают дезраствором только внутреннюю поверхность центрифужной камеры. Продолжительность центрифугирования и характер материала регистрируют в специальном журнале.

### **3.5. Основные методы изучения биологических свойств микроорганизмов КОН-тест (Gregersen T., 1978)**

Этот тест позволяет отличить грамотрицательные микроорганизмы от грамположительных. В основе метода лежит способность клеточной стенки грамположительных бактерий сохранять целостность при воздействии гидроокиси калия, тогда как клеточная стенка грамотрицательных микроорганизмов разрушается при указанном воздействии.

Исследуемую односуточную агаровую культуру суспендируют в капле 3% раствора КОН в чашке Петри. При положительной реакции, свойственной грамотрицательным микроорганизмам, жидкость в капле становится вязкой, нити слизи тянутся за петелей на 0,5-2 см.

#### **Определение типа расщепления глюкозы (OF-тест)**

Испытуемую культуру засевают уколом в столбик среды Хью-Лейфсона в двух пробирках. Посевы проводят иглой (или маленькой петлей), не доводя ее до дна пробирки на 5-6 мм. Затем на поверхность среды одной из пробирок наслаивают стерильное вазелиновое масло (0,5-1 мл). Посевы инкубируют при 37 °С в течение 1-4 сут. Изменение цвета среды в обеих пробирках на желтый свидетельствует о расщеплении глюкозы путем ферментации (F), изменение аналогичного характера только в пробирке, не залитой вазелиновым маслом, - об окислительном процессе (O<sub>2</sub>), а со-

хранение зеленовато-оливкового цвета среды в обеих пробирках - об отсутствии метаболизма глюкозы.

### **Определение цитохромоксидазы (Erich P., 1885)**

На поверхность 18-20-часовой агаровой культуры наносят каплю 1% водного раствора пара-диметилфенилендиамина и добавляют каплю 1% спиртового раствора L-нафтола. При положительной реакции через 1-3 мин появляется ярко-синее окрашивание, обусловленное образованием индофенола синего.

Цитохромоксидазу (по Эрлиху) можно определить также с помощью коммерческого бумажного индикатора (СИБ).

### **Реакция на нитриты**

В 1 мл бульона Хоттингера и бульона Хоттингера с 0,1% азотнокислого калия ( $\text{KNO}_3$ ) засевают петлю агаровой одно-двухсуточной культуры. Бульон должен быть предварительно проверен на отсутствие нитритов реактивом Грисса. Посевы инкубируют при  $28^\circ\text{C}$  и через 3 сут в обе пробирки прибавляют по 0,5 мл реактива Грисса. В положительных случаях сразу же появляется розовое окрашивание, что указывает на наличие в посевах нитритов. В первом случае они образуются при окислении аммиака через промежуточную стадию нитратов, во втором – в процессе редукции нитратов.

### **Посев на комбинированные среды**

Посев на комбинированные среды проводят вначале по скошенной части в виде прямой линии, затем в толщу агарового столбика и заканчивают по скошенному агару штрихом. Следует иметь в виду, что укол в толщу агарового столбика не должен достигать дна, с тем, чтобы не нарушать условия для сбраживания глюкозы в относительно анаэробных условиях. Посевы инкубируют при  $37^\circ\text{C}$ . Результаты учитывают не позднее,

чем через 18-24 ч.

#### **Посев на среду Симонса и ацетатную среду**

Для посева на эти среды используют минимальную дозу, снимая рост микробов без прикосновения к поверхности среды или предварительно суспендируя петлю культуры в изотоническом растворе натрия хлорида. При положительном результате наблюдают рост на средах и появление синего окрашивания (при использовании бромтимолового индикатора), при отрицательном - отсутствие роста и изменения цвета среды.

#### **2.7. Определение дезаминирования фенилаланина**

Среду с фенилаланином засевают массивной дозой штрихом и через сутки инкубации добавляют на поверхность выросшей культуры несколько капель 10% раствора хлорида железа. При дезаминировании фенилаланина наблюдают зеленое окрашивание разной интенсивности, при отрицательной реакции добавленная жидкость и среда имеют желтый цвет.

#### **Определение подвижности бактерий в столбике полужидкого 0,3% агара**

Для определения подвижности бактерий делают посев уколом в столбик среды, не доходя до дна пробирки на 1/3. Подвижные бактерии вызывают помутнение вблизи укола, неподвижные - растут строго по уколу.

#### **Определение индола по Эрлиху**

К бульонной культуре (двух- или трехсуточной) приливают 1-2 мл эфира. Пробирку встряхивают для извлечения индола, после чего дают эфиру отстояться. К эфирной вытяжке приливают 0,5 мл реактива Эрлиха. При положительном результате эфир окрашивается в красный цвет.



### **Постановка реакции Фогеса-Проскауэра и с метиловым красным**

Для постановки этих реакций используют среду Кларка в объеме не менее 5 мл. Посев изучаемой культуры проводят обычной петлей. Инкубируют при 37 °С. Результаты первоначально учитывают через сутки. Из среды с суточным ростом культуры переносят по 1 мл в 2 пробирки. В одну из них добавляют 1 каплю реактива метиловый красный и следят за изменением окраски - появление красного окрашивания указывает на положительный результат, при отрицательной реакции среда приобретает желтый цвет. Во вторую пробирку для постановки реакции Фогеса-Проскауэра добавляют 0,5 мл 6% спиртового раствора  $\alpha$ -нафтола и 0,2 мл 40% раствора КОН. Учет реакции проводят в течение первых 5-10 мин (лучше после встряхивания пробирки) или после 1-2 ч пребывания в термостате при 37 °С. При положительной реакции отмечают вишневое окрашивание, при отрицательной - отсутствие окрашивания. В большинстве случаев четкие результаты в указанных реакциях получают через 2-3 сут инкубации.

### **Определение чувствительности культуры к диагностическими фагам методом «стерильного пятна»**

Для постановки пробы с фагом используют 4-18-часовую бульонную культуру. Можно использовать взвесь суточной агаровой культуры в 0,85% растворе натрия хлорида (по оптическому стандарту мутности 10 ед. ГИСК им. Л.А. Тарасевича).

На поверхность питательного агара тонко оттянутой пастеровской пипеткой наносят капли испытуемой культуры, подсушивают. На одну из капель петлей наносят каплю диагностического фага (опыт), на другую каплю - каплю стерильного МПБ (контроль). После подсушивания

чашку инкубируют при 37 °С в течение 18-20 ч.

При положительном результате на месте нанесения фага появляется четко очерченный лизис (++++), полусливной лизис (+++), большее (++) или меньшее (+) число негативных колоний. При отрицательном результате - на месте нанесения фага и в контроле наблюдается сплошной рост культуры.

### **Определение индофенолоксидазы**

Реактивы: 1% водные растворы диметил-пара-фенилендиамина, тетраметил-пара-фенилендиамина (гидрохлорида), этилоксиэтил-пара-фенилендиамина сернокислого и парааминодиметиланилина (гидрохлорида или оксалата) в сочетании с 1% спиртовым раствором  $\alpha$ -нафтола или без него.

Реактивы должны быть бесцветными, их следует хранить во флаконах из темно-коричневого стекла со стеклянной пробкой без доступа света в холодильнике. В случае помещения реактива во флаконы из светлого стекла их следует обернуть алюминиевой фольгой или темной бумагой.

Постановка пробы:

а) на поверхность 18-часовой агаровой культуры, подозрительной колонии или полусливного роста на пластинчатом агаре наносят 1 каплю 1% водного раствора одного из указанных реактивов. Положительная реакция на индофенолоксидазу – ярко красная окраска культуры через 20-30 секунд.

б) для постановки пробы на оксидазу можно использовать специальные бумажки из набора СИБ или пропитать помещенную в чашку Петри полоску фильтровальной бумаги 2-3 каплями 1% водного раствора одного из реактивов. Культуру наносят на полоску смоченной реактивом бумаги платиновой петлей (но не хромникелевой), стеклянной или деревянной па-

лочкой и распределяют в виде небольшого пятнышка. Через 10-30 секунд появляется пурпурно-красное окрашивание, свидетельствующее о положительной реакции.

Из грамотрицательных бактерий положительную пробу на индофеноксидазу дают вибрионы, аэромонады, псевдомонады, плезиомонады, а отрицательную – все энтеробактерии.

Не следует ставить пробу на оксидазу с культурами на полиуглеводных средах, а также с колониями на элективных средах.

Учитывая возможную нестойкость реактивов и различную способность вибрионов к образованию оксидазы на различных питательных средах, пробу обязательно сопровождают положительными и отрицательными контролями соответственно с культурами вибрионов или псевдомонад и энтеробактерий, выращенными на используемом в лаборатории питательном агаре.

### **Проба тяжа (String test)**

На чашку Петри наносят каплю 0,5% водного раствора дезоксихолата натрия или 2,5% водного раствора моющего средства «Прогресс» и в ней суспендируют 18-часовую агаровую культуру исследуемого штамма. При положительной реакции суспензия немедленно теряет мутность, становится слизистой и вязкой – тянется за петлей, что характерно для вибрионов.

Проба позволяет дифференцировать вибрионы не только от энтеробактерий, но и от других родственных грамотрицательных микроорганизмов, которые не образуют «тяжа». Исключение составляют лишь некоторые штаммы аэромонас, которые в течение примерно 60 секунд образуют слабо тянущуюся нить.

### **Определение декарбоксилазной активности**

Определение декарбоксилазной активности проводят на специальных средах Мёллера, Фалькоу, Биргер-Крушинской, Ряпис и др. В пробирки с лизином, орнитиним, аргинином и контролем (среда без аминокислоты) засевают по полной бактериологической петле 18-часовой агаровой культуры и заливают 0,5-1 мл стерильного вазелинового масла. Посевы инкубируют при  $37\pm 0,5^\circ\text{C}$ . Учет результатов производят ежедневно, при отрицательном результате – до 1-4 суток. В результате ферментации глюкозы вначале происходит сдвиг рН в кислую сторону, а в дальнейшем при декарбоксилировании аминокислот накапливаются амины и происходит защелачивание среды.

Среда Мёллера фиолетового цвета, при кислой реакции желтеет, щелочной - изменяется до красно-фиолетового цвета. Среда Фалькоу имеет травянисто-зеленый цвет, при кислой реакции желтеет, при щелочной - синееет. Среда Биргер-Крушинской при положительной реакции изменяется в синий цвет, среда Ряпис и др. меняется от оранжевого до сиреневого.

#### **Ферментацию углеводов и многоатомных спиртов**

(глюкоза, лактоза, манноза, сахароза, арабиноза, маннит, салицин, дульцит, инозит, крахмал и др.) определяют в жидких или полужидких средах Гисса с индикатором бромтимоловым синим, Андрее, ВР.

Для посева используют культуру, выращенную в течение 12-20 ч на плотной или 3-4 часа в жидкой питательной средах. Посевы на средах с углеводами и спиртами инкубируют при  $37\pm 0,5^\circ\text{C}$  и учитывают через 6-18 ч.

Для определения диастатической активности могут быть использованы среда Гисса с крахмалом и среда Кодама. Культуру засевают в среду и также инкубируют при  $37\pm 0,5^\circ\text{C}$ . Через 18 ч в пробирку со средой Кодама добавляют 2-3 капли раствора Люголя. При

разложении крахмала среда не окрашивается.

**Определение протеолитических свойств**

В столбик желатины уколом засевают 18-часовую культуру и инкубируют в течение 2-3 суток при температуре  $37\pm 0,5^\circ\text{C}$  в течение 18 ч. Перед учетом результатов пробирки помещают в холодильник на 20 мин. При положительном результате желатина остается жидкой, а при отрицательном (и в контрольной пробирке) - затвердевает.

**Определение образования индола**

Холерные вибрионы при выращивании в средах, содержащих триптофан (пептонная вода, мясо-пептонный бульон, бульон Хоттингера и др.), расщепляют его с образованием индола, что выявляется с помощью индикаторных бумажек или реактива Эрлиха.

**Определение уреазной активности на среде Кристенсена**

18-20-часовую агаровую культуру засевают петлей на скошенную поверхность среды. Ферментацию мочевины определяют по изменению цвета среды от желтого к красно-фиолетовому в течение 1-2 суток.

**Определение лецитиназной активности**

Бульонную или агаровую 18-часовую культуру в виде бляшки засевают на специально приготовленный агар, содержащий эмульсию куриного желтка. Посев инкубируют при  $37\pm 0,5^\circ\text{C}$ . О лецитиназной активности судят по зоне преципитации и полного просветления вокруг засеянных участков среды (в мм).

**Выявление способности к биолюминесценции**

Исследуемые штаммы засевают в 1% пептонную воду или на пластинки щелочного агара, инкубируют при температуре  $37\pm 0,5^\circ\text{C}$  в течение 18 ч. Выросшие культуры просматривают в темной комнате. Свечение наблюдают после 5-10 мин адаптации в темноте.

### **3.6. Обеззараживание исследуемого материала при постановке ПЦР**

Использование ПЦР-анализа в практике лабораторной диагностики возбудителей I-II групп патогенности должно проводиться в строгом соответствии с СП 1.3.1285-03 и действующими нормативными документами.

Одно из основных противоэпидемических требований при постановке ПЦР – обеспечить надежную инактивацию исследуемого материала, зараженного или подозрительного на зараженность возбудителями инфекционных заболеваний. Однако применяемые в работе с возбудителями особо опасных инфекций табельные средства обеззараживания (растворы перекиси водорода, хлорамина, формалина и др.) не могут быть использованы в данном случае из-за их повреждающего действия на ДНК или ингибирования ПЦР.

В настоящее время разработаны способы обеззараживания исследуемого материала, зараженного или подозрительного на зараженность бактериями I-II групп патогенности, при проведении генодиагностических исследований методом ПЦР.

Согласно методическим указаниям (МУ 3.5.5.1034-01) отобранные для ПЦР пробы (суспензии органов, кровь, биологические жидкости, смывы с поверхностей, фильтраты почвы, взвеси бактериальных культур) инактивируют следующими способами:

1. Материал, зараженный или подозрительный на зараженность неспорообразующими бактериями I-II групп патогенности.

В пробу вносят проверенный на бактерицидное действие мертиолат натрия до концентрации 1:10 000 и прогревают при 56°C в течение 30 минут. Затем 100 мкл обработанного мертиолатом натрия материала переносят в микроцентрифужные пробирки типа эппен-

дорф, добавляют 300 мкл лизирующего буфера с гуанидинтиоцианатом и прогревают при 65°C 15 минут.

При исследовании на холеру используют метод прогревания образцов при 100°C в течение 30 минут.

2. Материал, подозрительный на зараженность спорообразующими микроорганизмами II - IV групп патогенности, в том числе *Bacillus anthracis*.

Исследуемый материал обеззараживают, применяя метод герминации (прорастания) спор с последующей обработкой пенициллином и прогреванием, а затем воздействием лизирующего буфера с гуанидинтиоцианатом и прогреванием.

В пробирки с 0,9 мл бульона Хоттингера pH 7,2±1 засевают 0,1 мл исследуемого материала и инкубируют с аэрацией при 37°C в течение 2,5 часов. Добавляют пенициллин (1000 ед/мл) и инкубируют при 37°C 15 минут. После этого пробу прогревают на водяной бане 10 мин при 100°C. Затем отбирают 100 мкл обработанной пробы в центрифужные пробирки типа эппендорф, добавляют 300 мкл лизирующего буфера с гуанидинтиоцианатом и прогревают при 65°C в течение 15 минут.

После инактивации проб любым из вышеописанных методов дальнейшее исследование проводят как с обеззараженным материалом.

#### **4. ОСОБЕННОСТИ ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОЙ РАБОТЫ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМИ ЖИВОТНЫМИ**

##### **4.1. Требования к размещению и оснащению помещений блока инфицированных животных**

В работе диагностических, научно-исследовательских и производственных лабораторий широко используют различных животных. Лабораторные животные

служат для диагностики некоторых инфекционных заболеваний, моделирования инфекционных процессов, изучения вирулентности и токсигенности штаммов микроорганизмов, постановки биологической пробы с целью выделения возбудителя и др. Кроме того, они являются донорами, у которых берут кровь для получения сыворотки, плазмы, эритроцитов.

Для экспериментальной работы используют беспородных (конвенциональных) белых мышей, белых крыс, хомяков, морских свинок и кроликов. Однако в настоящее время выведено много линий мышей и крыс, которые отличаются цветом и специфическими реакциями организма при проведении научных экспериментов.

Крупные животные (овцы, лошади, ослы, обезьяны) также являются объектами исследований. В частности, на овцах проверяют эффективность вакцин против бруцеллеза и сибирской язвы, на обезьянах – против чумы, туляремии и других инфекционных заболеваний. Лошадей, крупный рогатый скот используют в качестве продуцентов различных иммунобиологических препаратов. Отдельные вопросы эпизоотологии, эпидемиологии и профилактики природно-очаговых инфекций изучают на отловленных в природе грызунах.

Многие виды исследовательской работы предполагают контакты персонала с лабораторными животными, которые могут быть как естественно, так и экспериментально инфицированы возбудителями болезней, представляющими опасность для людей. В связи с этим необходимо создать сотрудникам лабораторий безопасные условия труда. Соответствующее внимание необходимо уделять и экспериментальным животным.

В настоящее время разработан целый ряд нормативно-технических документов по размещению и проектированию вивариев, разведению и содержанию лабо-



раторных животных.

Действующие санитарно-эпидемиологические правила (СП 1.3.1285-03) регламентируют требования к проведению исследований на лабораторных, диких позвоночных животных и членистоногих, их содержанию, а также обеззараживанию и последующей утилизации трупов обработанных животных и материалов.

Все манипуляции по приему, первичной обработке и вскрытию поступивших на исследование грызунов, заражению, вскрытию, содержанию биопробных животных и членистоногих, а также научно-исследовательскую работу с использованием экспериментальных животных проводят в специальных помещениях для инфицированных животных. Эти помещения должны быть отдельным самостоятельным или изолированным от основной лаборатории блоком. Планировка и набор помещений блока для инфицированных животных варьируют в зависимости от ПБА, с которым проводятся исследования, вида размещаемых животных и характера выполняемых работ (например, аэрозольный метод заражения требует особых условий).

Заразный блок обязательно должен включать комнаты: для одевания СИЗ, снятия СИЗ, приема и первичной обработки материала, зоолого-паразитологической работы, заражения и вскрытия животных, содержания биопробных животных (одна или несколько комнат), обеззараживания материала (автоклавная), мытья и хранения тары для биопробных животных, ведения записей.

Не разрешается в одной комнате одевать СИЗ и снимать их после работы с ПБА. Через комнату для одевания защитной одежды входят в блок для инфицированных животных, а через комнату для снятия одежды выходят.

Комнату для одевания защитной одежды оборудуют зеркалом, шкафами с необходимым запасом СИЗ,

столом для регистрации времени и характера предполагаемой работы, заполнения этикеток на экспериментальных животных и полкой, на которую помещают металлические контейнеры с необходимыми для работы материалами (например, питательные среды, взвеси бактериальных культур, фиксатор для мазков-отпечатков и др.).

В комнате для снятия и обеззараживания защитных костюмов размещают емкости с дезрастворами для обеззараживания рук, обработки наружных поверхностей сапог (калош), замачивания халатов, капюшонов (косынок), полотенец, нарукавников, фартуков, резиновых перчаток; емкость с раствором соды (моющего средства) для погружения ватно-марлевых масок (для последующего кипячения) и банку с 70 ° спиртом для погружения очков-консервов.

В этой комнате выделяют место (стол или полка) для контейнера, выносимого из заразного помещения. Наружную поверхность контейнера тщательно обрабатывают дезинфектантом перед выносом из вскрывочной.

После снятия, в установленном порядке (перед зеркалом), защитного костюма руки обрабатывают 70 ° спиртом и моют с мылом под водопроводным краном.

Помещение для приема и первичной обработки заразного материала должно иметь собственный вход и сообщаться со вскрывочной (можно через «передаточное» окно). Комнату оборудуют столами для регистрации и размещения поступающего на исследование материала и холодильником.

В комнате для зоолого-паразитологической работы проводят определение вида, величины, возраста грызунов, их очес, сбор эктопаразитов, разборку гнезд грызунов и подготовку паразитологического материала к исследованию.

Помещение для заражения и вскрытия животных должно быть достаточно просторным и смежным с комнатой для содержания биопробных (зараженных) животных. Целесообразно, чтобы оно сообщалось через шлюзы с автоклавной, где проводят обеззараживание материала. В комнате размещают столы для вскрытия и заражения животных, настольный или напольный бокс биологической защиты для проведения конъюнктивального и интранозального заражения, шкаф для инструментов, холодильник для хранения трупов животных, небольшой столик для ведения протоколов опытов, электроприборы для кипячения инструментов и шприцов, емкости различных объемов с дезинфицирующими средствами.

Стол для заражения (рис. 10) и вскрытия животных (рис.11) должны иметь невысокие бортики и полку под столешницей на расстоянии 15-20 см от пола. Поверхности стола и полки покрывают водонепроницаемым материалом (лучше антикоррозионным металлом). На полке под столом размещают емкости с дезинфектантом для дуршлага (для стекания жидкости с трупа животного), корнцанга, которым захватывают трупы животных, и эмалированную миску, над которой их переносят на вскрывочную доску.



Рис. 10.  
Рабочее место для заражения биопроб.



Рис. 11.  
Рабочее место для вскрытия мелких лабораторных животных.

Большая кастрюля с 3% раствором моющего средства необходима для замачивания животных перед вскрытием с целью иммобилизации эктопаразитов, если они остались на животном после очеса и чтобы смочить волосяной покров животного.

Для обеззараживания лабораторной посуды используют бачки, ведра, кастрюли с дезинфицирующими средствами. Для трупов отработанных животных целесообразно иметь эмалированные ведра с ножной педалью для открывания крышки.

На стол для вскрытия животных ставят металлическую или эмалированную кювету с доской (50 см x 35 см) из мягких пород дерева. Доска должна быть без сучков и трещин.

Металлическая или эмалированная кювета (большой таз) понадобится также для заражения лабораторных животных. Над кюветой операторы набирают в шприц инокулюм, заражают животных и сбрасывают в неё мелкие отходы (тампоны, бумажную обертку со стерильных тампонов, спички и др.). Для заражения белых крыс и мышей в корень хвоста лучше иметь мелкосетчатые металлические каркасы с отверстием для хвоста.

Для содержания биопробных животных предусмотрены одна или несколько (если необходимо одновременно размещать животных, инфицированных разными ПБА) так называемых биопробных комнат. На стеллажах, которыми оборудованы эти помещения, размещают банки с зараженными животными. При работе с белыми крысами и дикими грызунами стеклянные банки с животными помещают в металлические сетчатые или перфорированные баки с фиксированной крышкой. Зараженных кроликов содержат в закрытых металлических ящиках, поставленных в металлические кюветы.

В сибирезвенных лабораториях устанавливают металлические стеллажи, чтобы можно было их обрабатывать прожиганием (например, паяльной лампой).

Комнату для обеззараживания отработанного материала оборудуют автоклавом (лучше проходным), нагревательными приборами (газовые или электрические плиты, стерилизаторы и др.), шкафами, рабочим столом. Проходной автоклав устанавливают таким образом, чтобы его загрузка осуществлялась со стороны вскрыточной. Для проведения обеззараживания при помощи дезсредств следует иметь емкости различных размеров, которые при необходимости можно также размещать в любом помещении заразного блока: в комнате для снятия СИЗ, в биопробной, вскрыточной и там, где проводят зоолого-паразитологическую работу.

Помещение для мытья и хранения чистых банок, кроме прямого назначения, можно использовать для содержания до опыта чистых лабораторных животных и подготовки их к исследованию (измерение температуры, взвешивание, удаление шерсти), непродолжительного хранения кормов и подстилочного материала. Это помещение оборудуют ванной, стеллажами и шкафами.

## **4.2. ВСКРЫТИЕ ЖИВОТНЫХ**

Поскольку целью биологического метода исследования является выделение патогена и его последующая идентификация, необходимо перед вскрытием животного подготовить специальные среды, определяемые видом возбудителя, предметные стекла для мазков-отпечатков органов, фиксатор, стерильные шприцы. Могут понадобиться пропитанные мертиолатом натрия (1:1000) фильтровальные бумажки для забора крови из

сердца (для серологических исследований), стерильные деревянные палочки для посева органов при исследовании на бруцеллез и др.

Перед вскрытием оборудуют рабочее место. На вскрывочной доске размещают спиртовку на устойчивой подставке, два стакана с инструментами (хирургический пинцет, скальпель и ножницы в одном, анатомический пинцет и ножницы в другом), погруженными в 96 ° спирт (1/3 объема стакана), ступку или чашку Петри для приготовления суспензии органов, стеклянную воронку, штатив, на который можно положить предметные стекла. Понадобятся также пробирки с физиологическим раствором и стерильным песком для растирания в ступке органов вскрываемого животного, бактериологическая петля, пастеровские пипетки и простой карандаш. На столе с левой стороны кюветы расставляют питательные среды и стерильные чашки Петри, с правой – банку с нестерильными ватными тампонами и кристаллизатор с дезраствором для обработки рук (рис. 11).

Банки с биопробными животными, которых необходимо вскрыть, переносят из биопробной во вскрывочную комнату таким образом, чтобы не касаться внутренней поверхности горлышка. Выживших биопробных животных умерщвляют хлороформом (эфиром), которым смачивают ватный тампон и бросают в банку. Банку плотно накрывают крышкой или не пропускающим воздух материалом.

Все манипуляции с трупами животных проводят только инструментами, держа их за верхнюю часть. Перед вскрытием животное захватывают корнцангом и погружают в 3% раствор моющего средства на 20-30 сек., после чего помещают на дуршлаг для освобождения от излишней жидкости и переносят на

вскрывочную доску. После этого корнцанг погружают в дезинфектант. Перенос животного и корнцанга осуществляют только над дезраствором (рис. 12).



Рис. 12.  
Подготовка животного к вскрытию.



Рис. 13.  
Фиксация, вскрытие и посев органов биопробного животного.

Животное помещают на вскрывочную доску и с помощью двух пинцетов растягивают за лапки, чтобы снять трупное окоченение. Хирургическим пинцетом, который держат в левой руке, захватывают левую верхнюю лапу животного и прикалывают ее в области пясти к доске. Такую же манипуляцию проделывают с правой задней лапкой, прикалывая ее к доске в области плюсны, и т.д. Приколышам придают наклонное положение, чтобы они не мешали в работе (рис.13).

После каждой манипуляции в ходе исследования экспериментатор должен обрабатывать руки дезраствором и насухо вытирать их полотенцем, чтобы исключить возможность падения инструментов с заразным материалом из мокрых рук.

Перед тем, как приступить к вскрытию, необходимо смочить в воде 3-4 ватных тампона, отжать и поместить их на вскрывочную доску. Одним тампоном обрабатывают шерсть животного и прикрывают отверстие мочеиспускательного канала, чтобы предотвратить возможное разбрызгивание содержимого мочевого пузыря во время вскрытия, другие тампоны используют для протирания инструментов перед обжиганием. Допустимо смачивать



тампоны дезинфицирующим раствором, однако следует учитывать возможность снижения процента выделения возбудителя.

Вскрытие трупов следует проводить таким образом, чтобы исключить внесение микроорганизмов с поверхности в глубину тканей и перенос микробов из одного органа на другой. Поэтому следует тщательно обрабатывать инструменты после каждой манипуляции и обжигать – перед началом работы.

При вскрытии используют хирургический пинцет и ножницы, которыми одним движением рассекают кожу по средней линии брюшка от половых органов до нижней челюсти и делают разрезы в стороны к четырем лапкам. Осторожно отделяют кожные лоскуты скальпелем или сомкнутыми браншами ножниц (при вскрытии мелких грызунов), приподнимая кожу хирургическим пинцетом. При правильном вскрытии паховые и подмышечные лимфатические узлы остаются на кожных лоскутах, а подчелюстные и шейные – на мышцах шейной области. Использованные инструменты обрабатывают ватными тампонами, погружают в спирт и заменяют другим набором инструментов (рис.13).

После осмотра подкожной клетчатки и лимфатических узлов проводят посев кусочка измененного лимфатического узла (бубона) на среды методом отпечатков, захватив его анатомическим пинцетом. Затем делают отпечатки на двух предметных стеклах. При необходимости посеять материал в пробирки со скошенным агаром используют бактериологическую петлю, которую накаляют, прижигают к ней исследуемый материал и сеют методом отпечатков. После посева остаток органа снимают с петли пинцетом и только после этого прожигают петлю. Оставшийся на кожном лоскуте лимфоузел вырезают и переносят в ступку



(чашку Петри) для биопробы.

Далее приступают к вскрытию брюшной и грудной полостей. Обжигают инструменты, захватывают хирургическим пинцетом брюшную стенку в области лобка, надрезают её и, введя не глубоко в брюшную полость закругленный конец ножниц, делают два дугообразных разреза вправо и влево к нижним ребрам. Затем надрезают нижние ребра, рассекают диафрагму по краю грудной клетки и продолжают разрезать с обеих сторон грудную клетку до верхних ребер. Образовавшийся лоскут из грудины и рёбер откидывают на мордочку животного. Инструменты очищают от следов крови с помощью тампонов и погружают в спирт.

После осмотра органов и оценки патологоанатомической картины приступают к посеву органов брюшной полости: печени, селезенки, парааортальных лимфатических узлов. С помощью анатомического пинцета и ножниц отсекают маленькие ( $\approx 5 \times 5$  мм) кусочки органов и, держа их пинцетом, сеют на чашки Петри и делают мазки-отпечатки. Часть материала (свежие кусочки) отбирают для приготовления суспензии органов. После каждой манипуляции инструменты тщательно очищают от следов крови, органов и погружают в спирт.

При исследовании животных на туляремию делают посев органов бактериологической петлей, на бруцеллез – стерильными деревянными палочками. В последнем случае кусочек органа помещают на конец палочки, осторожно вносят её в пробирку со скошенным агаром и растирают материал о внутреннюю стенку пробирки над поверхностью агара. Образовавшуюся массу тщательно втирают в поверхность среды. Исползованную палочку погружают в дезраствор.

Кровь из сердца забирают пастеровской пипеткой,

которую вводят в полость правого желудочка через предварительно «припеченное» накалившимся скальпелем место. При этом сердце фиксируют анатомическим пинцетом.

У мелких грызунов отсекают верхушку сердца и, используя бактериологическую петлю, выступившие капли крови сеют на пластинчатый агар и в жидкие среды.

При необходимости забора крови для серологических исследований ею пропитывают фильтровальные бумажки с мертиолатом натрия. Пинцетом бумажки помещают в чашки Петри или в пробирки, если перед забором крови их свертывают в трубочку с помощью двух пинцетов.

Если животное загнившее, для посева берут костный мозг из трубчатой части бедренной кости. Кость предварительно освобождают от мышц, подкладывают под место предполагаемого разреза стерильный марлевый или ватный тампон и под прикрытием стеклянной воронки рассекают её. Придерживая пинцетом отрезок кости, бактериологической петлей или иглой забирают материал для посева.

У мелких грызунов исследуют головной мозг. На вскрывочную доску помещают слой ваты, смоченный дезраствором. Двумя пинцетами закрывают внутренние органы вскрытого животного кожными лоскутами и переворачивают труп спиной кверху на приготовленный ватный матрасик. Корень хвоста фиксируют приколышем. Отсепаровывают кожу головы за ушками, фиксируют её хирургическим пинцетом, введя острые концы в глазницы, и под прикрытием стеклянной воронки, которую держит помощник, рассекают кости черепа в области мозжечка. Не вынимая пинцет из глазниц, слегка приподнимают отсеченную часть черепа, чтобы обнажить мозг и бактериологической

петлей берут материал на исследование.

В процессе посева, как уже упоминалось, делают мазки-отпечатки свежими кусочками органов на двух (или более) стеклах:

лимфатические узлы – четыре отпечатка

легкие – два

печень – один

селезенка – три

кровь – одна узкая полоса поперек стекла

Мазки-отпечатки не должны быть толстыми.

При вскрытии животного в протоколе отмечают состояние подкожной клетчатки и лимфатических узлов в паху, подмышечных впадинах. Учитывают их величину, форму и цвет. При осмотре органов грудной полости обращают внимание на наличие экссудата в полости плевры, гиперемию или ишемию (малокровие) легких. Регистрируют состояние органов брюшной полости, отмечая наличие очагов поражения (абсцессов).

После окончания вскрытия, осторожно извлекают приколыши, придерживая лапки животного пинцетом. Подносят к столу, как можно ближе, кастрюлю (бачок) с дезраствором для сбора отработанных трупов и, захватив двумя хирургическими пинцетами кожные лоскуты животного, опускают его в емкость. Туда же сбрасывают использованные тампоны. Тщательно обрабатывают вскрывочную доску смоченными в дезрастворе тампонами. Переносят в фиксатор предметные стекла с мазками-отпечатками. При всех манипуляциях используют пинцет. Чашки Петри, пробирки с посевами, штатив перед тем, как поместить в бикс для транспортировки, протирают смоченными в дезрастворе салфетками или ватными тампонами.

Для заражения биопробных животных используют суспензию органов вскрытого животного. Вначале ор-

ганы под прикрытием воронки измельчают ножницами, если их собирали в чашку Петри, или растирают с помощью пестика и стерильного песка, если использовали ступку. В образовавшуюся массу постепенно добавляют физиологический раствор 1:4 – 1:5 и эмульгируют. Суспензию для заражения набирают в шприц через стерильный ватный тампон. Для посева суспензии на пластинчатый агар используют бактериологическую петлю. Можно прикоснуться к агару пестиком, которым растирали органы, а затем отпечаток рассеять петлей.

### **4.3. Заражение лабораторных животных**

Использование определенного вида лабораторных животных и метода заражения определяется целью и задачами исследования. Разработаны следующие способы введения исследуемого материала биологическим моделям: кожный, внутрикожный, подкожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, в переднюю камеру глаза, интратрахеальный, интраназальный, внутрикишечный, субокципитальный.

Некоторые методы заражения требуют предварительной подготовки животного. Так, при кожном и внутрикожном способах инокуляции материала удаляют волосяной покров в области брюшка или спины животного. Внутрикишечное и субокципитальное введение патогена проводят под наркозом.

Учитывая высокую степень риска инфицирования персонала лаборатории при интраназальном и интратрахеальном способах заражения, все манипуляции с животными проводят в боксах биологической безопасности. Особые требования по размещению, планировке, оборудованию, техническому обслуживанию и режиму работы предъявляют к аэрозольным лабо-

раториям, проводящим ингаляционное заражение животных возбудителями I – II групп патогенности.

Наиболее часто в практических лабораториях используют беспородных белых мышей, морских свинок, хомячков и кроликов, применяя подкожный, накожный, внутрибрюшинный методы введения инфицированного материала, а также заражение в корень хвоста или вену.

В исследование берут только здоровых животных определенных массы тела и возраста.

Перед заражением животных рассаживают в банки или металлические ящики (кролики), на которые прикрепляют заранее заполненные этикетки. В этикетке указывают вид и вес животного, номер (по журналу регистрации биопроб), вид и количество (объем, доза) вводимого материала, метод инокуляции, дату заражения и фамилию экспериментатора.

Для обеспечения безопасных условий при заражении животных необходимо строго соблюдать специально разработанные методические приемы. Особые требования предъявляют к подбору шприцев.

Работа по заражению животных проводится в паре. Помощник распробковывает пробирку с исследуемым материалом и наклоняет ее таким образом, чтобы врач мог набрать необходимое количество. Чтобы исключить случайное выливание содержимого пробирки, желательно пользоваться пробиркой с углублением в верхней части стенки. Для того чтобы избежать попадания в шприц пузырьков воздуха, следует полностью погрузить иглу в жидкость срезом книзу и медленно продвигать поршень.

При необходимости удалить пузырек воздуха из шприца следует с помощью пинцета насадить на иглу стерильный ватный тампон упакованный в бумажный конверт, перевести шприц в вертикальное положение

иглой вверх и осторожно его выдавить. После этого пинцетом снимают с иглы тампон, погружают его в дезинфектант, а пинцет – в стакан со спиртом. Более безопасный способ набора инфицированного материала из чашки Петри или ступки.

При заражении материалом, содержащим сравнительно крупные частицы (суспензии органов исследуемых животных и человека, членистоногих, пищевых продуктов и др.), его набирают в шприц через стерильные марлевые или ватные тампоны.

После того как материал набран в шприц, категорически запрещается прикасаться рукой к игле или месту соединения ее с цилиндром.

При необходимости освободить руки работающего после набора инокулята, шприц можно положить в чашку Петри, предварительно наколов на иглу стерильный ватный или марлевый тампон. При этом шприц должен лежать устойчиво и не касаться иглой и канюлей бортика чашки.

Все манипуляции, связанные с набором инфицированного материала из пробирки и заражением животных, проводят над кюветой (тазом) с дезинфицирующим раствором.

Шприц с инокулятом держат строго горизонтально между большим, средним и безымянным пальцами правой руки. Указательный палец, оставаясь свободным, не должен касаться (до момента заражения) поршня (рис.14).



Рис. 14. Исходное положение шприца при заражении лабораторных животных

Использованные шприцы обеззараживают кипячением или дезинфицирующим раствором. Чтобы исключить опасность разбрызгивания заразного материала при разборке шприца, следует придерживаться определенных правил. Остаток неиспользованного после заражения материала медленно выпускают в дезинфектант, погрузив иглу шприца в раствор. Затем, держа шприц иглой вниз, над емкостью (стерилизатор, кастрюля) с водой или дезраствором, осторожно пинцетом снимают иглу и опускают ее в жидкость. Наклоняют шприц канюлей вверх и пинцетом медленно вытягивают поршень и также погружают его в жидкость. После этого вводят одну браншу пинцета внутрь цилиндра и осторожно затапливают его.

Шприцы одноразового применения не разбирают, как указано выше набирают дезраствор, на иглу пинцетом надевают защитный колпачок, погружают до уровня канюли в дезраствор и заполняют его раствором из шприца, затем пинцетом погружают в емкость с дезраствором.

Если использовались шприцы с насадкой, вынимают только поршень, остальные детали разбирают после обеззараживания. Пинцет помещают в стакан со спиртом или дезинфицируют вместе со шприцами.

При подкожном методе заражения исследуемый материал (0,1-0,2 мл, максимально 0,5 мл – белой мышке, хомячку; 0,5-1,0 мл – морской свинке) вводят экспериментальной модели в область бедра. Помощник фиксирует животное (белая мышь, хомячок, морская свинка) руками или корнцангом (крыса) и подносит к экспериментатору в растянутом виде брюшком кверху. Если инокулюм вводят в правую лапку белой мыши или хомячка необходимо захватить правой рукой ушки и складку кожи в области затылка, а левой – хвост и за-



дни лапки животного и наоборот (рис.15).



Рис. 15.  
Подкожный (внутримышечный)  
метод заражения белой мыши.



Рис. 16.  
Внутрибрюшинный метод зара-  
жения морской свинки.

При заражении крыс помощник фиксирует корнцангом кожу в области затылка животного, хвост и заднюю лапку прижимает рукой к корнцангу, а свободную заднюю лапку, в которую предполагается вводить материал, держит другой рукой.

Морских свинок берут рукой так, чтобы одна передняя лапка располагалась между большим и указательным, другая – между указательным и средним пальцами помощника. Фиксированные лапки отводят кзади. Задние лапки фиксируют между большим, указательным и средним пальцами другой руки помощника.

В момент заражения руки помощника должны располагаться в одной плоскости с животным, чтобы исключить возможные аварийные ситуации.

Заражающий над кюветой с дезинфектантом в правой руке держит шприц с исследуемым материалом, левой рукой с помощью анатомического пинцета спиртовым ватным тампоном протирает место инокуляции материала, оставляет тампон на руке помощника, этим же пинцетом слегка приподнимает кожу животного вверх и вводит иглу срезом кверху строго под кожу. Затем экспериментатор переносит пинцет на муфту иглы, чтобы зафиксировать ее на шприце, и медленно надавливает на поршень указательным пальцем. После введения материала необходимо сразу убрать указа-



тельный палец с поршня, пинцет - с канюли шприца и под прикрытием спиртового тампона вывести иглу из-под кожи. Используемый тампон опускают в дезраствор.

Заражающий набирает при помощи порошня в шприц дезинфицирующий раствор и погружает его в емкость с дезраствором. Помощник помещает животное в банку, которая должна стоять вблизи работающих. Не касаясь горлышка банки, животное головой вниз опускают в нее на глубину не более 5 – 6 см и освобождают сначала голову, а затем задние лапки.

Внутрибрюшинный метод заражения применяют с целью ускорения биологического исследования материала. В этом случае для биопробы можно брать только так называемый «чистый» материал (например, кровь).

Техника внутрибрюшинного метода заражения отличается от подкожного способом подачи животного. В момент непосредственного введения исследуемого материала лабораторное животное должно располагаться вертикально головой вниз. В этом положении кишечник смещается в сторону диафрагмы, что уменьшает возможность его повреждения в момент инъекции.

Мелких лабораторных животных помощник сразу подает головкой вниз, брюшком к экспериментатору. Заражающий обрабатывает место введения инокулята спиртовым тампоном, захватывает анатомическим пинцетом складку кожи вместе с брюшиной несколько выше проекции мочевого пузыря и вводит иглу, прокалывая кожу и брюшину одновременно.

При заражении морских свинок помощник располагает фиксированное животное сначала в горизонтальном положении брюшком вверх, а головкой к правой руке экспериментатора. Заражающий протирает нижнюю часть брюшка спиртовым тампоном, захватывает пинцетом складку кожи, отступая 0,5-0,8 см от белой

линии живота в правую сторону по отношению к животному, приподнимает кожу и прокалывает ее. Затем фиксирует этим же пинцетом муфту иглы. В это время помощник осторожно переводит животное в вертикальное положение головой вниз, а заражающий следит за иглой, устанавливая ее перпендикулярно к брюшке животного. Затем экспериментатор колющим движением вводит иглу в полость брюшины. Последующие манипуляции не отличаются от выше указанных при подкожном методе заражения (рис. 16).

Накожный метод заражения применяют при исследовании материала, который содержит большое количество посторонней микрофлоры (загнивший труп грызуна, мокрота, содержимое кишечника, погадки птиц, земля и др.). Перед заражением кожу в области брюшка животного освобождают от волосяного покрова. У кроликов, морских свинок и крыс шерсть выстригают ножницами с закругленными концами. Для полного удаления волосяного покрова используют депилятор (за 2-3 дня до постановки опыта). Помощник крепко фиксирует животное и подает его в растянутом виде строго горизонтально, чтобы избежать стекания капель инфицированного материала с поверхности кожи в момент заражения. Заражающий обрабатывает эпилированный участок стерильным ватным тампоном, смоченным стерильной водой или физиологическим раствором, и скарифицирует лезвием скальпеля до появления капель крови кожу в области предполагаемого заражения. Затем заражающий с помощью пастеровской пипетки, скальпеля или пинцета наносит на кожу небольшое количество (2-3 капли или 0,5-1,0 г) исследуемого материала. Если необходимо заразить животное мокротой, используют ватный тампон, накрученный на деревянную палочку. При исследовании

отдельных органов (грызуна, человека) вырезают небольшой кусочек, которым делают отпечатки на скарифицированной коже биопробного животного. После нанесения исследуемого материала следует тщательно втереть его в кожу тупой поверхностью скальпеля под прикрытием стеклянной воронки или крышки от чашки Петри. Воронку или чашку Петри, которые использовали в работе, сразу погружают в дезинфицирующий раствор.

Заражение в корень хвоста. При заражении этим методом используют белых мышей и белых крыс. Белых мышей помощник подает экспериментатору в горизонтальном положении спинкой вверх, оставляя не фиксированным хвост. Для заражения белых крыс необходимо иметь специальные металлические каркасы или банки с металлическими крышками, в средней части которых сделано небольшое отверстие для хвоста. В исключительных случаях животное можно фиксировать с помощью корнцанга. Исследуемый материал вводят животному в подкожную клетчатку в области корня хвоста.

Крыс и мышей можно заразить в боковую вену хвоста. Перед введением материала хвост животного смазывают ксилолом или толуолом, чтобы вызвать набухание вены. Для введения материала лучше пользоваться туберкулиновыми иглами.

## **5. ИММУНОСЕРОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ**

По данному разделу освещаются современные понятия об антигенах, антителах, характеризуются агглютинационные, преципитационные, твердофазные иммунохимические, иммунохроматографические, им-

мунофлуоресцентные и др. методы диагностики. На практических занятиях отрабатываются навыки проведения обеззараживания объектов, взятых для исследования; методические приемы постановки комплекса серологических реакций, наиболее часто используемых в лабораториях; правила оценки и учета полученных результатов.

Серологические методы исследования в настоящее время широко применяются в лабораторной диагностике целого ряда заболеваний различной этиологии. Они позволяют фиксировать наличие антигенсодержащего материала, не прибегая к изоляции патогена. В отличие от бактериологического и биологического методов, достоверность которых вытекает из факта выделения возбудителя, серологические тесты представляют доказательства присутствия в исследуемом материале искомого агента на основе специфического взаимодействия антиген-антитело (АГ-АТ). Важным преимуществом этих методов является возможность индикации не только корпускулярных, но и субкорпускулярных и растворимых АГ, а также специфических АТ.

## **5.1. Теоретические основы взаимодействия антигена с антителом**

### **5.1.1. Антигены**

В иммунологических методах участвуют два специфических комплементарных по отношению друг к другу компонента: антиген и соответствующее ему антитело. Они составляют одну специфическую систему типа «ключ-замок».

**АГ** - это вещества различного происхождения, несущие признаки генетической чужеродности и вызывающие развитие специфических иммунных реакций (гуморальных, клеточных, состояние иммунологической

толерантности, индуцирование иммунной памяти).

Свойства АГ определяются комплексом признаков: иммуногенность, антигенность, специфичность, чужеродность.

**Чужеродность.** АГ вызывает иммунный ответ, т.е. образование АТ только в тех случаях, когда он чужероден. К собственным АГ организм толерантен.

**Антигенность** - способность АГ избирательно реагировать со специфичными к нему АТ или АГ-распознающими рецепторами лимфоцитов. Антигенностью обладают микроорганизмы и их токсины, паразиты. Синтез АТ могут индуцировать яды белковой природы (змеиный), эритроциты, яичный альбумин, белки, сложные полисахариды (ПС), липополисахариды (ЛПС), полипептиды, комплексные соединения белков с липидами, полисахаридами, некоторые искусственные высокополимерные соединения.

**Иммуногенность** - способность индуцировать иммунный ответ. При анализе генетического контроля иммунного ответа выявлены линии мышей и морских свинок, одни из которых отвечают на определенный АГ, а другие остаются к нему ареактивными. Иными словами, АГ в качестве иммуногена проявляется тогда, когда иммунная система конкретного организма способна к адекватному ответу.

Иммуногенность АГ повышается по мере увеличения размера и полимерности молекул этого АГ. Низкополимерный АГ может вызывать не только более слабый, но и качественно иной иммунный ответ, чем АГ, обладающий тем же составом, но более высоким уровнем полимерности. Повышение иммуногенности АГ-ов с возрастанием полимерности их молекул имеет верхний предел. При дальнейшем возрастании полимерности молекулы АГ приобретают способность

вызывать специфическую иммунодепрессию или толерантность. **Иммунологическая толерантность** – это состояние организма, при котором последний не способен отвечать продукцией АТ на введение АГ.

**Специфичность** - структурные особенности, отличающие один АГ от другого.

АГ делятся на 2 группы: - **полноценные (полные)** - иммуногенные, всегда проявляющие антигенные свойства; **неполноценные (гаптены)** – неиммуногенные.

Способностью вызывать развитие иммунного ответа и определять его специфичность обладает фрагмент молекулы АГ - **антигенная детерминанта (эпитоп)**.

Антигенная детерминанта – небольшой участок молекулы АГ, образующий пространственную конфигурацию за счет остатков молекул аминокислот, углеводов или липидов, который и является фактическим местом присоединения молекулы АТ. 1 молекула АГ может содержать несколько структурно отличающихся антигенных детерминант, что обуславливает **поливалентность АГ**. **Валентность АГ-енной молекулы** определяется числом однородных детерминант, способных соединиться с активным центром АТ одной и той же специфичности.

Молекулы гаптенных моновалентны. По валентности АГ можно судить о его молекулярной массе. В среднем валентность белковых АГ составляет от 5 до 15.

В ответ на большинство поливалентных антигенов АТ образуются к каждой детерминанте. Комплементарность АГ-детерминанты к АТ у специфического АГ выше, чем у перекрестно реагирующего. В основе взаимодействия перекрестно-реагирующих АГ с АТ лежит структурное подобие или полное сходство с детерминантами специфического АГ. **Моноклональные АТ** специфически распознают только одну АГ-

детерминанту и связываются с ней. **Поликлональные АГ**, как правило, распознают несколько антигенных детерминант в составе АГ.

По химическому строению, основным иммунологическим свойствам, а также по методам их изучения детерминанты можно условно подразделить на 3 больших группы:

**1) Гаптены** [от греч. *hapto*, прикрепляться] (неполные АГ) - это вещества с низкой молекулярной массой, способные вступать во взаимодействие с АГ, но не вызывающие их образование. При увеличении размера гаптенных групп (при конъюгировании с белками), они приобретают свойства полноценных АГ. **Полугаптены** - неорганические вещества (йод или хром), присоединение которых к молекуле белка меняет его иммуногенные свойства. Образующиеся АГ специфичны к йоду или хрому, то есть к детерминантам на поверхности полного АГ, но не к белку-носителю. **Проантигены** - гаптены, способные присоединяться к белкам организма и сенсibilизировать его как аутоантигены. Например, метаболиты грибов пенициллов или продукты распада пенициллинов могут связывать белки и вызывать развитие к ним иммунных реакций.

**2) Олигосахаридные детерминанты** входят в состав гликолипидов (АГ клеточных стенок бактерий и главные АГ групп крови) и гликопротеинов (резус-фактор). Основные АГ-ные детерминанты полисахаридов представляют собой короткие олигосахариды (1-6 остатков сахара). Специфические свойства АГ-ой детерминанты полисахарида определяются последовательностью входящих в ее состав сахаров и способом их соединения друг с другом.

**3) Пептиды** - АГ-енные детерминанты белковой природы состоят из аминокислотных остатков, располо-

женных в пространстве определенным образом. Их делят на концевые и конформационные. Специфичность 1-ых определяется, главным образом, составом короткой концевой пептидной цепочки. 2-ые находятся в середине молекулы и их специфичность определяется ее третичной структурой.

Соединение АГ-ой детерминанты с активным центром АТ обеспечивается различными типами химического взаимодействия молекул: ван-дер-ваальсовыми силами, полярным взаимодействием молекул, образованием водородных связей и гидрофобным взаимодействием. Прочность такого соединения выше для тех детерминант, в составе которых находятся радикалы, приобретающие в водном растворе сильный «+» или «-» заряд.

Большая часть АГ способна запускать иммунные реакции, выступая в последующем в качестве мишени, в отношении которой эти реакции реализуются. **Суперантигены** – АГ, способные непосредственно, без предварительной обработки АГ-представляющими клетками взаимодействовать с молекулами МНС (главного комплекса гистосовместимости). При этом распознавание АГ теряет строгую избирательность, вовлекаются большие группы Т-клеток. Их активация сопровождается избыточной продукцией различных медиаторов иммунного ответа, что может привести к развитию аутоиммунных реакций (например, АГ микоплазм, стрептококков, кампилобактеров и т.д.).

Особую группу составляют АГ, способные подавлять иммунные реакции с развитием специфической неспособности отвечать на них. Это состояние известно как **иммунная толерантность**. Благодаря генетическому разнообразию индивидуумов, вещество-иммуноген для одного из них может быть толерогеном для друго-



го. Действуя как иммуноген при парентеральном введении (например, внутримышечно), то же вещество может быть толерогеном при введении другим путём (например, пероральном).

В роли АГ выступают белки, полисахариды, нуклеиновые кислоты; эти соединения могут образовывать комбинации между собой или с липидами. Липиды неиммуногенны, что определяется недостаточной жёсткостью структуры этих молекул и преимущественно линейной конфигурацией. Наибольшей иммуногенностью обладают белковые АГ. Чем дальше от человека в эволюционном отношении отстоят организмы, тем большую иммуногенность проявляют их белки.

**АГ подразделяются на а) экзогенные** – поступают извне, подвергаются эндоцитозу и расщеплению в АГ-представляющих клетках, **б) эндогенные** – продукты собственных клеток организма (белки, синтезируемые вирусинфицированными клетками хозяина и аномальные белки опухолевых клеток).

**Молекулярная масса** АГ имеет существенное значение. Вещества с массой более 5-10 кД - сильные иммуногены. Исключение - нуклеиновые кислоты, обладающие большой молекулярной массой, но слабой (по сравнению с белками) иммуногенностью.

**Растворимость.** Нерастворимые белки (например, кератины) не могут находиться в коллоидной фазе и не вызывают развития иммунных реакций.

**АГ по специфичности делятся на 10 типов:**

*Видовая специфичность* – особи одного вида отличаются от особей другого вида (АГ мыши отличаются от АГ кролика).

*Групповая специфичность (индивидуальная)* - различия среди особей одного вида организмов. *Аллоантигены (изоантигены)* - АГ конкретного индивидуума,

обладающие иммуногенностью по отношению к другим представителям этого вида, но не к организму донору трансплантата. Яркий пример изоантигенов - групповые Аг крови, присутствующие на мембранах эритроцитов и других клеток. Поскольку человек обладает естественными АГ к групповым Аг крови, последние приобретают свойства сильных трансплантационных Аг. Поэтому перед трансплантацией и гемотрансфузией необходимо определить группы крови донора и реципиента.

*Типоспецифичность* – относится только к микробам. Так пневмококки по полисахаридным АГ делятся на 4 типа, каждый из которых обладает своими особенностями.

*Гетероспецифичность* – обусловлена АГ, общими для представителей разных видов (сходство отдельных структурных компонентов органов и тканей человека с антигенами возбудителей чумы, бруцеллеза, холеры).

*Органоидная специфичность* – обусловлена органоидами клетки (ядро, митохондрии и т.д.).

*Функциональная специфичность* – связана с функцией данной молекулы (общие АГ тканей печени человека и животного за счет их функции).

*Стадиоспецифичность* – введена в связи с развитием иммунологии эмбриогенеза.

*Гаптеноспецифичность* – любой гаптен может обеспечивать свою специфичность.

*Патологическая специфичность* – обеспечена специфичностью патологически измененных тканей (ожоговые, лучевые, раковые).

АГ-енная специфичность ДНК

**Антигены бактерий.** Большинство возбудителей инфекционных заболеваний человека, их структуры и токсины - полноценные АГ, вызывающие развитие

иммунных реакций.

В основе классификации АГ бактерий лежит их локализация (жгутиковый, капсульный АГ и т.д.), биологическая функция (гемолизин, энтеротоксин) или метод обнаружения (преципитиноген, агглютиноген). **Н-АГ** - жгутиковые - входят в состав бактериальных жгутиков, представляют собой белок флагеллин, разрушающийся при нагревании, после обработки фенолом сохраняющий свои АГ-енные свойства. **О-АГ**-соматический - связан с ЛПС клеточной стенки, термостабилен, сохраняется при кипячении в течение 1-2 ч, не разрушается после обработки формалином и этанолом. **К-АГ** - капсульные располагаются более поверхностно, чем О-АГ, тесно связаны с ЛПС клеточной стенки и капсулой. У некоторых возбудителей имеется термолабильный **Vi-АГ** (АГ вирулентности), выявление которого имеет важное значение для серотипирования бактерий. Поверхностные эндоАГ (жгутиковый, капсульный, соматический) характеризуются большей антигенностью, чем внутриклеточные (цитоплазматических мембран, цитоплазмы, рибосом, НК).

Для возбудителей отдельных инфекций предложены АГ-енные схемы - классификация видов бактерий по АГ-енной структуре. Первая АГ-енная классификация бактерий была разработана Уайтом. В 1934 г. Кауфман предложил использовать ее для классификации бактерий рода *Salmonella*. В настоящее время она значительно дополнена. Сейчас существуют АГ-енные классификации для бактерий родов *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Escherichia*, *Arizona* и др. АГ-енные схемы используются для сопоставления с набором уже известных серотипов бактерий, выделенных в различных микробиологических учреждениях мира. Антигенные схемы предполагают описание отдель-

ных АГ бактерий в виде формул, характеризующих определенные серотипы. АГ бактерий обозначают цифрами или буквами. Комбинации АГ, обозначенные в виде АГ-енной формулы, характеризуют биохимически определенный вид серологически. Осуществляется постоянный контроль и дополнение существующих АГ-енных схем.

Антигенность бактерий – одно из основных свойств. У разных возбудителей она оказывает неодинаковое влияние на возникновение, течение и исход инфекционного заболевания. Изучение АГ-енной структуры бактерий и продуктов их жизнедеятельности необходимо для создания эффективных слабореактогенных вакцин, для изучения патогенеза заболеваний и совершенствования методов лабораторной диагностики.

Особую группу бактериальных АГ составляют протективные АГ [от лат. *protectio*, защита] - термолабильные белки, иммунизация которыми защищает лабораторных животных от гибели после заражения летальными дозами патогенных микроорганизмов. В настоящее время подобные АГ выделены у возбудителей сибирской язвы, чумы, бруцеллёза, туляремии и коклюша. Нередко протективные АГ используют для изготовления вакцин.

АГ-нная изменчивость бактерий в настоящее время подвергается серьезному научному исследованию. В результате внешних воздействий у бактерий могут наблюдаться АГ-вариации или АГ-модуляции - изменение, частичная или полная потеря АГ. Качественные и количественные изменения АГ у определенных видов могут привести к изменению серотипа. Различают Н-О-вариации (потеря Н-АГ и переход к чистой О-форме), О-вариации (потеря или количественное изменение компонентов этого комплекса), S-R-вариации

переход из гладкой в шероховатую форму), V-W-изменение формы (количественное изменение содержания V-АГ). АГ-енная изменчивость усложняет серологическую диагностику заболеваний. АГ-енные модуляции это исчезновение поверхностных АГ под влиянием АТ. АГ-енные модуляции – обратимый феномен: при удалении АТ АГ микроорганизмом экспрессируются вновь.

**АГ вирусов.** Заражённые вирусами клетки начинают экспрессировать вирусспецифические АГ. Вирусные АГ могут быть структурными и неструктурными. Первые представлены веществами, кодируемыми нуклеиновыми кислотами, а также клеточными метаболитами (липиды, углеводы), захватываемыми вирионами при почковании. Неструктурные АГ не входят в состав вирионов, а образуются в инфицированных клетках на различных этапах репродукции вирусов. У вирусов выделяют ядерные (сердцевинные), капсидные и суперкапсидные АГ. У пара- и ортомиксовирусов имеются также поверхностные V-АГ - гемагглютинин и нейраминидаза.

### 5.1.2. Антитела

**Антитела (АТ)** – это белки, относящиеся к тому или иному классу иммуноглобулинов (Ig), которые вырабатываются клетками лимфоидных органов после стимуляции АГ, поступающими в организм (при естественных инфекциях, вакцинации, действии ксенобиотиков) или образующимися эндогенно. Как правило, АТ специфически взаимодействуют с комплементарным АГ. Однако существуют АТ, взаимодействующие с АГ-детерминантами, общими для различных АГ. Такие АТ известны как перекрёстно реагирующие, или гетероспецифичные. АТ существуют в миллионах

разновидностей и каждая молекула имеет уникальный участок связывания АГ-детерминанты. Практически АТ могут быть получены к любому АГ. В большинстве случаев АТ представлены сывороточными гликопротеинами, мигрирующими в составе медленной фракции  $\gamma$ -глобулинов при электрофорезе белков сыворотки. Поэтому для обозначения сывороточной фракции АТ иногда применяют устаревший термин « $\gamma$ -глобулины». В соответствии с международной классификацией, ныне совокупность сывороточных белков, обладающих свойствами АТ, называют Ig.

АТ образуют одну из основных фракций белков крови, составляя 20% массы общего белка плазмы. АТ устойчивы к действию слабых кислот и щелочей, а также к нагреванию до 60°C. Существует 5 классов Ig: IgG, IgM, IgA, IgE, IgD, различающихся по молекулярной массе, содержанию углеводов, составу полипептидных цепей, коэффициентам седиментации и др. характеристикам.

Структурная единица АТ - **мономер** - молекула цилиндрической формы, состоящая из 2-х идентичных тяжелых (H-heavy) и 2-х идентичных легких (L-light) аминокислотных цепей, соединенных дисульфидными S-S-связями (рис. 17).

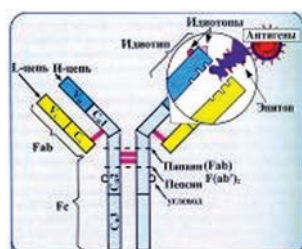


Рис. 17. Строение молекулы IgG

Молекулярная масса легких цепей составляет около 23 кД, и они состоят примерно из 214-220 аминокис-

лотных остатков. Молекулярная масса тяжелых цепей варьирует в пределах 50-73 кД. При обработке папаином молекула Ig распадается на 3 фрагмента. Два из них – одинаковые, состоят из легкой цепи и половины тяжелой цепи и обладают способностью соединяться с АГ. Эти два фрагмента обозначают как  $F(ab)_1$  и  $F(ab)_2$ , т.е. фрагменты, связывающие АГ (от англ. antigen binding). Установлено, что Fab-фрагменты определяют АТ-ельную специфичность Ig. Fab-фрагменты АТ взаимодействуют с антигенными детерминантами (принцип «ключ-замок»). Связывание АГ с АТ нековалентно и обратимо. Третий фрагмент с мол. массой около 55 кД состоит из двух половин H-цепей. В связи с постоянством аминокислотного состава, его обозначили как Fc – фрагмент (от англ. constant- постоянный). Fc – фрагмент не обладает способностью связывать АГ, но определяет ряд других важных видов биологической активности, необходимых для полного проявления всех функций АТ. С Fc – фрагментом связана способность АТ проходить через плаценту, усиливать фагоцитоз, нейтрализовать вирусы, связывать комплемент. Fc- фрагмент взаимодействует со своим рецептором в мембране различных типов клеток (макрофаг, нейтрофил, тучная клетка).

В зависимости от структуры H-цепей выделяют 5 классов (изотипов) АТ: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM), отличающихся физическими, функциональными, химическими и антигенными свойствами. Значительную помощь для постановки более обоснованного диагноза оказывает определение не только суммарного титра, но и класса Ig.

**IgM** – пентамер из 5 субъединиц, соединенных дисульфидными связями, имеет 10 АГ-связывающих участков, молекулярная масса 900000 Д (рис. 18), составляет около



10% антител сыворотки крови.

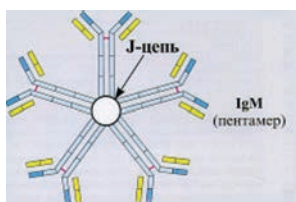


Рис.18. Строение молекулы IgM

В сыворотке здорового человека могут также циркулировать мономерные и 2-х валентные IgM (в высоких титрах их выявляют при макроглобулинемии Вальден-стрема). IgM - филогенетически наиболее древний Ig, что находит отражение в особенностях этого Ig (прежде всего его относительная неспецифичность). IgM – наиболее ранний класс АГ, обнаруживаемый при первичном попадании АГ в организм, выявление IgM указывает на наличие острого инфекционного процесса. Синтез других классов АГ при первичном контакте с конкретным АГ начинается позднее; несмотря на это, образование IgM к некоторым АГ (например, жгутиковым АГ бактерий) осуществляется постоянно. IgM – основной класс АГ, синтезируемых у новорожденных и младенцев. Пик их образования приходится на 4-5 сутки с последующим снижением титра. Период полужизни IgM составляет 5,1 дня. Fc – фрагмент IgM может участвовать в классическом пути активации комплемента. Молекулы IgM опсонизируют, агглютинируют, преципитируют и лизируют содержащие АГ структуры. В отличие от прочих Ig синтез Ig M мало подвержен действию иммунодепрессантов.

После первичного контакта с АГ синтез Ig M обычно сменяется образованием более дифференцированных **IgG**. IgG составляет около 75% антител сыворотки крови.



Имеется 4 подкласса – IgG 1, IgG 2, IgG 3, IgG 4. Мономер, имеет 2 эпитоп-связывающих участка.

Максимальные титры IgG при первичном ответе наблюдаются на 6-8 сутки. Обнаружение высоких титров IgG к АГ конкретного возбудителя указывает на то, что организм находится в стадии реконвалесценции или конкретное заболевание перенесено недавно, а также на обострение хронического заболевания. В большом количестве IgG синтезируются при вторичном иммунном ответе. IgG – основной класс АГ, защищающий организм от бактерий, вирусов и токсинов. Период полужизни IgG составляет 7-23 дня в зависимости от подкласса. IgG непосредственно участвуют в реакциях нейтрализации, а также усиливают фагоцитоз, действуя как опсонины и связывая рецепторы Fc – фрагмента в мембране фагоцитирующих клеток, в результате чего фагоциты поглощают и лизируют микроорганизмы. Fc – фрагмент IgG может участвовать в классическом пути активации комплемента. Особенностью IgG является высокая скорость связывания с АГ. Фракция IgG вызывает преципитацию растворимых АГ, а также агглютинацию и даже лизис (в присутствии комплемента) корпускулярных АГ. Только IgG беременной женщины форсируют плацентарный барьер путем опосредованного рецепторами эндцитоза. Транспорт IgG через плаценту обеспечивает формирование пассивного иммунитета у плода.

**IgA** (мол.масса 170 тыс. Да) (составляют 15-20% всех Ig) секретируются поверхностью эпителиев, присутствуют в слюне, слезах, молоке, выделяются на поверхность слизистых оболочек, где взаимодействуют с АГ, усиливая защитные свойства слизистых оболочек пищеварительного тракта, дыхательных, половых и мочевыводящих путей.

В сыворотке крови IgA циркулирует в виде мономеров, а в секретируемых Ig преобладают 4-х-валентные димеры, имеющие секреторный компонент, который защищает антитело от разрушения ферментами. Период полужизни Ig A составляет 5,8 дня.

**IgE** (м.м. 180 тыс. Да) составляют 0,002% АТ сыворотки крови. Мономер, имеет два эпитопсвязывающих участка.

Участвуют в противопаразитарном иммунитете и в ответе на аллергены. Фав фрагменты молекулы IgE специфически взаимодействуют с АГ, попавшим в организм. Сформированный иммунный комплекс взаимодействует с рецепторами Fc-фрагментов IgE, встроенных в клеточную мембрану базофила или тучной клетки. Это взаимодействие является сигналом для экзоцитоза гистамина, других биологически активных веществ и развертывания острой аллергической реакции. Защитные потенции Ig E направлены преимущественно против гельминтов. Синтез IgE увеличивается при паразитарных инвазиях, IgE – моноклональной миеломе. Период полужизни IgE составляет 2,3 дня.

**IgD** – составляют около 0,2% АТ сыворотки крови. Мономер, имеет два эпитопсвязывающих участка.

Биологическая роль этих Ig не установлена. IgD обнаружен на поверхности развивающихся В-лимфоцитов, контролируя их активацию и супрессию. Увеличение содержания IgD достигает максимума к 10 годам жизни, некоторое увеличение титров находят у беременных, у больных бронхиальной астмой, системной красной волчанкой и лиц с иммунодефицитами. Период полужизни IgD составляет 2,8 дня.

Важными характеристиками АТ являются: **аффинность** – прочность связывания АТ с АГ, которая зависит от пространственного соответствия реагирующих

поверхностей, соотношения концентраций связанных и свободных АГ и АТ, электростатических, гидрофобных воздействий и сил Ван дер Ваальса. Аффинитет – мера специфичности АТ. **Авидность** – интегральная характеристика силы связи (прочности) между АГ и АТ, учитывающая взаимодействие всех активных центров АТ со всеми эпитопами АГ. Это свойство АТ, определяет степень их сродства к АГ и реакцию формирования комплекса АГ-АТ. Авидность зависит как от аффинности, так и от числа активных центров на молекуле АТ. Авидность возрастает при избытке АГ, т.к. молекула АТ может формировать множественные связи с АГ. **Валентность** – равна числу активных (АГ-связывающих) центров АТ. Ig разных классов бывают 2-х валентными (IgG) (такие АТ известны как **полные АТ**), или **поливалентными** (IgM). Это свойство АТ выявляется при взаимодействии их с АГ: связываясь с АГ-енными детерминантами, IgG и IgM вызывают их видимую агрегацию. Мономерные же молекулы IgA, хотя и имеют два активных центра, не осаждают АГ, т.к. их активные центры настолько сближены, что IgA не может выполнять роль связующего мостика.

Наряду с двухвалентными, в организме существуют также **неполные АТ**. Такие АТ называют еще моновалентными или блокирующими. Эти Ig отличаются наличием на молекуле 1-ого активного специфического участка. Соединяясь с АГ, они не могут агрегировать частицы в крупные конгломераты, а лишь блокируют их. Это не значит, что второй активный центр молекулы отсутствует, он просто экранирован различными структурами, либо обладает низкой авидностью. Для выявления неполных АТ существуют специальные реакции – проба Кумбса, блокирующая проба и др.

**«Нормальные» АТ (синоним – природные АТ) –**

АТ, появление которых не связано с иммунизацией или инфекцией. Таких АТ два рода: 1-ые направлены против определенных изоантигенов. 2-ые направлены против антигенов, не относящихся к изоантигенам. Например, в сыворотке крови в небольших титрах обнаруживаются АТ против бактерий кишечной группы, многих кокков, некоторых чужеродных клеток. В крови человека и животных обнаруживают АТ, которые могут реагировать с различными АГ (эритроцитами, бактериями и т.д.), несмотря на то, что организм не подвергался иммунизации этими АГ. Не исключено, что часть нормальных АТ является обычными иммунными АТ, выработанными на инфекционный агент, проникший в небольшой дозе и вызвавший латентное заболевание. Возникновение нормальных АТ может быть обусловлено попаданием АГ с пищей.

Важной характеристикой АТ является **специфичность**. Специфичность АТ определяется по их способности отличать АГ, против которого они были получены (гомологичный АГ), от любого другого АГ. Иммунологический перекрест – это способность АТ взаимодействовать со сходными АГ, отличными от гомологичного. В большинстве случаев перекрестно-реагирующие АТ имеют к данным АГ более низкую аффинность, чем к гомологичному. Однако могут быть исключения. Это явление называется гетероклитичностью, а АТ, обладающие большим аффинитетом к гетерологичному АГ, называются гетероклитичными. В последнее время предлагается концепция **полиспецифичности**, заключающаяся в том, что каждое АТ в действительности может с высокой аффинностью связываться с множеством совершенно разных АГ. **Перекрестно-реагирующие или гетероспецифичные Ig** – это АТ, взаимодействующие с АГ-детерминантами,

общими для различных АГ.

Взаимодействие АТ с АГ носит специфический характер. Продуктами этой реакции являются иммунные агрегаты (комплексы АГ=АТ), которые могут образовывать преципитат в случае растворимого АГ, или агглютинат - в случае корпускулярного АГ.

Реакции АГ=АТ *in vitro* имеют большое диагностическое значение, т.к. благодаря своей специфичности они позволяют количественно и качественно обнаруживать АГ или АТ. Существующие серологические и иммунохимические методы дают возможность определять любые антигены, используя моноспецифические сыворотки. **Специфичность** – способность АГ или АТ реагировать только с гомологичным АГ или АГ, соответственно. Чем выше специфичность, тем меньше регистрируется ложно+ и ложно - результатов. **Чувствительность** – возможность определения минимальных количеств АГ или АТ.

В серологических реакциях участвуют АТ, принадлежащие, главным образом, к Ig классов G и M.

### 5.1.3. Взаимодействие антитела с антигеном

Реакция взаимодействия АТ с АГ имеет несколько типичных физико-химических характеристик:

А) **Потребность в электролитах.** Взаимодействие АТ с АГ происходит только в среде электролитов. Оптимальная концентрация электролитов соответствует 0,85% раствору NaCl, pH = 6,4-8,6, ионная сила раствора 0,05-0,1.

Б) **Скорость соединения.** Соединение специфических участков АГ и АТ происходит в 1-е же секунды или минуты реакции – фаза взаимодействия. Визуально наблюдаемый эффект – фаза проявления (агглютинация, преципитация, лизис) может развиваться через

несколько часов (2-18-24 ч.)

**В) Обратимость.** Комплекс АТ-АГ может диссоциировать с высвобождением (элюцией) АТ. Элюцией пользуются для получения высокоспецифических АТ против конкретного АГ или АГ-ой детерминанты. Она происходит при увеличении рН среды до 9-10 или понижении рН до 5-3, при повышении концентрации NaCl до 15% и более, а также температуры до 60 °С.

**Г) Экзотермичность.** При взаимодействии АГ и АТ выделяется небольшое количество тепла.

АТ обычно разделяют в соответствии с типом их реакций с АГ:

- **Антитоксические** АТ к токсинам и анатоксинам нейтрализуют или флокулируют АГ.
- **Агглютинирующие** АТ агрегируют АГ. Их выявляют в реакциях с корпускулярными АГ и растворимыми АГ, сорбированными на поверхности видимых корпускулярных частиц (эритроциты, латекс).
- **Преципитирующие** АТ образуют комплекс АГ-АТ с растворимыми АГ только в растворах или гелях.
- **Лизирующие** АТ вызывают разрушение клеток-мишеней (обычно взаимодействуя с комплементом).
- **Опсонизирующие** АТ взаимодействуют с поверхностными структурами клеток микробов или заражённых клеток организма, способствуя поглощению их фагоцитами.
- **Нейтрализующие** АТ инактивируют АГ (токсины, микроорганизмы), лишая их возможности проявлять патогенное действие.

АТ, взаимодействуя в организме с различными АГ, предотвращают инфицирование или элиминируют возбудитель, либо блокируют развитие патологических реакций, активируя при этом все системы специфической защиты.

Реакции специфического взаимодействия АТ с АГ проявляются в виде нескольких основных феноменов: **Феномен агглютинации** - корпускулярные АГ-енные частицы (бактерии, эритроциты и т.д.) под влиянием АТ склеиваются между собой и оседают на дно пробирки в виде хлопьев или зерен. Склеивание микроорганизмов или эритроцитов друг с другом - проявление реакции прямой агглютинации - т.е. АТ действуют непосредственно на корпускулярные АГ-енные частицы (реакция агглютинации [РА] на стекле, объемная РА). Механизм РА соответствует теории «решетки», согласно которой агглютинат образуется при соединении одного активного центра АТ с детерминантной группой одного АГ, второго активного центра – с детерминантной группой другого АГ и т.д. Избыток или недостаток АТ или АГ задерживают агглютинацию. **Феномен преципитации** – эффект укрупнения растворимых АГ-енных субстанций под влиянием АТ с появлением помутнения прозрачных растворов (явление агрегации растворенных частиц). Нерастворимый комплекс АГ=АТ выпадает только в определенном диапазоне эквивалентных концентраций реагирующих молекул. В случае избытка АТ или АГ преципитация не развивается. Это не значит, однако, что взаимодействия не произошло, просто образовался растворимый комплекс АГ=АТ. **Феномен лизиса** – способность некоторых АТ растворять клетки, против которых они возникли. Эти АТ применительно к бактериям называются бактериолизинами, к эритроцитам – гемолизинами. Реакции иммунного лизиса характеризуются тем, что они не происходят при наличии только 2-х ингредиентов: АТ и АГ. Необходимо присутствие третьего компонента – комплемента. Вначале реакция идет по типу агглютинации, затем к комплексу АГ=АТ присо-



единяется комплемент и происходит локальное растворение оболочки бактерий, эритроцитов или др. клеток. **Феномен цитотоксичности** – АТ проявляют токсический эффект, лишая клетки жизнеспособности. Реакцию по выявлению цитотоксинов ставят с взвесью микробных клеток в солевом буферном растворе. Если к взвеси микробных клеток + иммунную сыворотку, содержащую цитотоксины + комплемент + краситель (эозин, трипановый синий), то клетки будут гибнуть и при пробе с красителем - окрасятся. Живые клетки не красятся. % погибших клеток свидетельствует о количестве цитотоксинов в сыворотке. **Феномен специфической задержки** - часто используется для сравнения 2-х изучаемых АГ. Например, готовят иммунную сыворотку против эритроцитов мыши. Чтобы определить содержатся ли там АТ против эритроцитов родственного вида животных (крысы), сыворотку обрабатывают эритроцитами крысы. Если уровень АТ в сыворотке снизился, то имеются родственные АГ, если совсем падает, то АГ идентичны. **Феномен опсонизации** (иммунный фагоцитоз) - АТ (через Fab-фрагменты) связываются с клеточной стенкой микроорганизма, Fc-фрагментом АТ взаимодействует с соответствующим рецептором фагоцита. Это опосредует последующее эффективное поглощение фагоцитом образовавшегося комплекса, т.е. АТ усиливают фагоцитарную активность нейтрофилов и макрофагов в отношении тех АГ-енных субстанций или микроорганизмов, против которых они получены. **Активация комплемента** - АТ (IgM и IgG) после связывания с АГ (микроорганизм, опухолевая клетка и др.) активируют систему комплемента, что приводит к уничтожению этой клетки путём перфорации её клеточной стенки, усиления хемотаксиса и иммунного фагоцитоза. **Ан-**



**тителозависимая цитотоксичность.** Опсонизируя АГ, АТ стимулируют их разрушение цитотоксическими клетками. Аппарат, обеспечивающий распознавание мишеней, - рецепторы к Fc-фрагментам АТ. Разрушать опсонизированные мишени способны макрофаги и гранулоциты (например, нейтрофилы).

До тех пор, пока не была выяснена химическая природа АТ, полагали, что каждая реакция иммунной сыворотки опосредуется особым видом АТ, которые получили соответственно название агглютининов, преципитинов, опсопинов, антитоксинов и т. п. Хотя эти названия сохранились, они имеют чисто феноменологическое значение, т. е. отражают конечный результат взаимодействия АТ с АГ. В настоящее время уже ясно, что нет специальных АТ - агглютининов, преципитинов и т.д., а есть 5 классов иммуноглобулинов. Специфичность АТ, относящихся к любому классу иммуноглобулинов, определяется структурой активного центра, причем АТ данной специфичности могут относиться к разным классам. Конечный исход взаимодействия АГ с АТ зависит от природы АГ (корпускулярный - агглютинация, растворимый - преципитация); от участия системы комплемента (бактериолиз, бактерицидное действие); от того, к какому, классу иммуноглобулинов относится данное АТ; от свойств его Fc-фрагмента. Разные классы иммуноглобулинов в неодинаковой степени участвуют в различных иммунологических реакциях. Высокая нейтрализующая активность АТ, принадлежащих к IgG, свидетельствует о важной роли их в антитоксическом иммунитете. IgM особенно активны в реакциях фагоцитоза с корпускулярными АГ и поэтому играют существенную роль в антимикробном иммунитете. В реакции нейтрализации вирусов особенно активны IgA, следовательно, им

принадлежит значительная роль в противовирусном иммунитете. Кроме того, секреторные IgA обуславливают местный иммунитет слизистых оболочек. Наконец, IgE опосредуют реакции гиперчувствительности немедленного типа.

На скорость образования АГ влияет ряд факторов: доза АГ (сила АГ-воздействия), частота АГ-стимуляции и состояние иммунной системы индивида. Если организм впервые встречается с АГ, то развивается первичный иммунный ответ, а при повторном контакте - вторичный ответ.

**Первичный ответ.** Появлению АГ предшествует *латентный период* продолжительностью 3-5 сут. В это время происходит распознавание АГ и образование клонов плазматических клеток. Затем наступает *логарифмическая фаза*, соответствующая поступлению АГ в кровь; её продолжительность - 7-15 сут. Постепенно титры АГ достигают пика и наступает *стационарная фаза* продолжительностью 15-30 сут. Её сменяет *фаза снижения* титров АГ, длящаяся 1-6 мес. В основу пролиферации клеток-продуцентов АГ заложен принцип селекции. В динамике антителообразования титры высокоаффинных АГ постепенно нарастают: после иммунизации аффинность АТ к АГ постоянно увеличивается. Первоначально образуются IgM, но постепенно их образование уменьшается и начинает преобладать синтез IgG. Так как переключение синтезов от IgM к IgG не меняет идиотипа АТ (то есть его специфичности по отношению к конкретному АГ), то оно не связано с клональной селекцией. Особенности первичного ответа - низкая скорость антителообразования и появление сравнительно невысоких титров АТ.

**Вторичный ответ.** После антигенной стимуляции

часть В- и Т-лимфоцитов циркулирует в виде клеток памяти. Особенности вторичного иммунного ответа - высокая скорость антителообразования, появление максимальных титров АТ и длительное (иногда многолетнее) их циркулирование. Основные характеристики вторичного ответа: образование АТ индуцируется значительно меньшими дозами АГ; индуктивная фаза сокращается до 5-6 ч; среди АТ доминируют IgG с большой аффинностью, пик их образования наступит раньше (3-5 сут); АТ образуются в более высоких титрах и циркулируют в организме длительное время. Благодаря своей способности специфически взаимодействовать с бактериальными клетками и продуктами их жизнедеятельности, в том числе с токсинами и ферментами, АТ играют важную роль в формировании приобретенного постинфекционного, поствакцинального и пассивного иммунитета. Эта их роль заключается в том, что, связываясь с токсинами, они нейтрализуют их действие и обеспечивают формирование антитоксического иммунитета. Связываясь с вирусами, особенно блокируя рецепторы, с помощью которых вирусы адсорбируются на клетках, АТ создают иммунитет против вирусов. Образование комплекса АТ=АГ запускает классический путь активации системы комплемента со всеми его эффекторными последствиями (лизис бактерий, опсонизация, формирование очага воспаления, стимуляция системы макрофагов). АТ, взаимодействуя с бактериями, опсонизируют их, т.е. делают их фагоцитоз более эффективным. В результате взаимодействия АТ с растворимыми АГ, выделяющимися в кровь, образуются так называемые растворимые иммунные комплексы, с помощью которых АГ выводятся из организма, в основном желчью и мочой.

#### 5.1.4. Иммуносерологические методы исследования

Взаимодействие АГ с АТ проявляется в форме различных серологических (от лат. *serum* - сыворотка) реакций. В связи с их высокой чувствительностью и специфичностью они нашли широкое диагностическое применение. Серологические реакции активно используют при проведении полного объёма диагностических исследований. Они применяются с одинаковым успехом для двух целей. Во-первых, по известному антигену (диагностикуму) определяют в исследуемой сыворотке наличие и количественное содержание специфических к данному АГ антител. Последнее устанавливают путем титрования сыворотки. **Титром иммунной сыворотки** считают то ее максимальное разведение, которое еще дает положительную реакцию. Увеличение титров АТ - зачастую единственный дифференциально-диагностический признак, указывающий на инфекционное заболевание. Выявление АТ особенно актуально при неудачных попытках выделить возбудителя инфекции. Во-вторых, с помощью известного антитела, т.е. диагностической иммунной сыворотки, определяют наличие в исследуемом материале специфического АГ или осуществляют серологическую идентификацию выделенного возбудителя.

С диагностической целью используют следующие серологические реакции: реакция агглютинации в ее различных вариантах, реакция преципитации и ее различные модификации, реакции иммунофлуоресценции в прямом и непрямом вариантах, реакции с участием комплемента, реакции с участием фагоцитов, реакции иммуносорбентного анализа на твердой фазе, реакции нейтрализации биологической активности возбудителя или токсинов.

**Реакция агглютинации.** Реакция агглютинации (РА) [от лат. *agglutinatio*, склеивание] - склеивание антиген-несущих корпускулярных частиц (микроорганизмы, клетки различного происхождения, частицы латекса и др.) молекулами специфических АТ в присутствии электролитов, которое заканчивается образованием видимых невооруженным глазом хлопьев или осадка (агглютината). Характер осадка зависит от природы АГ: жгутиковые бактерии дают крупнохлопьевидный осадок, безжгутиковые и бескапсульные – мелкозернистый, капсульные – тяжистый. Различают агглютинацию прямую, при которой во взаимодействии со специфическими АТ непосредственно участвуют собственные АГ бактериальной или любой другой клетки; и непрямую, или пассивную, при которой бактериальные клетки, или эритроциты, или частицы латекса являются носителями не собственных, а сорбированных на них чужих АГ (или АТ) для выявления специфических к ним АТ (или АГ). В реакции агглютинации участвуют главным образом антитела, относящиеся к классам IgG и IgM. Она протекает в две фазы: вначале происходит специфическое взаимодействие активного центра АТ с детерминантой АГ, эта стадия может происходить в отсутствие электролитов и не сопровождается видимыми изменениями реагирующей системы. Для второй стадии - образования агглютината - необходимо наличие электролитов, которые снижают электрический заряд комплексов АГ + АТ и ускоряют процесс их склеивания. Эта фаза заканчивается образованием агглютината.

РА ставят либо на стеклянных, либо на гладких пластиковых пластинках, либо в стерильных агглютинационных пробирках.

Реакции агглютинации (прямые и пассивные) на сте-

кле обычно применяют в качестве ускоренного метода обнаружения специфических АТ в сыворотке больного или для серологической идентификации возбудителя. В последнем случае обычно используют хорошо очищенные (адсорбированные) диагностические сыворотки, содержащие только монорецепторные АТ или их набор к различным антигенам. Несомненным достоинством РА на стекле является простота ее постановки и то, что она протекает несколько минут или даже секунд, так как оба компонента в ней используются в концентрированном виде. Однако она имеет лишь качественное значение и менее чувствительна, чем пробирочная. Разновидности РА для выявления АТ - **кровяно-капельная проба на туляремию** (с нанесением диагностикума на каплю крови и появлением видимых белёсых агглютинатов) и **реакция Хеддльсона на бруцеллёз** (с нанесением на каплю сыворотки крови диагностикума, окрашенного генциановым фиолетовым).

Развернутая РА в пробирках дает более точные результаты, ибо она позволяет определить количественное содержание АТ в сыворотке (установить ее титр) и при необходимости зарегистрировать факт нарастания титра антител, что имеет диагностическое значение. Необходимо учесть, что при смешивании растворов гомологичных АГ и АТ не всегда наблюдаются видимые проявления РА. Осадок образуется только при некоторых оптимальных соотношениях обоих компонентов реакции. Вне этих пределов, при значительном избытке АГ или АТ, реакции не наблюдается. Это явление получило название «феномена прозоны». Появление прозоны в иммунных реакциях объясняется тем, что участвующие в них АГ, как правило, являются полидетерминантными, а молекулы IgG имеют два ак-

тивных центра. При избытке АТ поверхность каждой частицы АГ покрывается молекулами АТ так, что не остается свободных детерминантных групп, поэтому второй, несвязанный активный центр антител не может взаимодействовать с другой антигенной частицей и связывать их друг с другом. Образование видимого агглютината или преципитата подавляется также при избытке АГ, когда не остается ни одного свободного активного центра АТ, и поэтому комплексы АГ + АТ + АГ не могут более укрупняться.

**Реакции прямой гемагглютинации.** Простейшая из подобных реакций - агглютинация эритроцитов или гемагглютинация, применяемая, в частности, для определения групп крови в системе АВ0. Для определения агглютинации (или её отсутствия) используют стандартные антисыворотки с анти-А и анти-В-агглютинидами. Реакция называется прямой, так как исследуемые АГ - естественные компоненты эритроцитов. Общие с прямой гемагглютинацией механизмы имеет **вирусная гемагглютинация** (рис. 19).

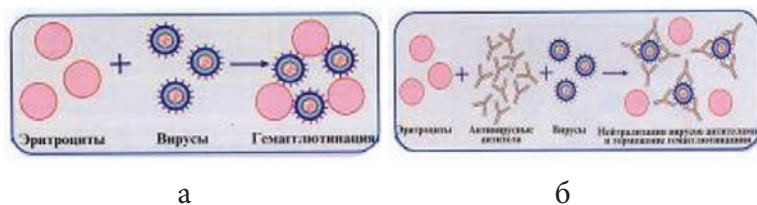


Рис. 19. Реакции вирусной гемагглютинации (а) и торможения гемагглютинации (б).

Многие вирусы способны спонтанно агглютинировать эритроциты птиц и млекопитающих, их добавление к суспензии эритроцитов вызывает образование агрегатов.

Варианты реакций агглютинации

**Реакция пассивной гемагглютинации и ее вариан-**



**ты.** Классическая реакция агглютинации предусматривает использование корпускулярных АГ. Однако в ней могут участвовать и растворимые АГ. Чтобы это стало возможным, такие АГ адсорбируют на иммунологически инертных частицах. В качестве носителя можно использовать частицы латекса или бентонита, однако в настоящее время наиболее часто применяют эритроциты животных или человека, улучшая их адсорбирующие свойства обработкой растворами танина, формалина или бензидина. Эритроциты, адсорбированные на себе АГ (АТ), называются сенсibilизированными данным АГ (АТ), а иммунная реакция, в которой они участвуют, - **реакцией непрямой, или пассивной гемагглютинации (РНГА или РПГА)**, так как эритроциты участвуют в ней пассивно.

РПГА ставят в специальных полистироловых пластинках с луночками, имеющими полусферическое дно. В этих луночках готовят двукратные разведения в физиологическом растворе (ФР) исследуемой сыворотки, и затем добавляют к ней в качестве диагностикума взвесь сенсibilизированных эритроцитов. Учет результатов проводят через 2 ч инкубации при 37°C по четырехкестной системе. При положительной реакции агглютинировавшие эритроциты оседают на дно луночки и равномерно покрывают его в виде перевернутого зонтика. При отрицательной реакции эритроциты тоже оседают, жидкость становится прозрачной, осадок выглядит как маленький диск в центре луночки. Титром сыворотки в РПГА считается последнее ее разведение, которое еще дает ярко выраженную гемагглютинацию без значительных признаков наличия диска.

Вариантами использования РПГА являются: реакция нейтрализации антигена (РНАг), реакция нейтрализации антител (РНАт), реакция торможения пассивной



гемагглютинации (РТПГА). Для этих реакций используют антигенные и антительные эритроцитарные диагностикумы.

**Реакция торможения пассивной гемагглютинации (РТПГА)** контролирует специфичность РПГА. Включает три компонента: АГ (АТ), АТ (АГ) и АТ (АГ), адсорбированные на эритроцитах. Первоначально АГ (АТ) реагирует с определенным количеством АТ (стандартная антисыворотка) (АГ), затем в смесь вносят эритроциты, сенсibilизированные АТ (АГ). За счет уменьшения количества АГ (АТ) в исследуемом материале после связывания с АТ стандартной сыворотки (АГ), отмечается разница в титрах РПГА и РТПГА (торможение агглютинации). Учет результатов реакции аналогичен учету в РПГА.

**Реакция нейтрализации антител (РНАт)** - суспензию, содержащую искомым АГ, смешивают со специфической иммунной сывороткой, содержащей известные АТ в соответствующих объемах, и инкубируют при 37°C. После этого добавляют антигенный эритроцитарный диагностикум. Смесь встряхивают и оставляют при комнатной температуре. Результаты учитывают через 3-4 ч и окончательно - через 18-24 ч. Если в исследуемом материале имеется АГ, он свяжет добавленные специфические АТ (нейтрализует их), и поэтому гемагглютинации не произойдет. При положительной реакции на дне луночки формируется диск, при отрицательной – «зонтик».

По такому же принципу ставят **реакцию нейтрализации антигена (РНАг)**. Только в этом случае в исследуемом материале обнаруживают АТ. Специфический АГ, добавленный к такому исследуемому материалу, будет связываться с антителами, содержащимися в нем, т. е. произойдет нейтрализация антигена антите-

лами, и поэтому гемагглютинации при добавлении антительного эритроцитарного диагностикума не произойдет. Учет результатов реакции аналогичен учету в РНАт.

**Реакция коагглютинации.** Является одним из вариантов пассивной реакции агглютинации на стекле. В основу этой реакции положено уникальное свойство золотистого стафилококка, имеющего в составе своей клеточной стенки белок А, связываться с Fc-фрагментами IgG и IgM.

При этом активные центры АТ остаются свободными и могут взаимодействовать со специфическими детерминантами АГ. На предметное стекло наносят каплю 2% взвеси стафилококков, сенсibilизированных соответствующими АТ, и добавляют каплю взвеси исследуемых бактерий. При соответствии антигена антителам через 30-60 секунд происходит четкая агглютинация нагруженных антителами стафилококков.

**Реакция агглютинации латекса (РАЛ).** Носителем иммунных реагентов в этой диагностической системе являются мелкие стандартные частицы латекса. У нас в стране используют полистироловые монодисперсные латексы с разным диаметром частиц (0.3, 0.66, 0.75, 0.8 мкм). РАЛ выполняют на стекле. Основным условием успешной постановки реакции является строгое соблюдение количественных соотношений компонентов системы. Специфичность контролируют с помощью 3-х контрольных тестов: заведомо + реакция, заведомо – и контроль качества латексной суспензии по взаимодействию несенсibilизированного латекса с исследуемым материалом. РАЛ можно использовать как для экспресс-детекции микроорганизмов или их АГ в исследуемом материале, так и выявления АТ в сыворотках.

**Иммуномагнитное обнаружение антигенов.** Один из вариантов ускоренной реакции агглютинации на

стекле связан с применением супермагнитных полимерных частиц, покрытых специфическими АТ. Одна такая частица связывает до  $10^7$ -  $10^8$  клеток микроорганизмов, благодаря чему чувствительность данного метода достигает 5 КОЕ/мл.

**Реакция агрегат-гемагглютинации (РАГА).** Позволяет быстро обнаружить в крови больных как свободно циркулирующие АГ (антигенемия), так и циркулирующие иммунные комплексы (АТ+АГ). Для РАГА используют эритроциты, сенсibilизированные соответствующими АТ. Добавление сыворотки крови больного, в которой содержатся АГ, к сенсibilизированным эритроцитам, на которых фиксированы АТ, приводит к склеиванию (агглютинации) эритроцитов и иммунных комплексов.

**Антиглобулиновая проба Кумбса (реакция р.Кумбса).** При помощи реакций прямой и пассивной агглютинации определяют полные (двухвалентные) АТ. Неполные (моновалентные, блокирующие) АТ не выявляются в этих реакциях, так как, соединяясь с АГ, блокируют его, но не могут вызвать агрегации АГ в крупные конгломераты. Неполными (блокирующими) называют антитела, у которых функционирует только один активный центр; второй активный центр по неизвестной причине не срабатывает. Для выявления неполных АТ применяют специальную реакцию Кумбса, в которой используются сыворотка больного, корпускулярный антиген-диагностикум, антиглобулиновая сыворотка, содержащая АТ к используемому (человеческому) глобулину. Реакция протекает в два этапа: 1. Взаимодействие АГ с неполными АТ. Видимых проявлений при этом нет. Первый этап заканчивают отмывкой АГ от остатков сыворотки больного. 2. Взаимодействие антиглобулиновой сыворотки с не-

полными АГ, адсорбированными на АГ. В силу того, что антиглобулиновые АГ двухвалентны, они связывают два одновалентных АГ отдельных комплексов АГ + неполное АГ, что приводит к их склеиванию и появлению видимого осадка.

Р. Кумбса применяют, например, при серологической диагностике бруцеллеза, при анализе групп крови, в диагностике аутоиммунных заболеваний и др.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ**

### **Иммуносерологические методы исследования**

В соответствии с решаемыми задачами иммуносерологические методы исследования применяются для серологической диагностики инфекционных болезней, идентификации неизвестной культуры микроорганизмов, выделенной от больных или из объектов внешней среды, выявления АГ в различных биологических образцах и др.

При серодиагностике инфекционных заболеваний с целью обнаружения специфических АГ исследуют сыворотку больного. Для получения сыворотки кровь у больного берут из вены при соблюдении правил асептики в количестве 3-10 мл в стерильную пробирку с этикеткой, на которой указаны фамилия больного, дата, предполагаемый диагноз и направляют в лабораторию. Кровь оставляют на 1 ч при комнатной температуре или помещают в термостат при 37°C на 30 мин. Образовавшийся сгусток отделяют от стенок пробирки пастеровской пипеткой или бактериологической петлей, пробирку помещают в холодильник для лучшего отделения сыворотки, которую затем отсасывают пипеткой, снабженной резиновым баллоном. При наличии форменных элементов крови сыворотку центрифугируют (500xg, 10 мин). Для удобства хранения

и транспортировки кровь можно наносить на фильтровальную бумагу около 2 см диаметром, высушивать на воздухе и направлять в лабораторию. Перед исследованием пропитанную кровью бумагу мелко нарезают, помещают в пробирку и заливают 1 мл физиологического раствора. Пробирку ставят на 1-2 ч в термостат или оставляют на 5-6 ч при комнатной температуре для экстракции АГ. При необходимости длительного хранения сыворотку можно также консервировать (добавлением борной кислоты, мертиолат натрия, азида натрия, хинозола и т. д.), заморозить и хранить при низкой температуре (-20-70°C) или лиофилизировать.

Для постановки серологических реакций в исследуемую сыворотку добавляют мертиолат натрия 1:10000, разводят ФР 1:10 и прогревают на водяной бане при 56°C в течение 30 мин для инактивации компонента и стабилизации иммуноглобулинов. Допускается инактивация сывороток при 60°C в течение 5 мин.

В качестве АГ при исследовании сывороток используют стандартные диагностикумы в виде взвеси микробов или их водных или спиртовых экстрактов. Стандартные диагностикумы различных видов микроорганизмов выпускаются предприятиями-изготовителями в ампулах с этикетками и инструкциями по их применению. В некоторых случаях в качестве АГ используют живую культуру микроорганизмов.

При идентификации исследуемой бактериальной культуры, определении ее серовара, изучении АГ, используют специфические диагностические сыворотки, полученные в производственных или экспериментальных условиях путем гипериммунизации животных (чаще кроликов или лошадей) соответствующим АГ. В качестве АГ для иммунизации применяют взвесь живых или убитых микробов, лизаты и экстракты кле-

ток и тканей, растворимые АГ, эритроциты и т. д. У иммунных сывороток определяют титр, т. е. то наибольшее разведение, при котором реакция АГ+АТ еще учитывается. Полученную сыворотку разливают в ампулы, указывают на этикетке наименование и титр. В большинстве случаев сыворотку высушивают и перед употреблением растворяют, как указано на этикетке. Сыворотка может быть специфичной в пределах рода, вида, варианта (типа) и ее специфичность обусловлена тем, что она реагирует только с гомологичными АГ и не реагирует с гетерологичными. Неадсорбированные сыворотки обладают высоким титром, который достигает в РА 1:12800 и выше. Эти сыворотки не свободны от АТ к микробам, имеющим общие АГ в пределах группы, рода и семейства, в результате чего способны давать групповые реакции. Адсорбированные сыворотки отличаются строгой специфичностью, но обладают низкими титрами-1:40- 1:320. Адсорбированные сыворотки не подлежат разведению и в основном применяются в реакции агглютинации на стекле.

При установлении родовой, видовой принадлежности микроба и определении его серовара серологическим методом имеет значение концентрация микробной взвеси, которую определяют по отраслевому стандартному образцу (ОСО) мутности. ОСО выпускаются Государственным научно-исследовательским институтом стандартизации и контроля биологических препаратов имени Л. А. Тарасевича в виде набора, к которому прилагается шрифтовая таблица и пробирки, соответствующие пробиркам эталона. ОСО на 10 ед соответствует:  $0,93 \cdot 10^9$  клеток/мл микробов кишечной группы;  $11 \cdot 10^9$  клеток/мл микробов коклюшной группы;  $1,7 \cdot 10^9$  клеток/мл бруцелл;  $2,2 \cdot 10^9$  клеток/мл холерных вибрионов;  $5 \cdot 10^9$  клеток/мл туляремийного

микроба. Для приготовления микробной взвеси используют 18-48-часовые культуры испытуемых штаммов, выращенные на плотной питательной среде. В стандартных пробирках готовят взвесь микробов, для чего в 3-5 мл ФР эмульгируют порциями культуру, сравнивая со стандартом мутности. Сравнение производят визуально в лучах падающего света на фоне шрифтовой таблицы.

Кроме того, для приготовления бактериальной суспензии определенной концентрации можно использовать стандарт мутности по Мак-Фарланду. При этом количественная характеристика исследуемой микробной взвеси определяется путем сравнения с ближайшими по мутности пробирками тем же способом, что и при использовании ОСО.

### **Агглютинационные методы**

**Реакция агглютинации (РА) (Синонимы: классическая, развернутая, линейная, объемная, пробирочная).** Применяется для ускоренной идентификации микроорганизмов, а также для серодиагностики некоторых инфекционных заболеваний.

**Пробирочная РА.** На салфетку, смоченную дез. раствором, ставят штатив с рядом пробирок, количество которых зависит от титра сыворотки. Работу начинают с приготовления основного разведения сыворотки, которое, в зависимости от цели исследования, может составлять 1:10, 1:25, 1:50, 1:100 (табл. 1).

Таблица 1

#### **Приготовление основного разведения сыворотки**

Ингредиенты, мл	Разведение сыворотки			
	1:10	1:25	1:50	1:100
Физиологический раствор	1,8	2,4	4,9	9,9

Цельная сыворотка	0,2	0,1	0,1	0,1
-------------------	-----	-----	-----	-----

Затем сыворотку титруют двукратно в объеме 0,5 мл (табл.2).

Таблица 2

Схема постановки пробирочной реакции агглютинации

Ингредиенты, мл	Разведение сыворотки (конечное)							Контроль	
	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	АТ	АГ
Физиологический раствор (ФР)	-	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Сыворотка 1:25	0,5	0,5 титрация по 0,5 0,5 (удалить)						0,5	-
Антиген	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	-	0,5

В ряд пробирок, начиная со второй, вносят по 0,5 мл ФР. В первую и вторую пробирку вливают по 0,5 мл основного разведения сыворотки и, начиная со второй пробирки после тщательного перемешивания сыворотки с ФР, переносят 0,5 мл в третью пробирку, из третьей в четвертую и т. д. Из последней пробирки 0,5 мл сыворотки удаляют в дез. раствор для сохранения одинакового объема. В пробирку с контролем сыворотки вносят 0,5 мл ФР и 0,5 мл основного разведения сыворотки. В полученные разведения сыворотки добавляют по 0,5 мл АГ (диагностикума или взвеси микробов), взятого в концентрации  $1 \cdot 10^9$  м.к./мл. В пробирку с контролем АГ вносят 0,5 мл ФР и 0,5 мл АГ. В результате добавления АГ во всех пробирках объем жидкости равен 1 мл. Соответственно и разведение сыворотки в пробирках увеличивается в два раза. Пробирки встряхивают и помещают в термостат при 37°C на 2-4 ч (в отдельных случаях на 18-20 ч), затем сутки выдерживают при комнатной температуре.

**Пробирочная РА с высушенной кровью.** Участок фильтровальной бумаги, пропитанный двумя капля-



ми крови, нарезают, переносят в пробирку с 1 мл ФР, выдерживают при 37°C в течение 2 ч или 5-6 ч при комнатной температуре. Прозрачный раствор служит материалом для исследования. Две капли крови, нанесенной на бумагу, равняются 0,1 мл крови и соответственно 0,05 мл сыворотки в ней. Следовательно, основное разведение исследуемой сыворотки в 1 мл ФР будет 1:20. Из полученного разведения готовят последующие разведения сыворотки. В остальном исследование проводится, как при пробирочной РА.

*Учет и оценка результатов реакции:* предварительный визуальный учет производят через 2-4 ч и окончательный (с использованием агглютиноскопа), спустя 18-24 ч. Пробирки просматривают до встряхивания в проходящем свете, обращая внимание на форму и величину осадка и на просветление надосадочной жидкости. Затем пробирку осторожно встряхивают, наблюдая за распределением осадка, появлением хлопьев и степенью помутнения жидкости. При положительной РА осадок покрывает все дно пробирки в виде зонтика. Надосадочная жидкость прозрачная. Осадок может состоять из легко разбивающихся хлопьев (Н-агглютинация), из плотных мелких зерен (О-агглютинация) или из хлопьев и зерен (ОН-агглютинация). В контроле сыворотки и контроле АГ не должно быть никаких хлопьев. Степень положительной РА оценивают по 4-крестовой системе: 4+ полная агглютинация (100%) - осадок в виде перевернутого зонтика, выстилающий все дно пробирки; при встряхивании распадается на крупные зерна и хлопья; надосадочная жидкость прозрачная; 3+ выраженная агглютинация (75%) - осадок выстилает 3/4 дна пробирки; при встряхивании распадается на крупные и средней величины зерна и хлопья; надосадочная жид-

кость прозрачная, слегка опалесцирует; 2+ средняя агглютинация (50%) - осадок занимает 1/2 площади дна пробирки; при встряхивании распадается на средней и мелкой величины зерна и хлопья; надосадочная жидкость опалесцирующая, слегка мутная; 1+ слабая (сомнительная) агглютинация (25%) - осадок небольшой в центре дна пробирки; надосадочная жидкость мутная; - отрицательная РА - осадок очень маленький в центре дна пробирки, при встряхивании поднимается в виде змейки, равномерно распределяется в жидкости; надосадочная жидкость до и после встряхивания мутная.

При серологической идентификации микроорганизма РА должна быть положительной (не менее трех плюсов) с соответствующей диагностической сывороткой до ее титра или, по крайней мере, до 1/2 - 1/4 титра.

Определение диагностического титра исследуемой сыворотки больного носит весьма условный ориентировочный характер. Существенное значение имеет нарастание уровня АТ в динамике заболевания, для чего исследуют парные сыворотки, полученные в начале и в конце первой недели заболевания.

**Пластинчатая РА:** образование крупнодисперсных частиц агглютината в результате специфического взаимодействия корпускулярного микробного АГ с АТ иммунной сыворотки на плоской поверхности (предметные стекла, фотопластинки, чашки Петри). Пластинчатая РА по чувствительности уступает пробирочной. В этой реакции используют адсорбированные или неадсорбированные сыворотки в разведениях 1:10, 1:25; 1:50; 1:100. Пластинчатая РА применяется для ускоренной ориентировочной сероидентификации микробов, для окончательной сероидентификации энтеробактерий, ускоренной серодиагностики некоторых инфекционных заболеваний, например, бруцелле-

за (РА Хеддельсона) и др.

Техника постановки реакции. На обезжиренное предметное стекло, а при работе с возбудителями особо опасных и высококонтагиозных заболеваний - в чашку Петри вносят каплю ЗФР (для контроля АГ) и такое же количество сыворотки, взятой в небольшом разведении (1:10, 1:25, 1:50 или 1:100) в зависимости от ее титра. Адсорбированная сыворотка используется без разведения. Изучаемую культуру эмульгируют бактериологической петлей в капле ЗФР. Затем микробную массу эмульгируют в капле сыворотки. Для реакции можно использовать микробную суспензию, приливая ее по 1-2 капли в опыт и контроль АГ. В этом случае смесь перемешивают стеклянной палочкой.

*Учет и оценка результатов реакции.* Спустя 3-5 мин производят учет РА невооруженным глазом или с помощью лупы. Основным критерием является степень просветления жидкости, величина и количество зерен агглютината. При положительной РА уже через 30-60 сек в опытной пробе начинают формироваться зерна агглютината, а жидкость постепенно просветляется. В контроле АГ - гомогенное помутнение.

При постановке пластинчатой РА с неадсорбированной иммунной сывороткой, взятой в невысоком разведении, результат реакции по идентификации выделенных микробов оценивается как предварительный, ориентировочный. В случае применения монорецепторной сыворотки, например, при серологической идентификации салмонелл или шигелл, результат регистрируется как окончательный, поскольку с помощью реакции определяется специфический АГ, присущий данному виду бактерий.

**Реакция пассивной (непрямой) гемагглютинации (РПГА, РНГА).** РПГА применяют для серологической

диагностики инфекционных заболеваний, определения титра иммунных сывороток, ускоренного обнаружения патогенных микроорганизмов в объектах внешней среды и различном биологическом материале. Реакция является достаточно специфичной и чувствительной:  $10^5$  -  $10^6$  м.к./мл.

Приготовление реактивов: 1% НКС - цельную кроличью сыворотку разводят ЗФР рН 7,2-7,4 1:2-1:4, инактивируют прогреванием при  $56^{\circ}\text{C}$  в течение 30 мин и адсорбируют 3-кратно отмытыми бараными эритроцитами. Эритроциты осаждают центрифугированием (500 x g, 5 мин), после чего надосадочную жидкость разводят ЗФР 1:100.

*Подготовка проб к исследованию:* перед постановкой РПГА и РТПГА исследуемый материал обеззараживают нейтральным формалином, добавляя его в пробы до 4% (0,2 мл на 2 мл пробы). Пробы оставляют при комнатной температуре на 1 ч, после чего ставят реакции. Формалин должен иметь нейтральный рН, т.к. в противном случае могут иметь место ложноположительные результаты.

Из пробы, предварительно обработанной формалином, часть жидкости (1-2 мл) отбирают и кипятят на водяной бане 15 мин с целью экстрагирования антигенов возбудителей сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, холеры. Оставшуюся часть пробы инактивируют на водяной бане при  $56^{\circ}\text{C}$  - 30 мин, если пробу исследуют на чуму, сап, мелиоидоз. Далее в пробирки добавляют 50% взвесь формализированных эритроцитов барана из расчета 1 капля взвеси на 1 мл пробы с целью устранения возможных неспецифических результатов РПГА. Смесь тщательно встряхивают, выдерживают 15 мин в термостате при  $37^{\circ}\text{C}$ . Затем центрифугируют при 1000-2000 об/мин в течение 3-5 мин.

Надосадочную жидкость отсасывают для постановки РПГА и РТПГА. Пробы воды, другие относительно малозагрязненные пробы, смывы чистой культуры с чашек можно не адсорбировать 50% взвесью эритроцитов.

*Подготовка исследуемых сывороток.* Перед постановкой опыта в исследуемые сыворотки добавляют мертиолат натрия 1:10 000, разводят ФР 1:10 и прогревают при 56°C в течение 20 мин, затем обрабатывают 50% взвесью формализированных эритроцитов барана (как описано выше).

**РПГА на обнаружение АГ:** В лунки верхнего ряда микропланшета (за исключением предпоследней лунки) автоматическим дозатором вносят 50 мкл ЗФР, содержащего 1% НКС (разводящая жидкость). Затем в первую лунку вносят 50 мкл раствора АГ (инактивированного исследуемого материала), разведенного 1:10 насыщенным раствором хлорида натрия (для предотвращения возможной неспецифической реакции), и титруют, перемешивая содержимое лунок и перенося по 50 мкл из 1-ой лунки во 2-ю, из 2-ой в 3-ю и т.д. до 10 лунки включительно, из которой 50 мкл раствора АГ удаляют в дез. раствор. Предпоследняя лунка – контроль АГ, сюда вносят 50 мкл заведомо положительного АГ. Последняя лунка - контроль диагностикума. После серии двукратного разбавления исследуемого материала в каждую лунку ряда вносят по 1 капле антигенового эритроцитарного диагностикума, который предварительно встряхивают. Перемешивание исследуемого материала и диагностикума достигается завихрением жидкости при падении капли в лунку. Более интенсивное перемешивание происходит при легком встряхивании планшета на столе. Планшет оставляют на 2 ч при комнатной температуре или по-

мещают при 37°C на 30 мин. После этого учитывают результаты.

**РПГА на обнаружение АГ.** Техника постановки реакции аналогична варианту на обнаружение АГ, с той лишь разницей, что в качестве исследуемого материала применяют исследуемую сыворотку в разведении 1:10 и антигенный эритроцитарный диагностикум. Предпоследняя лунка – контроль АГ - содержит заведомо положительную сыворотку.

*Учет и оценка результатов реакции.* Через 2 ч с момента осаждения эритроцитов в контролях проводят предварительный учет результатов, окончательный учет результатов реакции через 12-18 ч. Характер осадков эритроцитов оценивают по 4-крестовой шкале:

+ + + + - агглютинировавшие эритроциты ровным слоем выстилают все дно лунки, образуя по форме перевернутый купол (зонтик);

+ + + - по окружности равномерно агглютинировавших эритроцитов отмечается тонкое (“фестончатое”) кольцо;

++ - на фоне равномерно агглютинировавших эритроцитов отмечается кольцо меньшего диаметра с более ровным краем;

+ - четкое кольцо малого диаметра на слабо различимом фоне агглютинировавших эритроцитов;

– - агглютинация эритроцитов отсутствует, на дне лунки образуется маленькое кольцо с четким ровным краем или компактный диск (пуговка).

Реакцию учитывают только при отсутствии гемагглютинации в контролях диагностикума. РПГА считают положительной, если в лунках с исследуемым материалом имеется гемагглютинация не менее чем на 3 креста. РПГА считают отрицательной, если во всех лунках гемагглютинация отсутствует. При наличии

гемагглютинации как в опытной, так и контрольной лунке реакцию следует повторить с разведением исследуемого материала 1:5 и 1:10. Если и в этом случае эритроциты также будут агглютинировать во всех лунках, реакцию считают неспецифической и ее результаты не учитывают.

Реакция торможения пассивной (непрямой) гемагглютинации (РТПГА, РТНГА)

Принцип. Взаимодействие гомологичных АГ и АТ приводит к их нейтрализации, в результате чего тормозится агглютинация эритроцитов, сенсibilизированных специфическими АТ (АГ). Если АГ (АТ) гетерологичны, то их взаимодействие не произойдет и свободные АГ (АТ) вызовут агглютинацию индикаторных эритроцитов. РТПГА используется в качестве контроля специфичности РПГА, эти реакции ставятся параллельно.

**РТПГА на обнаружение АГ.** Компоненты и материалы те же, что в РПГА. Дополнительно - специфическая иммунная сыворотка активностью 8-16 СЕ.

В лунки верхнего ряда планшета вливают по 25 мкл разводящей жидкости. В первую лунку вносят 25 мкл исследуемого материала и титруют по 25 мкл до предпоследней лунки, из которой 25 мкл жидкости удаляют в дез. раствор. Во все лунки добавляют по 25 мкл специфической сыворотки в количестве 8-16 СЕ. За 1 СЕ принимают предельное разведение сыворотки, в котором еще регистрируется полное склеивание эритроцитов, определяемое предварительно в РПГА. Планшет выдерживают 30 мин при 37°C и добавляют во все лунки по 25 мкл антительного эритроцитарного диагностикума, встряхивают и оставляют при комнатной температуре на 2 ч до оседания эритроцитов. Реакцию сопровождают контролем эритроцитарного



диагностикума (25 мкл разводящей жидкости и 25 мкл антительного эритроцитарного диагностикума).

**РТПГА на обнаружение АТ.** Компоненты и материалы те же, что в РПГА. Дополнительно – взвесь убитой культуры активностью 8-16 антигенных единиц (АЕ).

В лунки микротитровальной пластины вливают по 25 мкл разводящей жидкости. В первую лунку вносят 25 мкл исследуемой сыворотки или другого материала, содержащего АТ, и титруют по 25 мкл до предпоследней лунки, из которой 25 мкл жидкости удаляют в дезраствор. Во все лунки вносят по 25 мкл гомологичного АГ в количестве 8-16 АЕ. 1 АЕ – минимальное разведение АГ, в котором регистрируется полное склеивание эритроцитов в РПГА. Пластины встряхивают, выдерживают 30 мин при 37°C и добавляют во все лунки 25 мкл антигенного эритроцитарного диагностикума, встряхивают и оставляют при комнатной температуре на 2 ч до оседания эритроцитов. Реакцию сопровождают контролем диагностикума.

*Учет и оценка результатов РТПГА* проводится по феномену гемагглютинации аналогично учету в РПГА. Если активность материала в РТПГА отсутствует или снижается на несколько лунок по сравнению с активностью того же материала в РПГА, то «+» результат РПГА признается специфическим.

**Реакция нейтрализации АТ (РНАт) на обнаружение АГ.**

В лунки верхнего ряда планшета вливают по 25 мкл разводящей жидкости. В первую лунку вносят 25 мкл исследуемого материала (АГ) и титруют по 25 мкл до предпоследней лунки, из которой 25 мкл жидкости удаляют в дезраствор. Последняя лунка – контроль диагностикума. Во все лунки добавляют по 25 мкл специфической сыворотки активностью 2 СЕ. Планшет выдерживают 30 мин при 37°C и добавляют во все



лунки по 25 мкл антигенного эритроцитарного диагностикума, встряхивают и оставляют при комнатной температуре на 2 ч до оседания эритроцитов. Реакцию сопровождают контролем эритроцитарного диагностикума (25 мкл разводящей жидкости + 25 мкл специфической сыворотки (2 СЕ) и 25 мкл антигенного эритроцитарного диагностикума).

Если в исследуемом материале содержится АГ, то он нейтрализует 2 СЕ сыворотки, и последняя не сможет агглютинировать антигенный диагностикум (пуговка). В противном случае АГ сыворотки останутся свободными и в результате сенсibilизированные АГ эритроциты окажутся агглютинированными (зонтик). Под титром материала в РНАТ принимают крайнее разведение исследуемого АГ, при котором полностью отсутствует агглютинация эритроцитов (пуговка).

#### **Реакция нейтрализации АГ (РНАг) на обнаружение АТ**

В лунки верхнего ряда планшета вливают по 25 мкл разводящей жидкости. В первую лунку вносят 25 мкл исследуемого материала (АТ) и титруют по 25 мкл до предпоследней лунки, из которой 25 мкл жидкости удаляют в дез. раствор. Последняя лунка – контроль диагностикума. Во все лунки добавляют по 25 мкл раствора АГ в количестве 2 АЕ. Планшет выдерживают 30 мин при 37°С и добавляют во все лунки по 25 мкл антительного эритроцитарного диагностикума, встряхивают и оставляют при комнатной температуре на 2 ч до оседания эритроцитов. Реакцию сопровождают контролем эритроцитарного диагностикума (25 мкл разводящей жидкости + 25 мкл раствора АГ (2 АЕ) и 25 мкл антительного эритроцитарного диагностикума).

Если в исследуемом материале содержатся АТ, то они нейтрализуют 2 АЕ антигена, и последний не сможет

агглютинировать антительный диагностикум (пуговка). В противном случае АГ останется свободным и в результате сенсибилизированные АТ эритроциты окажутся агглютинированными (зонтик). Под титром материала в РНАт принимают крайнее разведение исследуемого материала (АТ), при котором полностью отсутствует агглютинация эритроцитов (пуговка).

#### Реакция преципитации и ее варианты

Преципитацией называют процесс, когда происходит агрегация АТ с растворимыми АГ; если АГ представлен корпускулами, специфическая агрегация таких АГ описывается как агглютинация. Появление преципитата при реакции АГ+АТ определяется не только возникновением решетки, образуемой ее участниками, но и особой ролью Fc-фрагмента иммуноглобулина, изменение конформации которого приводит к утрате этим комплексом растворимости в солевых растворах. В связи с этим в реакции преципитации используют неразведенную или слабо разведенную сыворотку. Для постановки реакции преципитации необходимы: АТ - испытуемая сыворотка больного или иммунная диагностическая сыворотка (при идентификации выделенных микробов); АГ; физиологический раствор как источник электролитов.

Существует множество модификаций этой реакции, которые подразделяют на две группы: преципитация в жидкой среде (реакция флоккуляции и реакция кольцепреципитации) и преципитация в геле. **Реакция флоккуляции** представляет собой преципитацию, при которой растворы АГ и АТ смешивают в пробирке. Учет реакции производят с помощью измерения мутности получаемой системы на фотоэлектроколориметре, что позволяет определить концентрацию исследуемого АГ.

Для постановки **реакции кольцепреципитации** в тонкие преципитационные пробирки наливают сначала неразведенную преципитирующую сыворотку и сверху на нее наслаивают, не допуская перемешивания, раствор АГ. В случае гомологичности АТ и АГ на границе между этими растворами в течение 3-10 мин появляется кольцо преципитата. В отличие от реакции агглютинации, титр преципитирующей сыворотки определяют с помощью разведения не сыворотки, а АГ.

**Реакция преципитации в геле** является одним из наиболее эффективных методов анализа. Явление иммунопреципитации в геле широко используется в целом ряде важных методик, применяющихся для изучения АТ, а также для обнаружения и количественного определения растворимых АГ. Иммунопреципитация основана на очень простом принципе. В толще геля существует водная фаза, через которую легко диффундирует большинство макромолекул. Когда сложный АГ перемещается в область, содержащую АТ, то при оптимальном соотношении концентраций взаимодействующих компонентов образуются видимые линии преципитации. Реакцию обычно проводят в расположенных горизонтально тонких слоях агарового геля на стеклянных подложках.

В 1948 г. Е. Оухтерлони разработал простой и удобный метод встречной двумерной диффузии в геле, позволяющий проводить прямое сравнение различных АГ и сывороток. Для реакций иммунодиффузии АГ и АТ вносят в лунки, вырезанные в геле напротив друг друга. Известны различные модификации метода иммунодиффузии: иммунодиффузия АГ в агаровом геле, содержащем АТ (или наоборот), приводящая к образованию колец преципитации, их диаметр пропорционален концентрации АГ (АТ); **иммуноэлек-**

**трофорез** - метод, объединяющий электрофоретическое разделение смеси АГ и встречную диффузию по Оухтерлони на одной и той же пластинке агарового геля. Преципитирующую сыворотку при этом наливают в канавку, вырезанную в геле параллельно направлению электрофоретического разделения. Образующиеся в результате реакции линии преципитации имеют вид дуг, вытянутых в направлении электрофоретического движения фракций АГ. Иммуноэлектрофорез позволяет определять состав сложных смесей растворимых АГ, содержащих до 30 компонентов, и является ценным диагностическим методом.

#### **Двойная радиальная иммунодиффузия по Оухтерлони**

В слое агарового геля равномерной толщины на определенном расстоянии друг от друга вырезают лунки для АГ и антисыворотки и заполняют их соответствующими растворами. АГ и АТ диффундируют в гель, соединяются друг с другом и образуют иммунные комплексы, которые преципитируют в гранулах геля, становясь видимыми как линии преципитации. Двойную радиальную иммунодиффузию применяют главным образом для качественного анализа, например для определения числа АГ в различных жидкостях (в сыворотке крови, цереброспинальной жидкости), для оценки чистоты препаратов при выделении АГ, для сравнения известных АГ и АТ с неизвестными, а также с целью наблюдения за ходом иммунизации животных.

Готовят последовательные двукратные разведения антисыворотки и равные объемы каждого из них вносят в лунки, расположенные по периферии. Центральную лунку заполняют раствором АГ. При оценке результатов иммунодиффузии учитывают: расстояние,

отделяющее линию преципитации от центральной и периферической лунок; интенсивность и ширину полос преципитации; последнее разведение антисыворотки, при котором еще можно видеть преципитат.

*Оценка результатов:* При оптимальном соотношении между АГ и АТ линия преципитации располагается почти посередине между лунками. Количественное преобладание одного из реагентов сдвигает линию преципитации к лунке другого реагента. АГ и АТ образуют видимые преципитаты при концентрациях белка от 5 до 50 мкг/мл.

*Сравнительный анализ.* Для сравнения АГ обычно в геле вырезают три лунки, расположенные треугольником. В две из них помещают сравниваемые растворы АГ, а в третью - антисыворотку. Принципиально возможны три варианта расположения линий преципитации:

1. Обе линии полностью сливаются. Это говорит об *идентичности антигенов* в обеих лунках.

2. Одна из линий длиннее другой и, выходя из последней, образует так называемую шпору. Шпора часто бывает тоньше, чем основные линии преципитации. Вторая линия сливается с линией, образовавшей шпору. В данном случае это свидетельствует о *частичной идентичности антигенов*. Оба АГ имеют некоторые общие детерминанты, которые, соединяясь с АТ, дают сливающиеся линии преципитации. Однако у первого АГ имеются еще и детерминанты, которых нет у второго.

3. Линии пересекаются, либо не сливаются и не пересекаются. Это указывает на *неидентичность антигенных детерминант* и, следовательно, на различие молекул исследуемых АГ.

**Простая радиальная иммунодиффузия по Манчи-**

**ни:** используют в основном для количественного определения АГ. Чаще всего исследуют белковые АГ: белки сыворотки крови, цереброспинальной жидкости, секретов желез, экстрактов из органов и т.д. Метод получил широкое распространение в клинических биохимических лабораториях. На ровную поверхность равномерным слоем наносят гель, содержащий АТ. В геле вырезают лунки и заполняют их раствором АГ. Молекулы АГ радиально диффундируют из лунки и, встретившись с АТ, образуют кольцо преципитации. До тех пор пока в лунке сохраняется избыток АГ, диаметр кольца преципитации постепенно увеличивается. Оценку результатов проводят путем измерения колец преципитации на влажных и окрашенных препаратах с помощью окулярного микрометра, который прикладывают к обратной стороне стекла.

*Сушка и хранение препаратов:* для длительного хранения препараты высушивают. До этого их отмывают от непрореагировавших компонентов в физиологическом растворе, инкубируя 2 -3 сут при 3 - 5 его сменах. *Окрашивание препаратов:* препараты окрашивают красителями, выявляющими белок. Чаще всего применяют амидо-черный, кумасси ярко голубой, бромфеноловый синий и др. Для этого стекла с отмытым и высушенным гелем помещают на 1 - 5 мин в краситель и держат до тех пор, пока окрашенный преципитат не будет отчетливо виден на фоне окружающего геля. В качестве обесцвечивающего раствора используют растворитель самой краски.

**Иммуноэлектрофорез (ИЭФ).** Принцип ИЭФ - вначале проводят электрофоретическое разделение смеси белков в забуференном агаровом геле. Затем в канавку, которая идет в направлении миграции белков, вносят преципитирующую иммунную сыворотку.

АГ и антисыворотка диффундируют в геле навстречу друг другу, и в месте их взаимодействия возникают дуги (линии) преципитации. Число, положение и форма этих линий дают представление о составе исходной смеси антигенов. ИЭФ - один из широко распространенных методов качественного анализа АГ. В клинике ИЭ чаще всего используют при диагностике иммунодефицитных состояний. Он незаменим как метод последовательного наблюдения за процессом очистки белковых препаратов.

*Приготовление гелей:* гель готовят так же, как для иммунодиффузии, за исключением того, что вместо ФР используют подходящий буферный раствор, чаще всего - барбиталовый или боратный буфер рН от 6,0 – 9,0.

**Ракетный иммуноэлектрофорез:** гель агарозы смешивают с моноспецифической антисывороткой и равномерным слоем распределяют по поверхности стекла. В полученном геле вырезают лунки и заполняют их исследуемым АГ. В электрическом поле молекулы АГ мигрируют в гель и взаимодействуют с АТ. По мере продвижения молекулы АГ постепенно связываются АТ, образуя вытянутый в длину остrokонечный преципитат. В стандартных условиях (концентрация геля, толщина его слоя, содержание в нем антисыворотки, напряжение и сила тока) длина такого преципитата прямо пропорциональна концентрации АГ. Впервые был предложен К. Лореллом в 1966 г., обычно используется для количественного определения белка в жидкостях организма. Его существенным преимуществом по сравнению с иммунодиффузией по Манчини является быстрота получения результатов.

**Перекрестный иммуноэлектрофорез:** на первом этапе проводят электрофоретическое разделение смеси белков (например, сыворотки) в геле агарозы. Затем



разделенные белки вновь подвергают электрофорезу в направлении, перпендикулярном первому этапу. При этом гель содержит АГ, образующие с исследуемыми белками преципитаты в форме пиков. Высота или площадь этих пиков прямо пропорциональна концентрации соответствующих АГ в исследуемой смеси. Площадь пиков зависит также от концентрации антител в геле.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ**

### **Преципитационные методы**

#### **Основные рекомендации при постановке реакции иммунодиффузии в геле (РИД):**

*Приготовление гелей:* чаще всего в качестве гелеобразующих агентов применяют агар или агарозу. Разнообразные фирменные типы агаров сильно различаются по степени чистоты. Некоторые марки агаров могут быть использованы без очистки, такие, как Difco Vacto Agar, Difco Special Agar, Oxoid Ion Agar, Behringwerke Rein Agar, Litex, Pharmacia. Готовить агар желательно только для одного эксперимента или, в крайнем случае, для нескольких опытов, поскольку многократное разогревание перед каждым опытом приводит к испарению жидкости и изменению концентрации и, следовательно, физико-химических свойств агара. Отвешивают определенное количество агара, переносят его в колбочку и добавляют необходимый объем ФР или буфера. Колбочку со смесью ставят в кипящую водяную баню до полного растворения агара. Затем в раствор добавляют один из консервантов для предотвращения роста микроорганизмов: 0,01-0,05%-й азид натрия ( $\text{NaN}_3$ ), 0,1-0,12%-й мертиолат натрия или 0,1%-й фенол. Необходимо следить за тем, чтобы агар был не только стерильным, но и максимально прозрачным. Он не должен содержать



посторонних механических примесей, особенно ворсинок от марли или ваты. Для улучшения формирования иммунопреципитатов иногда добавляют 2-4%-й полиэтиленгликоль или декстраны. *Подготовка стекол и заливка агара:* иммунодиффузию проводят на стеклах, чаще всего предметных, или фотопластиках. Обезжиренные стекла желательно покрыть тонким слоем 1%-го водного агара и высушить при комнатной температуре или при 70°C. К таким стеклам хорошо прилегает гель. Для получения одинаковой толщины агара стекла помещают на строго горизонтальную поверхность. Залитые агаром стекла помещают во влажную камеру, например, в эксикатор, на дно которого наливают воду с антисептиком. Стекла можно поместить в эксикатор во влажной чашке Петри. *Приготовление лунок:* для просечения лунок в агаре применяют стандартные штампы, состоящие из трубок-пробойников. В зависимости от поставленной задачи используют штампы, содержащие 4, 5 или 7 трубок-пробойников. Наружные диаметры трубок могут варьировать от 3 до 5 мм. Для постановки иммунодиффузии по Манчини используют отдельные трубки-пробойники или инъекционные иглы со сточенным концом. В этом случае под стекло с агаром кладут трафарет и пробойником просекают контуры лунок. Агаровые пробки отсасывают с помощью вакуумного насоса. *Температура:* результаты иммунодиффузии существенно не зависят от температуры. Опыт может быть поставлен при 4, 20 или 37°C. Удобнее всего работать при комнатной температуре. Следует лишь избегать резких колебаний температуры в ходе инкубации. *Электролиты:* в качестве электролитов используют 0,15 М NaCl либо фосфатный или барбиталовый буфер. *Постановка опыта:*

для того чтобы избежать подсыхания агара, опыт на одном стекле должен быть поставлен в максимально короткие сроки (10-15 мин). В лунки в зависимости от их диаметра вмещается от 2 до 40 мкл раствора реагента. При заполнении лунок доверху жидкость не должна переливаться через край. Сразу же после заполнения лунок реагентами стекло помещают в эксикатор. Иммунодиффузия может продолжаться от 2 до 7 сут в зависимости от задачи.

### **Реакция кольцепреципитации РКП (Асколи, 1906)**

Поочередное наслаивание друг на друга прозрачных растворов АГ и АТ сопровождается взаимодействием реагентов на границе их соприкосновения и постепенном образовании серовато-мутного преципитата в виде плавающего диска. РКП применяется при серодиагностике сибиреязвенного АГ в животном сырье, индикации патогенных микроорганизмов и в судебно-медицинской практике.

*Техника постановки реакции:* в чистые прозрачные преципитационные пробирки вносят 0,3 мл реагента с большим удельным весом (как правило, это преципитирующая сыворотка) и осторожно по внутренней стенке пробирки наслаивают пастеровской пипеткой с тонко оттянутым капилляром реагент с меньшим удельным весом, т. е. АГ, который используют в различных разведениях. В момент наслаивания пробирку с сывороткой фиксируют в наклонном положении (под углом примерно 45°). После наслаивания АГ пипетку неспеша извлекают, не отрывая от стенки пробирки. Пробирку переводят в вертикальное положение. К каждому опыту ставится ряд контролей (табл. 3).

Таблица 3

Схема постановки РКП по Асколи

Ингредиенты, мл	Опыт	Контроли		
		1	2	3
Специфическая преципитирующая сыворотка	0,3	0,3	0,3	—
Нормальная сыворотка (того же вида животного или человека)	—	—	—	0,3
Исследуемый экстракт	0,3	—	—	0,3
Специфический стандартный экстракт	—	0,3	—	—
Физиологический раствор	—	—	0,3	—
Результат	+	+	-	-

*Учет и оценка результатов реакции.* реакцию учитывают через 10-15 мин по феномену образования диска преципитата на границе двух сред. Реакция считается достоверной, если 1-й контроль положительный, а 2-й и 3-й - отрицательные.

### **Реакция иммунодиффузии в геле**

Принцип: диффузия растворов АГ и АТ, залитых в противостоящие лунки агарового геля, в случае их соответствия приводит к образованию в месте встречи линий преципитации.

*Техника постановки реакции:* реакцию проводят на чистых, обезжиренных предметных стеклах или стеклах от фотопластинок (9x12 см), либо в маленьких пластиковых чашках Петри на которые наносят подогретой пипеткой слой в 1,5 -2,0 мм 1%-ного осветленного агара, подогретого до 70°C. Стекла и чашки Петри размещают на горизонтальном столике с уровнем для формирования на них слоя геля равной толщины. Специальным пробойником в агаре вырезают лунки. В штампах «пятерка» и «семерка» одна из трубок является центральной, а остальные расположены по окружности на равном расстоянии друг от друга. Наружный диаметр трубок составляет 3-5 мм, а расстояние между центральной и периферическими трубками - от 5 до 10 мм. Из просеченных лунок агар осторож-

но извлекают, отсасывая его металлической трубкой, соединенной через шланг с вакуумным насосом. Для герметизации дна лунок пастеровской пипеткой с тонко оттянутым концом осторожно вносят на доннышко по 1 микрокапле горячего агара и сразу удаляют его. Растворы АГ и АТ при помощи автоматических микропипеток заливают в соответствующие лунки, не переливая жидкость через края и не касаясь их. Стекла помещают во влажную камеру, либо на крышку чашки Петри наклеивают смоченную водой фильтровальную бумагу. Реакцию проводят при 37°C в течение 4-16 ч либо при комнатной температуре – 24-48 ч.

*Учет и оценка результатов реакции.* Через 24-48-72 ч учитывают количество и расположение полос преципитации в агаровом геле в проходящем и падающем свете, а также при косом освещении на темном фоне с помощью лупы.

### **Встречный иммуноэлектрофорез (ВИЭФ)**

Принцип. При встречном электрофорезе образование иммунных преципитатов в поддерживающей среде происходит в результате миграции АГ и АТ навстречу друг другу под действием электрического поля. Молекулы различных белков обладают различным зарядом и поэтому движутся при электрофорезе в щелочном буфере не только с разной скоростью, но и в разных направлениях - одни к аноду, другие к катоду.

*Приготовление геля.* Расплавляют 1 г агара или агарозы в 100 мл буфера на кипящей водяной бане. В качестве консерванта используют 2 мл 0,1% раствора мертиолата натрия. Горячий прозрачный раствор можно разлить на порции однократного потребления (по 20, 50 или 100 мл) и хранить при 4°C в течение нескольких месяцев.

*Техника проведения ВИЭФ.* На подогретую обезжиренную стеклянную пластинку наносят несколько миллилитров раствора агарозы и осторожно проводят кромкой другой пластинки, наклоненной под углом  $45^\circ$ . Струей горячего воздуха из фена гель высушивают в тонкую пленку. Затем на стекло, помещенное в кювету на горизонтальном столике с уровнем, выливают приготовленный гель из расчета 0,15-0,2 мл на  $1 \text{ см}^2$  и дают ему застыть. С помощью пробойника и трафарета в геле вырезают лунки диаметром 2-5 мм, располагая их попарно на расстоянии друг от друга от 2-4 мм до 5-8 мм. Расстояние от краев пластинки должно быть не менее 1,5 см. Гелевые цилиндры удаляют с помощью водоструйного насоса. При использовании пластинок без агаровой пленки производят герметизацию доньшка лунки, внося в них микрокаплю горячего агара ( $70-90^\circ\text{C}$ ) и сразу его удаляя. В лунки с катодной стороны вносят по 0,01 мл АГ, а с анодной - такой же объем сыворотки (АТ). Опыт обязательно сопровождают отрицательным (ФР или гетерологичный АГ) и положительным (АГ стандартный) контролями. Оба отделения камеры для электрофореза заполняют буфером. Пластины с гелем укладывают в соответствии с расположением полюсов и замыкают электрическую цепь полосками бумаги, смоченными буферным раствором. Включают охлаждение и ток и ведут ВИЭФ при напряжении  $10 \text{ В/см}^2$  в течение 45 - 60 мин.

*Учет и оценка результатов.* Просмотр и изучение линий преципитации проводят в проходящем и падающем свете, а также при косом освещении на темном фоне с помощью лупы. От непреципитирующих белков гель отмывают путем погружения стекол 2-3 раза на 12 ч в ванночку с 0,15 М раствором NaCl. Затем поверхность геля накрывают фильтровальной бумагой,

смоченной в дистиллированной воде, и высушивают при комнатной температуре. Оценку осуществляют путем сравнительного изучения опытных и контрольных полос преципитации.

### **5.1.5. Методы иммунофлуоресценции**

В 1950 г. Кунс и Каплан продемонстрировали возможность ковалентного связывания флуоресцентных красителей с АГ без утраты последними способности реагировать с АГ. В результате был разработан метод, сочетающий чувствительность и специфичность иммунологических реакций с топографической точностью микроскопии. Специальное оборудование позволяет визуально регистрировать свет, испускаемый ничтожным количеством флуорохрома. Флуоресцентные метки пригодны для методики двойного окрашивания, т.е. обработки образца двумя препаратами, различающимися по специфичности и метке АГ, которые окрашивают области локализации соответствующих АГ в разные цвета. Первая работа, включившая ИФ в арсенал лабораторных методов, была выполнена с применением конъюгатов, меченых флуоресцеином. Флуоресцеин и сейчас остается наиболее распространенным флуорохромом. Максимум светопоглощения конъюгатов, меченных флуоресцеином, регистрируется при 495 нм. Для них характерна интенсивная флуоресценция изумрудно-зеленого цвета, не свойственная аутофлуоресценции большинства тканей млекопитающих и с высокой чувствительностью воспринимаемая сетчаткой глаза. Для конъюгации с белками обычно применяют флуоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ), изомер 1. Он легко присоединяется к белкам, образуя стабильные конъюгаты с заданным содержанием метки. Основной альтернативой флуоресцеину может слу-

жить родамин. Конъюгаты, меченные этим красителем, имеют максимум светопоглощения при 555 нм, а их оранжевая флуоресценция хорошо контрастирует с флуоресцеином. Поэтому родамин применяют главным образом в качестве второй метки при двойной иммунофлуоресценции. Флуорохром используют обычно в виде тетраметилродаминизотиоцианата. Еще один флуорохром с оранжево-красной флуоресценцией - это тexasский красный. Максимум светопоглощения этого красителя (596 нм) в еще большей степени, чем у родамина, контрастирует с соответствующим значением флуоресцеина.

Флуоресцентные реагенты готовят из обладающих достаточной активностью и специфичностью препаратов АТ или АГ, которые конъюгируют с оптимальным количеством флуорохрома. Методически процедура конъюгации одноэтапна, предполагает инкубирование в течение определенного времени иммунного реагента с красителем и последующее промыванием полученного препарата от не связавшегося красителя. При наличии подходящих иммунных реагентов можно самостоятельно приготовить конъюгат, не уступающий по качеству коммерческим образцам. Свободный флуорохром может вызвать неспецифическое окрашивание и дает высокий уровень фоновой флуоресценции даже при незначительной (5 мкг/мл) концентрации свободного ФИТЦ. Кроме того, при длительном хранении конъюгаты могут диссоциировать на иммунный реагент и свободный краситель, что усиливает неспецифическое окрашивание. Это особенно свойственно конъюгатам с родаминовой меткой, этому во всех подозрительных случаях диагностикум проверяют на присутствие свободного красителя с помощью хроматографической методики (гель-фильтрация). Лучший



метод удаления свободного красителя из препаратов конъюгата - гель-фильтрация на сефадексах G25 и G50. Пик меченого белка выходит в свободном объеме.

Мерой активности иммунофлуоресцентного препарата служит то максимальное его разведение, при котором еще сохраняется способность к специфическому окрашиванию. Это свойство важно не только с точки зрения экономии препарата, но и потому, что оптимальной эффективности окрашивания можно достигнуть лишь с высокими разведениями конъюгата, при которых соотношение между интенсивностью сигнала и фона достаточно велико. При невысоких разведениях конъюгата регистрируется сильная неспецифическая флуоресценция.

Различают прямую и непрямую иммунофлуоресценцию. В основе прямой иммунофлуоресценции лежит серологическая реакция между искомым АГ и видоспецифическим флуоресцирующим иммуноглобулином.

Образующийся в результате комплекс АГ - флуоресцирующее АГ приобретает способность светиться в УФ-лучах. С помощью МФА можно в течение 1-2 ч обнаружить наличие возбудителей инфекционных заболеваний в исследуемой пробе. Чувствительность метода  $5 \cdot 10^4 - 10^5$  м.к./мл. Непрямая иммунофлуоресценция основана на применении антиглобулиновых конъюгатов, которые позволяют обнаружить участки связывания предварительно нанесенных немеченых антител.

Преимуществом непрямого МФА является то, что при его использовании отпадает необходимость иметь большой набор различных специфических флуоресцирующих АГ. В качестве антиглобулиновых АГ обычно используют сыворотку козы или барана, иммунизированных сывороткой кролика, морской свинки, мыши



и т.д. Непрямой МФА применяют не только для ускоренного обнаружения возбудителя (АГ), но и для обнаружения АТ в сыворотке больного.

Одна из наиболее важных особенностей МФА состоит в возможности одновременной идентификации двух разных АГ даже при их локализации в одной и той же области (двойная иммунофлуоресценция). В наиболее простом варианте для этого служит прямая иммунофлуоресценция с двумя различными по специфичности конъюгатами, один из которых содержит флуоресцеин, другой – родамин.

Оптимальные условия распознавания АГ в МФА определяются двумя факторами, зависящими от свойств конъюгата: интенсивностью специфической флуоресценции и ее контрастом с фоновым уровнем. Важно отметить, что нежелательная (фоновая) флуоресценция может быть связана, во-первых, с истинным неспецифическим окрашиванием, обусловленным электростатическими взаимодействиями, и, во-вторых, с нежелательным, но специфическим окрашиванием, обусловленным перекрестной реактивностью меченых АТ к другим тканевым АГ. Оба вида нежелательной флуоресценции нужно свести к минимуму без заметного снижения уровня специфической реакции. Это достигается путем одновременной окраски мазков флуоресцирующими конъюгатами в сочетании с контрастирующим сывороточным альбумином, обеспечивающим отличное по цвету свечение фона (посторонних примесей, клеточных элементов, гетерологичных микробов и т.п.). Перспективным для снижения неспецифической флуоресценции в препаратах является и метод окраски мазков Fab-фрагментами флуоресцирующих иммуноглобулинов без применения контрастирующих альбуминов.

Для индикации ПБА в исследуемых пробах в качестве основного следует применять прямой метод флуоресцирующих АТ. Непрямые модификации более трудоемки и требуют большей затраты времени. Их используют либо для выявления и титрования АТ в сыворотках крови людей и животных, либо для идентификации чистых культур возбудителей.

**Прямой МФА для специфической индикации ПБА:** для специфической индикации ПБА применяют прямой МФА в сочетании с контрастированием неспецифического свечения. С этой целью для окраски мазков используют смесь, состоящую из равных объемов специфических флуоресцирующих АТ, меченных флуоресцеин-5-изотиоцианатом (излучающим зеленый цвет), и контрастирующего альбумина нормальной сыворотки (лошадиной, бычьей, кроличьей), конъюгированного с родаминовым красителем (обладающим оранжевой люминесценцией). При окраске препаратов такой смесью специфический флуоресцирующий Ig сообщает зеленое свечение только гомологичному АГ, тогда как остальные компоненты препарата (тканевые элементы, гетерологичные микроорганизмы и их АГ, прочие примеси) приобретают способность светиться оранжево-красным цветом благодаря неспецифической физико-химической сорбции меченого альбумина.

**Непрямой МФА (НМФА):** в основе иммунофлуоресцентной серодиагностики (выявления и титрования специфических АТ в сыворотках крови) лежит применение непрямого метода флуоресцирующих антител как в модификации иммунофлуоресцентной окраски видовых сывороточных глобулинов, так и окраски комплемента морских свинок. При этом искомым в комплексе АГ + АТ + флуоресцирующий антисыворо-

точный иммуноглобулин или АГ + АТ + комплемент + флуоресцирующий антикомплемментарный глобулин являются АТ исследуемых сывороток людей или животных. Обработка мазков, содержащих заведомо известные микроорганизмы (диагностикумы), нисходящими разведениями исследуемых сывороток позволяет не только выявить специфические АТ, но и определить их титр.

При идентификации с помощью НМФА выделенных микроорганизмов используют наборы заведомо известных нефлуоресцирующих иммунных сывороток (иммуноглобулинов), которые берут для обработки мазков в различных (в зависимости от их активности) разведениях. Искомыми в этом случае оказываются АГ бактерий, риккетсий, хламидий или вирусов, содержащиеся в мазке и подлежащие идентификации.

*Идентификация микроорганизмов с помощью НМФА.* Для идентификации микроорганизмов с помощью НМФА необходимо располагать набором нефлуоресцирующих иммунных сывороток, специфичных в отношении различных бактерий, риккетсий или вирусов. Эти сыворотки используются на первом этапе обработки мазков, приготовленных из взвесей подлежащих идентификации микроорганизмов (клеточных культур, инфицированных вирусом). На втором этапе обработанные специфической сывороткой препараты докрашиваются антивидовым флуоресцирующим иммуноглобулином, гомологичным в отношении белков сыворотки, использованной на первом этапе (например, при обработке мазков на первом этапе специфической нефлуоресцирующей кроличьей сывороткой для второго этапа используют люминесцирующий иммуноглобулин к сывороточным глобулинам кролика). Техника люминесцентной микроскопии препа-

ратов, окрашенных НМФА, аналогична применяемой при прямом варианте МФА.

Раньше неизбежное «выцветание» флуоресцентной метки при микроскопии было для МФА неотъемлемой и неразрешимой проблемой. Оно уменьшало популярность данного метода и способствовало более широкому применению других, нефлуоресцентных индикаторных систем для иммуноспецифического определения локализации антигенов. Позднее было описано применение парафенилендиамина, который значительно замедлял выцветание флуоресцентной метки, но был подвержен быстрому окислению на свету. Кроме того, он активно сенсибилизировал кожу. Более подходящий реагент - 1,4-дiazобисциклооктан (ДАБЦО). Он менее активно замедляет выцветание флуоресцентной метки, но более стабилен, дешевле, не сенсибилизирует кожу, не диссоциирует на ионы и может храниться без дополнительной защиты.

*Микроскопия.* Для получения правильных результатов МФА необходимо до начала исследования тщательно сцентрировать всю осветительную систему микроскопа и подобрать опытным путем оптимальную комбинацию первичных и запирающих светофильтров. При использовании флуоресцирующих Ig, меченных ФИТЦ, чаще всего применяют возбуждающие светофильтры СС-4, СС-8 или СЗС-7 в комбинации с запирающим светофильтром типа ЖС-18. Просмотр мазков под микроскопом рекомендуется проводить в отраженных лучах, падающих на мазок через объектив. При иммунофлуоресцентном исследовании препаратов используют иммерсионные системы. При этом для выявления бактерий, риккетсий, грибов применяют масляную иммерсию (нефлуоресцирующее иммерсионное масло или диметилфталат).

Для выявления вирусов в препаратах из клеточных культур или в мазках-отпечатках органов животных целесообразно использовать вводно-иммерсионные системы). Специальное нефлуоресцирующее масло (в случае его отсутствия – диметилфталат или триглицериновую смесь) наносят перед микроскопией на мазок. При использовании водно-иммерсионной системы на окрашенные препараты предварительно наносят трис-глицериновую смесь, затем препарат накрывают покровным стеклом, на которое сверху наносят каплю дистиллированной воды. При просмотре таких мазков объектив микроскопа погружают в каплю воды. При микроскопии окрашенных препаратов обычно используют окуляры 7<sup>x</sup> или 5<sup>x</sup>.

Для получения достоверных результатов исследования рекомендуется рассматривать под микроскопом не менее 20-25 полей зрения в каждом мазке (если морфологически типичные возбудители встречаются почти в каждом поле зрения, можно ограничиться просмотром меньшего числа полей зрения). В мазках, приготовленных из жидкой фазы пробы, особое внимание следует обращать на края капли (мазка), где чаще концентрируются клетки возбудителя.

#### *Учет и оценка результатов.*

При оценке результатов учитывают специфичность свечения и морфологию микроорганизмов. Специфически люминесцирующие микроорганизмы должны обладать характерной морфологией, иметь увеличенные размеры (по сравнению с их размерами в световом микроскопе) и более яркое свечение периферической части клетки. Неспецифическая флуоресценция характеризуется равномерным свечением всего тела клетки. Морфологические и структурные особенности микроорганизмов позволяют отчетливо дифференцировать

их от бесструктурных люминесцирующих конгломератов, которые могут наблюдаться в препаратах.

Результаты МФА считаются положительными, если в мазке обнаруживаются хотя бы единичные (для мелких бактерий и риккетсий не менее 10 особей) морфологически типичные микроорганизмы либо пораженные вирусом (или риккетсиями) тканевые клетки (не менее 3-5 в препарате), специфически флуоресцирующие на 3-4 креста, при отрицательных контролях.

*Контрольные исследования при постановке МФА.* При исследовании любого неизвестного материала основным контролем специфичности являются все остальные мазки (препараты) данной пробы, которые оказались окрашенными гетерологичными по отношению к выявленному в пробе агенту флуоресцирующими иммуноглобулинами. Наряду с этим, МФА должен сопровождаться микроскопией препаратов, приготовленных из не содержащих микроорганизмы материалов (незараженные клеточные культуры, отпечатки органов здоровых животных) и окрашенных теми же специфическими люм. препаратами. Специфическая зеленая флуоресценция во всех контрольных мазках должна отсутствовать.

В заключение следует отметить, что методы, основанные на иммунофлуоресценции, не могут быть полностью стандартизованы. Многие детали методики, определяющие чувствительность, весьма переменчивы. Они включают, наряду с другими, свойства выбранного субстрата, активность реагентов, уровень фоновой флуоресценции, возможности микроскопа и квалификацию исследователя.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ

### Метод флуоресцирующих антител

**Прямой МФА:** взаимодействие специфических АГ и АТ приводит к образованию комплекса АГ+АТ, выявляемого по флуоресцентной метке одного из компонентов в люминесцентном микроскопе.

*Техника постановки реакции.* На тщательно обезжиренное предметное стекло наносят каплю исследуемого материала и растирают бактериологической петлей для получения тонкого мазка. Из органов и тканей животных и секционного материала от людей делают, по возможности, тонкие мазки-отпечатки. Мазки подсушивают на воздухе и фиксируют 30 мин в этаноле, либо смеси Никифорова или охлажденном ацетоне. После фиксации препараты вновь подсушивают на воздухе.

Сухую люминесцирующую сыворотку растворяют в указанном на этикетке ампулы объеме дистиллированной воды. Непосредственно перед окраской препаратов люминесцирующую сыворотку разводят ЗФР до рабочего разведения (указано на этикетке ампулы), которое предварительно перепроверяют. Для этого микроскопируют мазки из эталонных культур микроорганизмов (диагностикумов), окрашенных люм. сывороткой, взятой в разных разведениях (обязательно на 1-2 разведения выше и ниже рабочего титра, указанного на этикетке). Максимальное разведение сыворотки, которое обеспечивает яркое (на 4+ и 3+) флуоресцентное окрашивание микробных клеток, называют ее красящим титром. В качестве рабочего разведения сыворотки, используемого для окрашивания исследуемых препаратов, применяют удвоенный красящий титр. Например, если красящий титр сыворотки оказался 1:32, то ее рабочее разведение будет 1:16.

На фиксированный мазок наносят 1-2 капли люминес-



цирующей сыворотки в рабочем разведении. Препарат помещают во влажную камеру (чашку Петри, кювету с крышкой с увлажненной фильтровальной бумагой, ватой) при 37°C на 30 мин или при комнатной температуре на 30-40 мин. Затем препарат промывают в 3 сменах ЗФР в течение 5-10 мин с последующим ополаскиванием в дистиллированной или проточной водопроводной воде в течение 1-2 мин. Препараты высушивают на воздухе в вертикальном положении, не применяя фильтровальную бумагу.

*Учет и оценка результатов.* Учет результатов проводят визуально на основе выявления морфологических особенностей и локализации возбудителя, а также оценки интенсивности и специфичности (структуры) его свечения. Оценка интенсивности специфической флуоресценции объекта проводят с учетом ее структурных особенностей по следующей шкале: ++++ - яркая сверкающая флуоресценция изумрудно-зеленого цвета, четко выявляются морфологические особенности микроорганизма, вокруг корпускулярных агентов может наблюдаться ярко светящийся ободок; +++ - яркая флуоресценция зеленого цвета, морфологические особенности микроорганизма выявляются достаточно отчетливо, нередко хорошо видны периферические ободки; ++ - слабая флуоресценция желтовато-зеленого цвета, морфологические особенности микроорганизмов выявляются еще достаточно четко, периферические ободки почти не видны; + - очень слабая флуоресценция неопределенного цвета, микроорганизмы различаются с трудом; - - флуоресценция объекта отсутствует.

Положительным результатом считается люминесценция клеток на 4+ и 3+ при наличии не менее 3-5 специфически светящихся клеток в препарате.



**Прямой МФА для специфической индикации ПБА:**  
*Приготовление мазков.* На тщательно обезжиренное предметное стекло наносят каплю исследуемого материала и растирают бактериологической петлей для получения тонкого мазка. Из органов и тканей делают тонкие мазки-отпечатки. Мазки подсушивают на воздухе и фиксируют в течение 30 мин. в 96 ° этаноле, смеси Никифорова или охлажденном ацетоне. После фиксации препараты вновь подсушивают на воздухе (не обжигают) и подвергают окрашиванию. Для спорообразующих видов микроорганизмов фиксатором служит 96° этанол с 10% формалина или с 3% перекиси водорода.

*Окраска препаратов флуоресцирующими Ig:* на фиксированные и высушенные мазки наносят пипеткой рабочую смесь специфического флуоресцирующего иммуноглобулина и контрастирующего альбумина так, чтобы вся площадь мазка была покрыта конъюгатом. Обработку мазков проводят во влажной камере при 37 °С в течение 30 мин. Затем конъюгат смывают ЗФР, мазки дважды промывают по 10 мин ЗФР, после чего ополаскивают дистиллированной водой и высушивают при комнатной температуре.

До начала работы флуоресцирующие иммуноглобулины и контрастирующий альбумин растворяют дистиллированной водой в объеме, указанном на этикетке ампулы. К использованию пригодны лишь те конъюгаты, которые легко и без осадка растворяются в течение 1-2 мин. Растворенные препараты могут затем храниться при 2-4 °С в течение 2-3 недель, будучи плотно закрытыми. Окраску мазков производят так называемой рабочей смесью конъюгатов, которую готовят также заблаговременно, но срок ее хранения при 2-4 °С не должен превышать семи дней.

Важнейшим условием правильного составления рабочей смеси конъюгатов является оптимальный подбор в ней соотношения флуоресцирующего Ig, меченого ФИТЦ, и альбумина, меченого родамином. Эти соотношения для каждой новой партии флуоресцирующих конъюгатов подбирают опытным путем, поскольку указанные на этикетке ампулы рабочие разведения являются ориентировочными. Титрование флуоресцирующих конъюгатов целесообразно проводить на контрольных мазках, содержащих гомологичные флуоресцирующим иммуноглобулинам микроорганизмы или их АГ.

*Определение красящего титра контрастирующего альбумина.* Из цельного раствора альбумина, меченого родамином, готовят ряд двукратных разведений в стерильном ЗФР рН 7,2 от 1:2 до 1:128, наносят на контрольные «грязные» мазки (с посторонней микрофлорой) и инкубируют во влажной камере при 37 °С в течение 30 мин. Затем мазки промывают дважды по 10 мин ЗФР, ополаскивают дист. водой, подсушивают на воздухе и микроскопируют. В полевых условиях вместо ЗФР мазки можно промывать проточной водой, а затем ополаскивать дистиллированной водой. Последнее разведение контрастирующего альбумина, дающее оранжево-красное свечение микробных клеток в мазке на 1-2 креста, принимают за красящий титр. Соответственно рабочее разведение меченого альбумина будет в 2 раза выше красящего титра (табл. 4).

Таблица 4

Пример титрования флуоресцирующего альбумина

Препараты	Интенсивность свечения клеток в мазках при разведении альбумина						Красящий титр	Рабочее разведение
	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128		

Мазок-отпечаток с тампона (смыв)	+++	+++	+++	+++	++	-	1:64	1:32
Мазок-отпечаток селезенки мыши	+++	+++	+++	++	-	-	1:32	1:16
Перевиваемые клетки амниона человека	+++	+++	+++	++	+	-	1:64	1:32

Условные обозначения:

+++ - отчетливо выраженное оранжево-красное или красно-бурое свечение

++ - красное свечение различных оттенков

+ - серо-желтое (бурое) свечение

-- свечение отсутствует или видна аутолюминесценция

*Определение красящего титра специфических флуоресцирующих Ig в смеси с контрастирующим альбумином, меченым родамином.* Двукратные разведения испытуемого конъюгата специфических флуоресцирующих Ig смешивают с двойным рабочим разведением контрастирующего альбумина и окрашивают контрольные мазки, приготовленные из взвеси гомологичных микроорганизмов, как сказано выше. Последнее разведение, обеспечивающее яркое зеленое изумрудное специфическое свечение микробов на 3-4+ на оранжево-красном фоне препарата, является красящим титром испытуемого специфического Ig. Для дальнейшей работы смешивают в равных объемах удвоенные рабочие разведения альбумина и специфического флуоресцирующего Ig (табл. 5).

Таблица 5

Пример титрования флуоресцирующего иммуноглобулина в присутствии альбумина

Препараты	Характер флуоресценции	Интенсивность свечения при различных разведениях специфического конъюгата в смеси с альбумином, взятым в рабочем разведении 1:16					Красящий титр флуоресцирующего иммуноглобулина	Рабочее разведение иммуноглобулина в смеси с альбумином
		1:4	1:8	1:16	1:32	1:64		
Мазок из смыва	Специфическая зеленая	++	++++		+++	+	1:32	1:16
	Неспецифическая красная	+	++	++	++	++		
Мазок-отпечаток селезенки мыши	Специфическая зеленая	++++	++++	++++	+++	++	1:32	1:16
	Неспецифическая красная	+	++	++	++	++		
Монослой перевиваемых клеток амниона человека	Специфическая зеленая	++++	++++	++++	+++	+	1:32	1:16
	Неспецифическая красная	-	+	++	++	++		

*Примечание: Красящий титр флуоресцирующего иммуноглобулина в этом примере равен 1:32. Однако для окраски мазков специфический конъюгат, как и контрастирующий альбумин, используется в рабочем разведении, которое должно быть в два раза концентрированнее его красящего титра. Следовательно, рабочая смесь конъюгатов, выбранная на основании приведенных в данном примере результатов, должна состоять из разведенного 1:16 специфического флуо-*

*ресцирующего иммуноглобулина и контрастирующего альбумина, взятого в разведении 1:16. Чтобы получить в рабочей смеси эти оптимальные соотношения, оба конъюгата должны быть сначала разведены 1:8, а затем смешаны в равных объемах.*

**Непрямой МФА.** Подготовка мазков для проведения серологических анализов. Мазки с заведомо известными микроорганизмами (бактериями, риккетсиями) готовят либо из стандартных корпускулярных АГ и диагностикумов (например, из корпускулярных антигенов для реакции агглютинации), либо из взвесей 1-2-суточных культур живых аттенуированных вакцин (ЕV, СТИ, туляремийной, бруцеллезной и др.). Для выявления противовирусных АГ используют пластинки с монослоем культуры клеток, инфицированных соответствующим вирусом. Взвеси из корпускулярных АГ или живых культур вакцинных штаммов бактерий готовят на ФР концентрацией примерно 500 млн м.к./мл (по оптическому стандарту мутности ГИСК им. Л.А.Тарасевича). Взвеси, приготовленные из сухих корпускулярных АГ, целесообразно предварительно выдержать в течение 2 - 4 ч при температуре 4 – 10°С для более полной регидратации и только потом использовать их для приготовления мазков. Это снижает в ряде случаев неспецифическую сорбцию на АГ сывороточных протеинов и позволяет избежать ошибок при интерпретации результатов анализа. Мазки готовят на специальных графленых предметных стеклах со шлифованной поверхностью на одном конце (для маркировки стекла). Микробную взвесь (АГ) наносят на стекло тонкой пастеровской пипеткой (по 6-8 капель на каждом стекле). Затем мазки высушивают на воздухе при комнатной температуре и фиксируют в течение 15 мин на холоде ацетоном или 96°

этиловым спиртом. Мазки из микробной взвеси или корпускулярного АГ можно готовить впрок. При условии их хранения при температуре не выше 0°С они могут быть пригодны для использования в течение месяца. Монослой инфицированных вирусом клеточных культур, длительному хранению не подлежат и должны быть использованы в течение ближайших 2-3 дней.

*Подготовка исследуемых сывороток:* исследуемые с помощью НМФА сыворотки людей и животных какой-либо предварительной специальной обработке не подвергаются. Их инактивацию проводят путем прогревания при 56°С в течение 30 мин. Для определения титра специфических АТ испытуемые сыворотки разводят ФР в пределах от 1:10 до 1:1280 и более (в случае необходимости). Используемые контрольные сыворотки (заведомо нормальная или гетерологичная содержащимся в мазке антигенам) берут в разведении 1:20 - 1:40.

*Подготовка антивидовых флуоресцирующих иммуноглобулинов.* При выявлении АГ в сыворотках крови с помощью НМФА используют (в зависимости от применяемой модификации метода) либо антивидовые флуоресцирующие иммуноглобулины, гомологичные белкам исследуемой сыворотки, либо флуоресцирующие иммуноглобулины к комплементу морской свинки. Сухие конъюгаты растворяют дистиллированной водой в объеме, указанном на этикетке ампулы (обычно в 0,5 мл). К использованию годны лишь те конъюгаты, которые легко и без осадка растворяются в течение 1-2 мин. Для обработки мазков готовят рабочие смеси, состоящие из равных объемов флуоресцирующего антивидового (антикомплементарного) иммуноглобулина и контрастирующего альбумина, взятых в рабочих разведениях. Поскольку указанные на этикетках ампул рабочие разведения флуоресцирующих конъю-

югатов являются ориентировочными, рекомендуется предварительно (для каждой новой серии препаратов) определить их красящий титр и рабочее разведение. Методика титрования конъюгатов и выбора оптимальных соотношений при составлении рабочей смеси аналогична используемой при подготовке препаратов для прямого варианта МФА.

При титровании антивидового (антикомплементарного) флуоресцирующего иммуноглобулина на первом этапе обработки мазков используют заведомо положительную (гомологичную содержащемуся в мазке АГ) нефлуоресцирующую сыворотку в разведении 1:5-1:10.

*Техника титрования исследуемых сывороток.* Исследование сывороток с помощью НМФА включает в себя два этапа обработки мазков, содержащих заведомо известные микроорганизмы (АГ). На первом этапе, в зависимости от избранной модификации метода, на мазки наносят последовательные двукратные разведения испытуемых сывороток (иммунофлуоресцентная окраска сывороточных иммуноглобулинов) или смеси равных объемов комплемента морской свинки, взятого в разведении 1:10 (сухой комплемент) или 1:20 (свежий, жидкий комплемент), и последовательных двукратных разведений испытуемой сыворотки (иммунофлуоресцентная окраска комплемента). При нанесении и распределении по мазку соответствующих разведений сыворотки (или их смесей с комплементом) не следует допускать их слияния и перемешивания. Мазки с нанесенными на них разведениями сыворотки инкубируют 20 мин во влажной камере при температуре 37°C, затем в течение нескольких секунд промывают под легкой струей воды, отмывают в двух сменах (по 10 мин каждая) ЗФР и ополаскивают дистиллированной водой. После отмывки препараты высушивают на

воздухе при комнатной температуре. На втором этапе окраски на высохшие мазки наносят по капле рабочей смеси соответствующего антивидового (антикомплемментарного) флуоресцирующего иммуноглобулина и контрастирующего альбумина. Мазки вновь выдерживают 20 мин во влажной камере при температуре 37°C. После этого с мазков стряхивают остатки смеси конъюгатов, отмывают в двух сменах (по 10 мин каждая) буферного раствора и споласкивают дистиллированной водой. В полевых условиях вместо ЗФР мазки можно промывать 10 мин проточной водой, а затем ополаскивать дистиллированной водой. Окрашенные мазки высушивают на воздухе при комнатной температуре.

*Учет и оценка результатов микроскопии.* О наличии специфических антител в исследуемых сыворотках (серодиагностика) судят по степени яркости свечения микроорганизмов в окрашенных препаратах. За титр сыворотки принимают то наибольшее ее разведение, которое еще обеспечивает свечение гомологичных микроорганизмов интенсивностью не менее чем на 2 креста при отрицательных результатах в контроле. При оценке диагностического значения положительных результатов анализа обращают внимание не только на высоту титра обнаруженных АТ, но и на динамику их нарастания при исследовании парных сывороток. Повышение титра АТ в сыворотках, взятых повторно через 7-10 дней, указывает на инфекционный процесс. Отсутствие динамики может свидетельствовать об анамнестическом характере выявленных АТ. При идентификации с помощью НМФА выделенных микроорганизмов о видовой (групповой) принадлежности последних судят по результатам титрования заведомо известных диагностических сывороток. Гомологичные микроорганизмы реагируют со специфици-



ческими сыворотками в максимальном разведении, близком к их титру.

*Контрольные исследования.* Контрольные исследования при иммунофлуоресцентной серодиагностике предусматривают:

1. исследование препаратов, обработанных на первом этапе заведомо «отрицательной» сывороткой и докрашенных соответствующим ей антивидовым флуоресцирующим иммуноглобулином;
2. исследование препаратов, обработанных непосредственно (без первого этапа) смесью флуоресцирующего антивидового иммуноглобулина с контрастирующим альбумином.

В обоих случаях специфическая флуоресценция должна отсутствовать.

При иммунофлуоресцентной идентификации выделенных микроорганизмов препараты обрабатывают на первом этапе серией нефлуоресцирующих специфических сывороток, а затем докрашивают соответствующими рабочими смесями конъюгатов. Специфическое свечение при этом может наблюдаться лишь в одном из окрашенных препаратов, а именно в обработанном на первом этапе гомологичной изучаемому агенту сывороткой. Все остальные препараты являются контрольными. Специфическая флуоресценция в них должна отсутствовать

### **5.1.6. Варианты иммуносорбентного анализа на твердой фазе**

Твердофазные методы исследования предполагают использование твердой фазы в качестве основы для сорбции на ней иммунных реагентов: АТ (АГ). Все этапы реакции протекают на границе 2-х фаз: твердой и жидкой. Не прореагировавшие компоненты удаля-

ются с помощью отмывания. Чувствительность этих методов превышает аналогичный показатель агглютинационных реакций.

**Иммуноэритроадсорбционный метод (ИЭАМ).** Принцип иммуноэритроадсорбционного метода обнаружения АГ (АТ) состоит в том, что специфические АТ (АГ), адсорбированные на стенках U-образной лунки твердой фазы, специфически взаимодействуют с искомым АГ (АТ), а последний затем иммунологически связывается со специфическими АТ (АГ), мечеными эритроцитами. Меченые эритроцитами АТ (АГ), вступившие во взаимодействие с АГ (АТ), остаются на стенках иммуносорбента (с образованием регистрируемого визуально “зонтика”), при отсутствии АГ (АТ) в исследуемом материале эритроциты под действием силы тяжести скатываются на дно лунки, формируя “пуговку”. В качестве твердой фазы в ИЭАМ используют 60-луночные микрокамеры с объемом лунок 20 мкл – камеры Терасаки. Используемые в ИЭАМ эритроцитарные конъюгаты могут также применяться в РПГА в качестве антительного (антигенного) диагностикума.

**Радиоиммунный анализ (РИА)** – метод, в котором в качестве маркера АТ (АГ) используются радионуклиды –  $^{125}\text{I}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{51}\text{Cr}$  и т.д. После взаимодействия АГ с АТ отделяют образовавшийся радиоактивный иммунный комплекс и определяют его радиоактивность в соответствующем счетчике (бета- или гамма-излучение): при этом интенсивность излучения прямо пропорциональна количеству связавшихся молекул АГ или АТ.

**Иммуноферментный анализ (ИФА) (ELISA)** – (от англ. *enzyme-linked immunosorbent assay*) - метод, в котором в качестве маркеров АТ (АГ) используют ферменты. Благодаря простоте и высокой чувствительности

твердофазные иммуноферментные системы удобны для выявления АГ, АТ и иммунных комплексов. Проблемы специфичности ИФА по характеру и сложности те же, что и у других иммунологических методов. Они могут быть сведены к минимуму путем постоянного контроля качества реагентов и стандартизации методических приемов. Применение в ИФА моноклональных антител, обладающих строго определенной специфичностью и одинаковой аффинностью, позволяет повысить качество исследований (специфичность).

Твердофазными носителями для проведения ИФА могут быть различные материалы. В ранних разработках, как правило, использовали пластмассовые пробирки, на смену которым быстро пришли панели для титрования с лунками, имеющими плоское прозрачное дно, и удобные для измерения оптической плотности продуктов реакции на специальных приборах-ИФА-ридерах (от англ. *to read*-читать). Последние модификации в качестве твердой фазы предусматривают использование палочек и шариков, а также нитроцеллюлозных мембран, активно сорбирующих белки. Модификация с использованием мембран получила название «дот»-ИФА. Планшетный вариант ИФА на протяжении еще многих лет останется наиболее распространенным для решения большинства научных и прикладных задач.

**Основные принципы твердофазного ИФА:** Возможность проведения иммуноферментного анализа независимо от его модификации основана на следующих четырех принципах: 1. Различные ферменты, наибольшее распространение из которых получили пероксидаза хрена (ПХ) и щелочная фосфатаза (ЩФ), можно ковалентно присоединить к АГ или АТ различными химическими методами в таких условиях, когда оба компонента конъюгата сохраняют свою биологиче-

скую активность (способность взаимодействовать с субстратом и антигенсвязывающую активность). 2. Большинство АГ, в том числе белки, пептиды, полисахариды и бактериальные липополисахариды самопроизвольно сорбируются на поверхности пластика. АТ, будучи белками, тоже сорбируются на пластике и при этом сохраняют антигенсвязывающую активность. Именно на этом принципе основан первый этап реакции, заключающийся в «сенсibilизации» панелей АГ или АТ. Адсорбированные на твердой фазе АГ и АТ уже не смываются буфером, содержащим детергент, тогда как не связавшиеся реагенты легко удаляются отмыванием. 3. В «сенсibilизированных» лунках инкубируют исследуемый образец и стандартные реагенты. При этом на поверхности твердой фазы формируются иммунные комплексы, состоящие из одного или нескольких слоев. Не связавшиеся компоненты на каждом этапе удаляют отмыванием, что позволяет добиться высокой специфичности анализа в реакции входящего в состав конъюгата фермента с индикаторным субстратом. 4. При связывании конъюгата АТ=фермент или АГ=фермент с иммобилизованным иммунным комплексом активный центр фермента остается доступным для взаимодействия с субстратом. Инкубация субстрата в лунках с иммобилизованным конъюгатом приводит, как правило, к развитию цветной реакции. Эту реакцию останавливают на нужной стадии, а выраженность окрашивания оценивают визуально, сравнивая со стандартами, или инструментально по оптической плотности. Некоторые варианты метода, например, «дот»-ИФА и «метод индикаторной полоски» предполагают окрашивание самой твердой фазы. В этих случаях используют хромогенные субстраты, дающие продукты в виде нерастворимых, им-

мобилизованных на твердой фазе окрашенных преципитатов (табл.6).

Таблица 6

Ферменты и субстраты к ним

Фермент	Конъюгирующий реагент	Растворимый субстрат	Рекомендуемая длина волны при фотометрии	Нерастворимый субстрат
Пероксидаза хрена (ПХ)	глутаральдегид (двухэтапный метод) Мета-периодат натрия N- сукцинимидил – 3 (2- пиридилдитно) пропинат (СПДП)	Орто- фенилендиаминдигидрохлорид (ОФД) Тетраметилбензидин 2,2'-Азино-ди (3-этил) бензотиазолин-сульфоная кислота (АБТС) 5-Аминосалициловая кислота (АСК)	492 450 650 (и 405 после установки реакции) 450	Диаминобензидин 4-Хлоро-1-нафтол 3-Амино-4-этилкарбазол (АЭК)
Щелочная фосфатаза (ЩФ)	Глутаральдегид (одноэтапный метод)	N-n-нитрофенилфосфат щелочной (ПНФФ)	402-412	Нафтол As-mx фосфат + диазоль синий 2С (НАФДС) Нафтол As-mx фосфат + диазоль красный TP (НАФДК) 5-бromo-4-хлоро-3-водилфосфат (БХНФ)
β- галактозидаза (β-Г)	Мета-малеимидобензол – N-гидроксисукцинимидный эфир (МБГС)	Орто- нитрофенил- β-D галактозид (ОНФГ)	420	
Уреаза	Глутаральдегид (одноэтапный метод)	Бромкрезоловый пурпурный (БП)	558	
Пенициллиназа	Глутаральдегид (одноэтапный метод)	Иод и крахмал	Визуальный учет обесцвечивания синей окраски	

## **Методические варианты ИФА для определения антител и антигенов**

Для выявления и количественного определения АТ и АГ используют различные модификации ИФА с сенсibilизацией твердой фазы соответствующим иммунным реагентом.

### **«Сэндвич»-вариант ИФА для определения АГ и иммунных комплексов**

Благодаря методической простоте, специфичности и высокой чувствительности широкое распространение получил так называемый «сэндвич» - вариант ИФА. Его несложно модифицировать в «дот» - ИФА. В соответствии со схемой данного варианта анализа АТ (лучше моноклональные или высокоаффинные), адсорбированные на твердой фазе, инкубируют с исследуемым образцом (а также с положительным и отрицательным контрольными образцами и разведениями стандартного АГ). После отмывания в лунки вносят меченные ферментом АТ к тому же АГ и далее раствор субстрата к используемому в конъюгате ферменту. Через определенное время развившуюся цветную реакцию останавливают ингибитором фермента.

### **Непрямой ИФА для выявления АТ**

Этот вариант ИФА наиболее удобен для повседневного анализа образцов сывороток на наличие специфических АТ. Для проведения анализа в лунках панелей адсорбируют АГ (экстракт из бактерий, паразитов или вирусов), далее в них инкубируют образцы сывороток или другого материала (например, молока, слюны, спинномозговой жидкости). Специфические АТ, связавшиеся с сенсibilизированными АГ, выявляют с помощью антиглобулиновых антител либо стафилококкового белка А, меченых ферментом. Стафилококковый белок А=Ф является универсальным конъю-

югатом, с помощью которого можно исследовать на наличие специфических АТ сыворотки крови людей и любых видов животных (кроликов, мышей, баранов, лошадей и т.д.). Визуализация реакции происходит при добавлении в лунки соответствующего ферменту раствора субстрата.

Для постановки ИФА важное значение имеют следующие моменты:

1. *Панели для ИФА и их способность адсорбировать АТ или АГ.* Полистироловые и полихлорвиниловые панели, выпускаемые различными производителями, могут сильно различаться по способности адсорбировать иммунные реагенты. Серьезные различия возможны и между отдельными партиями панелей одной марки. Лучше всего использовать высококачественные панели, предназначенные специально для ИФА. В этом случае «краевые» эффекты и различия в адсорбционной способности между отдельными планшетами и партиями сведены к минимуму, а оптические свойства лунок обеспечивают высокую точность учета результатов.

2. *Оптимальная концентрация АТ или АГ для сенсibilизации панелей.* Подбор оптимальной концентрации АТ или АГ для сенсibilизации панелей - один из наиболее ответственных этапов в ИФА. От него во многом зависят результаты проведения анализа. Сенсibilизация панелей недостаточным количеством АТ или АГ снижает чувствительность анализа и создает условия для неспецифической адгезии конъюгата непосредственно на пластике, неэкранированном сенситивом. Это приводит, в конечном счете, к повышению фонового уровня реакции и неверной оценке результатов. Сенсibilизация чрезмерным количеством АТ или АГ может привести к неспецифическому связыва-

нию реагентов с иммобилизованным сенситином.

3. *Неспецифическое связывание и свойства конъюгата.* Для высокочувствительного ИФА необходимо использование конъюгатов с возможно более высоким соотношением между уровнем сигнала (положительный результат) и шума (фоновый уровень). Высокое неспецифическое связывание может быть вызвано большими размерами полимеров конъюгатов. Для этого целесообразно использовать не концентрированные растворы конъюгатов, а разведенные до рабочего титра. Кроме того, неспецифическое связывание удастся уменьшить, блокируя ответственные за этот процесс участки твердой фазы слабым раствором инертного белка в буфере для сенсibilизации. С этой целью обычно рекомендуют бычий сывороточный альбумин (БСА). После сенсibilизации твердой фазы соответствующими иммунными реагентами раствор БСА инкубируют в лунках панелей (30-45мин) при комнатной температуре. Панели затем отмывают и проводят следующие этапы анализа.

4. *Свойства субстрата.* Ортофенилендиамин (ОФД), применяемый в качестве субстрата для ПХ, светочувствителен и на свету в смеси с перекисью водорода ( $H_2O_2$ ) спонтанно окрашивается в желтый цвет. Поэтому субстрат готовят непосредственно перед постановкой реакции в сосуде, полностью обернутом фольгой. Панели после внесения раствора субстрата инкубируют в темноте. Реакцию следует остановить в тот момент, когда оптическая плотность (ОП) положительного контроля достигнет оптимального уровня при отсутствии окрашивания в отрицательных образцах. Для обеспечения стандартности результатов необходимо точно знать время оптимального развития цветной реакции и температуру ее проведения.



5. *Хранение сенсibilизированных панелей.* Панели, сенсibilизированные АТ и некоторыми АГ, после отмывания и тщательного высушивания можно хранить в герметичной упаковке с вложенным влагопоглотителем (гранулами силикагеля) при температуре 4 °С. Устойчивость разных АГ к высушиванию и хранению после иммобилизации на пластике неодинакова.

**Интерпретация результатов ИФА**

*При визуальной оценке.* Интенсивность окрашивания в лунках с отрицательными контролями должна быть низкой. Ее оценивают как отрицательную (-) или неопределенную ( $\pm$ ). В тех лунках, где прошла положительная реакция, степень окрашивания оценивают по четырехбальной шкале: от 4+ до 1+. Образцы, при титре которых получены неясные пограничные результаты, необходимо исследовать вновь в меньших разведениях, проводя повторно отрицательные контроли.

*При спектрофотометрической оценке.* Оценка результатов по пороговому уровню реакции. В простейшем случае результат считают положительным, если ОП исследуемого образца превышает максимальную ОП в лунках с отрицательными контролями.

**Варианты твердофазного иммуноферментного анализа**

Известно несколько методических вариантов ИФА, различающихся по типу твердой фазы.

**ИФА на стрипах**

ИФА обычно проводят в планшетах для микротитрования. Помимо целых панелей выпускаются и отдельные полоски (стрипы) с одним рядом лунок, из которых затем можно собрать панель необходимого размера и добиться таким образом экономии расходных материалов. Результаты анализа в таких сборных панелях учитывают визуально или на обычном ИФА-ридере.

### **ИФА со стержнями**

Эта модификация заключается в том, что в каждую лунку панели погружают стержень, сенсibilизированный АГ или АТ. Таким образом, иммунные комплексы формируются на стержнях, а окрашивание растворимого субстрата обычно происходит в лунках. Результаты реакции учитывают так же, как и при традиционном ИФА в панелях. Вместо растворимого субстрата при осуществлении данного варианта ИФА можно использовать нерастворимый - в этом случае окрашивание регистрируют на «стержнях». Такой вариант, однако, менее удобен для точного количественного учета.

### **ИФА в кюветах**

Кюветы имеют больший объем по сравнению с лунками панелей и, следовательно, большую адсорбционную емкость, а также оптически прозрачные боковые стенки для измерения ОП на специальном ридере с горизонтальным направлением луча, что позволяет достичь более высокой чувствительности анализа. Однако данный вариант ИФА более дорогой, так как из-за больших объемов кювет происходит значительный расход реагентов. ИФА в кюветах применяют главным образом для проведения одноэтапного гомогенного анализа низкомолекулярных веществ.

### **ИФА с нейлоновыми нитями или бусами**

Нити или шарики помещаются в лунки планшета и используются в качестве твердой фазы. Благодаря увеличению площади связывания иммунных реагентов повышается чувствительность ИФА, однако возникают большие неудобства при постановке анализа, в частности, при проведении процедур отмывания от не связавшихся компонентов.

### **Дот-ИФА**

ИФА можно проводить на листах или узких полосках мембран, обладающих адсорбционной активностью, в частности, - нитроцеллюлозной с применением нерастворимого субстрата. Лучшими реагентами для тест-систем, основанных на данной модификации, служат высокоаффинные моноклональные антитела. Методика точечной реакции на нитроцеллюлозной мембране получает все более широкое распространение под названием «дот» - ИФА. При осуществлении «дот» - ИФА АГ (АТ) в очень небольшом объеме ~ 1-2 мкл адсорбируют в виде пятен на нитроцеллюлозной мембране.

В качестве диагностикума в дот-ИФА используется тот же ферментный конъюгат, что и в планшетном варианте. Однако ферментные метки имеют ряд недостатков: значительная потеря активности фермента и лиганда в процессе получения конъюгата; необходимость хранения самого фермента и препаратов на его основе при низких температурах или в консерванте; подверженность результатов анализа влиянию примесей в исследуемом образце, способных инактивировать фермент или провоцировать спонтанную реакцию; токсичность отдельных компонентов проявляющей системы.

В связи с этим все более широкое распространение в настоящее время приобретают в качестве альтернативы ферментным меткам неорганические хромогенные маркеры: металлы - платина, золото, серебро, медь, кобальт, железо, палладий и неметаллы - селен, теллур, сера, кремний, углерод и др. Преимуществом указанных меток являются простота получения коллоидных частиц, связывание золя с иммунореагентами щадящим сорбционным способом, стабильность в относительно широком диапазоне физико-химических условий, безопасность для здоровья персонала.

**Иммунохроматография.** Иммунохроматографический метод анализа, появившийся в конце 1980-х годов (ZukR.F. *etcd.*, f978), хорошо зарекомендовал себя как экспресс-метод выявления возбудителей инфекционных заболеваний и токсинов. Небольшое время анализа (несколько минут), отсутствие промежуточных стадий подготовки образца, возможность визуальной регистрации результатов анализа, высокая специфичность метода и достаточно высокая чувствительность делают его весьма привлекательным.

На основе иммунохроматографического (ИХ) метода с использованием частиц коллоидного золота разработаны иммунохроматографические индикаторные элементы для выявления спор сибирской язвы, возбудителей чумы, туляремии, сапа, холеры, ботулинического токсина типа А и других инфекционных болезней. Создана производственная технологическая линия на базе Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии. Прошли процесс госрегистрации в ФС Росздравнадзора РФ иммунохроматографические индикаторные тест-системы для лабораторной диагностики чумы (2), туляремии, сибирской язвы (споры). Данные наборы тест-систем выпускаются в виде хаузенг-стрипов (индивидуальная пластиковая упаковка для каждого анализа) или готовых к использованию мембранных ИХ - полосок, упакованных по 10-20 штук в пластиковую пробирку.

ИХ - простой и удобный метод определения патогенных микроорганизмов, в отличие от традиционного ИФА, не требующий проведения процедур отмывки и других манипуляций. Основная проблема практического использования ИХ-тестов связана с повышением их чувствительности. С этой целью проводятся исследования по использованию систем концентри-

рования образца с применением магноиммуносорбентов, иммунофльтрации, а также использованию флуоресцентных маркеров иммунных реагентов с соответствующей детекцией флуоресценции специальными индикаторами. Параллельно идут исследования по разработке детектирующего оборудования для документирования результатов и программного обеспечения ИХ-исследований.

### **Мультиплексный фосфоресцентный микроанализ**

Современные тенденции в развитии методов лабораторной диагностики инфекций связаны с повышением не только чувствительности и специфичности, но и мультиплексности разрабатываемых тестов, то есть возможности одновременного определения нескольких маркеров в одной пробе без разделения последней на отдельные порции. Создание таких тестов является актуальным в связи с существованием «сочетанных» природных очагов и «смешанных» инфекций и составляет основу разработки комплексного подхода к одновременному выявлению всего спектра потенциально возможных заболеваний при проведении скрининговых сероэпидемиологических исследований эндемичных территорий. Для реализации такого подхода возможно использование диагностической технологии на основе фосфоресцентного мультикомпонентного микроанализа (ФОСФАН). В настоящее время разработана биочип-технология ФОСФАН для индикации возбудителей особо опасных инфекций (рис. 20).



Рис. 20. Фосфоресцентный микроанализатор ФОСФАН.

В отличие от иммуночипов, формируемых на стекле, предлагаемый подход позволяет одновременно анализировать до 96 образцов и использовать для анализа стандартное оборудование (шейкеры, промыватели и т.п.). Комплект состоит из индикатора флуоресценции (ИФИС), укладки для отбора проб и набора реагентов (тест-систем) для обнаружения и идентификации возбудителей сибирской язвы, чумы, туляремии, венесуэльского энцефаломиелита лошадей, заболеваний ортопоксвирусной природы, Крымской геморрагической лихорадки, сыпного тифа, клещевой пятнистой лихорадки, токсинов ботулинического типа А и стафилококкового типа В. Принцип построения индикаторных тестов универсален. На твердой фазе дна лунки полистиролового микропланшета сорбируют в виде отдельных микрозон специфические АТ. Формирование микрозон осуществляется контактным способом с помощью роботизированных наноплоттеров. Стадии анализа включают инкубацию анализируемой пробы в лунках микропланшета, промывку лунок для удаления не связавшихся компонентов реакции, биоспецифическое связывание выявляемого в пробе патогена или его АГ с индикаторными АТ, конъюгированными с биотином. «Проявление» реакции осуществляют с помощью универсального флуоресцирующего реагента - конъюгата стрептавидина с Pt копропорфирином. Сигнал флуоресценции регистрируют при последовательном сканировании отдельных участков дна лунки микропланшета светодиодом с длиной волны излучения 380 нм. Чувствительность системы детекции составляет около  $10^6$  молекул Pt копропорфирина в освещаемой площадке сканирования диаметром около 1 мм. Результаты сканирования регистрируют как число фотоимпульсов от каждой

из микрозон. После компьютерной обработки графическая картина распределения сигнала в микрозонах представляется в виде объемных цветных гистограмм или окрашенных пятен. Интенсивность сигнала в виде цветовой шкалы отражает концентрацию патогена в исследуемой микрозоне.

В ходе анализа обеспечиваются требования противоэпидемического режима. Индикатор флуоресценции размещается в боксированной зоне и управляется радиосвязью через персональный компьютер. После завершения иммунной реакции адсорбированный биоматериал сохраняет стабильный уровень флуоресценции в течение нескольких месяцев. Это позволяет архивировать микропланшеты и, при необходимости, осуществлять повторное измерение сигнала. Технология ФОСФАН сочетает преимущества твердофазного микропланшетного сэндвич-иммуноанализа с потенциалом биочип-технологий. По сравнению с классическими схемами твердофазного ИФА она имеет ряд очевидных преимуществ благодаря возможности осуществления мультикомпонентного анализа. Микропланшетный формат выгодно отличает ее и от традиционных биочип-технологий на слайдах. Это обусловлено более благоприятными условиями для дозирования проб и реагентов и, как следствие, возможностью создания количественных тестов и многократного повышения производительности лабораторных исследований. Следует также добавить ряд важных экономических моментов, создающих очевидные конкурентные преимущества для данной технологии: уменьшение расхода АТ, используемых для сорбции на твердой фазе (почти в 100 раз); снижение расхода иммунореагентов (конъюгатов, биотинилированных АТ и стрептавидина) в 5-10 раз за счет об-



работки только дна лунок микропланшета. Благодаря высокой стабильности флуоресцентной метки, дополнительным преимуществом метода является возможность отсроченного и (или) повторного измерения результатов анализа биоматериала в высушенных и герметично упакованных планшетах, которые могут храниться в архиве в течение длительного периода времени (месяцев, лет).

## ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ

### Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) Сэндвич-вариант ИФА для обнаружения АГ

Принцип метода. Взаимодействие АГ с АТ, меченым ферментом. Учет реакции осуществляется измерением ферментативной активности реакционной смеси, что дает возможность оценить количество искомого АГ в исследуемых образцах. Высокая чувствительность ИФА связана с каталитическими свойствами ферментов, одна молекула которых может реагировать с большим количеством (несколько тысяч) молекул субстрата.

Реактивы:

- а) 0,05 М КББ рН 9,6: 5,25 г  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  и 4,2 г  $\text{NaHCO}_3$  доводят дистиллированной водой до объема 1 л. На 1 л  $\text{NaHCO}_3$  требуется 300 мл  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Хранят в холоде не более 2 недель.
- б) ЗФР рН 7,2: 8 г  $\text{NaCl}$ , 0,2 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,2 г  $\text{KCl}$  и 2,9 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  растворяют в 1 л дистиллированной воды, рН доводят  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .
- в) Отмывающий раствор: к 100 мл ЗФР рН 7,2 добавляют 50 мкл Твина-20.
- г) 1%-ный БСА: в 100 мл ЗФР рН 7,2 растворяют 1 г БСА
- д) Субстрат: 10 мг дианизидина или диаминобензидина растворяют в 1 мл метанола, добавляют последовательно 99 мл дистиллированной воды и 0,1 мл



3% перекиси водорода. Раствор должен оставаться прозрачным. Готовить в химически чистой посуде!

е) Стоп-реагент- 3%-ный азид натрия: В 100 мл дистиллированной воды растворяют 3 г азид натрия. Материал для исследования в ИФА обрабатывается так же, как для гемагглютинационных методов исследования.

*Техника проведения анализа:* Подготовка твердой фазы: в каждую лунку двух вертикальных рядов микропланшета вносят по 100 мкл специфического к искомому АГ иммуноглобулина концентрацией 50 мкг/мл в 0,05 М КББ pH 9,6, закрывают крышкой и помещают в термостат при 37°C на 2-3 ч, либо на 16-18 ч в холодильник при 4°C. Перед постановкой реакции раствор АГ из лунок сливают в дез. раствор и трижды отмывают ЗФР-тв, оставляя отмывающий раствор в лунках каждый раз на 2-3 мин. После заключительного отмывания микропланшет встряхивают для избавления от капелек отмывающей жидкости и слегка подсушивают на воздухе. Далее в сенсibilизированные антителом лунки вносят по 100 мкл 1%-ного раствора БСА для забивки возможных оставшихся свободных участков на твердой фазе, выдерживают 30 мин при 37°C, после чего планшет освобождают от раствора инертного белка и трижды промывают ЗФР-тв. Отмывающую жидкость удаляют, в каждую подготовленную лунку вносят по 100 мкл ЗФР-тв, затем в 3-ю лунку первого вертикального ряда добавляют 100 мкл исследуемого материала и титруют в объеме 100 мкл, перенося из 1-ой лунки во 2-ю, из 2-ой в 3-ю и т.д. до 7 лунки второго вертикального ряда включительно, из которой 100 мкл раствора раститрованного АГ удаляют в дез. раствор. 8 лунка второго вертикального ряда – положительный контроль - заведомо известное коли-

чество положительного АГ. Первые две лунки первого вертикального ряда – отрицательный контроль - гетерологичный АГ, либо суспензия органов от здоровых животных, или иной материал, не содержащий специфический АГ. После часовой инкубации при 37°C содержимое лунок удаляют в дез.раствор и трижды отмывают ЗФР-тв, как сказано ранее. Затем во все лунки добавляют по 100 мкл рабочего разведения раствора конъюгата (специфические АТ=Фермент). Инкубируют 1 ч при 37°C, трижды отмывают ЗФР-тв. После заключительного отмывания в каждую лунку вносят по 100 мкл раствора субстрата. Реакцию проводят 15-30 мин при комнатной температуре, после чего в каждую лунку добавляют по 1 капле стоп-реагента. При положительном результате в лунках развивается оранжево-коричневое окрашивание. В отрицательном – раствор прозрачен.

#### **Непрямой вариант ИФА для обнаружения АТ**

*Техника проведения анализа:* Подготовка твердой фазы: в каждую лунку двух вертикальных рядов микропланшета вносят по 100 мкл раствора АГ концентрацией 50 мкг/мл в 0,05 М КББ рН 9,6, закрывают крышкой и помещают в термостат при 37°C на 2-3 ч, либо на 16-18 ч в холодильник при 4°C. Перед постановкой реакции раствор АГ из лунок удаляют в дез.раствор и трижды отмывают ЗФР-тв, оставляя отмывающий раствор в лунках каждый раз на 2-3 мин. После заключительного отмывания микропланшет встряхивают для избавления от капелек отмывающей жидкости и слегка подсушивают на воздухе. Далее в сенсibilизированные антигеном лунки вносят по 100 мкл 1%-ного раствора БСА для забивки возможных оставшихся свободных участков на твердой фазе, выдерживают 30 мин при 37°C, после чего планшет осво-

бождают от раствора инертного белка и трижды промывают ЗФР-тв. Отмывающую жидкость удаляют, в каждую подготовленную лунку вносят по 100 мкл ЗФР-тв, затем в 3-ю лунку первого вертикального ряда добавляют 100 мкл исследуемой сыворотки (разведенной заранее ЗФР-тв 1:100) и титруют в объеме 100 мкл, перенося из 1-ой лунки во 2-ю, из 2-ой в 3-ю и т.д. до 7 лунки второго вертикального ряда включительно, из которой 100 мкл раствора раститрованной сыворотки удаляют в дез. раствор. 8 лунка второго вертикального ряда – положительный контроль - заведомо положительная сыворотка больного человека или животного. Первые две лунки первого вертикального ряда – отрицательный контроль - гетерологичная сыворотка, либо сыворотка от здоровых животных или человека. После часовой инкубации при 37°C содержимое лунок удаляют в дез.раствор и трижды отмывают ЗФР-тв, как сказано ранее. Затем во все лунки добавляют по 100 мкл рабочего разведения раствора конъюгата (антивидовые АТ=Фермент). Инкубируют 1 ч при 37°C, трижды отмывают ЗФР-тв. После заключительного отмывания в каждую лунку вносят по 100 мкл раствора субстрата. Реакцию проводят 15-30 мин при комнатной температуре, после чего в каждую лунку добавляют по 1 капле стоп-реагента. При положительном результате в лунках развивается оранжево-коричневое окрашивание. В отрицательном – раствор прозрачен.

*Учет и оценка результатов ИФА:* Учет результатов реакции можно проводить визуально и инструментально (с помощью ИФА-ридера). Визуально реакцию учитывают по наличию соответствующего окрашивания содержимого лунок в опытных пробах и положительном контроле и отсутствию такового в отрицательных

контролях. При наличии слабого окрашивания в отрицательных контрольных образцах (что иногда имеет место при технических погрешностях: некачественной отмывке лунок планшета, использовании концентрированного раствора конъюгата, загрязнении субстрата и т. д.) реакцию учитывают по разнице в окраске отрицательных контрольных и опытных проб.

Инструментальный учет результатов реакции осуществляют на ИФА - ридерах, определяя оптическую плотность продукта реакции фермент-субстрат при соответствующей длине волны. Оптическая плотность положительных образцов должна как минимум в 1,5 - 2 раза превышать таковую в контрольных пробах.

#### **5.1.7. Серологические реакции, протекающие с участием комплемента**

**Реакция бактериолиза.** Используется для серологической диагностики холеры. Феномен бактериолиза легко удается наблюдать *in vitro*. Исследуемую сыворотку наносят в последовательном двукратном разведении каплями на поверхность питательной среды, на которую предварительно засевают культуру вибриона. Чашку с посевами инкубируют при 37°C в течение 18-20 ч. Под влиянием имеющихся в сыворотке АТ и комплемента холерные вибрионы разрушаются (лизуются), и в местах нанесения капель образуются стерильные пятна. АТ, разрушающие вибрионы, называют вибриоцидными. Титром вибриоцидных АТ считается максимальное разведение сыворотки, при котором она еще вызывает отчетливый лизис бактерий.

**Реакция иммобилизации трепонем.** Применяется для диагностики сифилиса. Живые трепонемы в присутствии имеющихся в исследуемой сыворотке специфических АТ и комплемента теряют свою подвижность.

**Реакция гемолиза.** Литическое действие иммунной сыворотки в присутствии комплемента особенно четко проявляется в отношении эритроцитов. Если кролика иммунизировать эритроцитами другого вида животных (барана), кроличья сыворотка приобретает специфическую гемолитическую активность, т.е. способность вызывать гемолиз эритроцитов, использованных для иммунизации. Этот эффект абсолютно зависит от комплемента. Инактивация последнего путем прогревания сыворотки при 56°С приводит к утрате ею гемолитической активности. Таким образом, наличие или отсутствие активного комплемента в гемолитической сыворотке очень четко выявляется по результатам ее взаимодействия с гомологичными эритроцитами: при наличии комплемента - гемолиз, образование «лаковой крови»; при его отсутствии - гемагглютинация, эритроциты выпадают на дно пробирки, образуя осадок в виде зонтика, жидкость бесцветна.

**Реакция связывания комплемента.** Уникальная способность комплемента специфически связываться с различными по своей природе комплексами АГ + АТ нашла широкое применение в реакции связывания комплемента (РСК). Особое преимущество РСК состоит в том, что природа АГ, участвующего в ней (корпускулярный или растворимый), не имеет значения, так как комплемент связывается с Fc-фрагментом любого АТ, относящегося к IgG и IgM, независимо от его антительной специфичности. Кроме того, РСК очень чувствительна: она позволяет обнаружить количество антител в 10 раз меньше, чем, например, в реакции преципитации. РСК была предложена в 1901 г. Ж. Борде и О. Жангу. В ее основе лежат два свойства комплемента: 1) способность связываться с комплексом АГ + АТ; 2) лизирование эритроцитов, использованных для

получения гемолитической сыворотки. РСК ставят в два этапа, и в ней соответственно участвуют две системы - опытная, или диагностическая, и индикаторная.

Диагностическая система состоит из исследуемой (или диагностической) сыворотки, которую перед постановкой реакции прогревают при  $56^{\circ}\text{C}$  в течение 30 мин для инактивации имеющегося в ней комплемента, и АГ. К этой системе добавляют стандартный комплемент. Его источником служит свежая или высушенная сыворотка морской свинки. Смесь инкубируют при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение одного часа. Если в исследуемой сыворотке имеются АТ, произойдет их взаимодействие с добавленным АГ, и образующиеся комплексы АГ + АТ свяжут добавленный комплемент. Если же в сыворотке АТ отсутствуют, образования комплекса АГ + АТ не произойдет, и комплемент останется свободным. Никаких видимых проявлений связывания комплемента на этой стадии реакции обычно нет. Поэтому для выяснения вопроса, произошло или нет связывание комплемента, добавляют вторую, индикаторную систему (инактивированная гемолитическая сыворотка + эритроциты барана), и смесь всех компонентов РСК вновь инкубируют при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 30-60 мин., после чего оценивают результаты реакции. В случае если комплемент связался на первой стадии, в диагностической системе, т. е. в сыворотке больного имеются АТ, и произошло связывание комплемента комплексом АТ + АГ, лизиса эритроцитов не будет - РСК положительна: жидкость бесцветна, на дне пробирки осадок эритроцитов. Если же в сыворотке специфические АТ отсутствуют и связывания комплемента в диагностической системе не произойдет, т. е. РСК отрицательна, то неизрасходованный в диагностической системе комплемент связывается с комплексом эритроциты +

АТ индикаторной системы и произойдет гемолиз - в пробирке «лаковая кровь», осадка эритроцитов нет. Интенсивность РСК оценивают по четырехкрестной системе в зависимости от степени задержки гемолиза и наличия осадка эритроцитов. Реакция сопровождается соответствующими контролями: контроль сыворотки (без АГ) и контроль АГ (без сыворотки), так как некоторые сыворотки и некоторые АГ обладают антикомплементарным действием. Перед постановкой РСК все компоненты, участвующие в ней, за исключением исследуемой сыворотки или АГ, подвергаются тщательному титрованию. Особенно важно ввести в реакцию точную дозу комплемента, так как его нехватка или избыток могут привести к ложным результатам! Титром комплемента является то его минимальное количество, которое в присутствии рабочей дозы гемолитической сыворотки обеспечивает полное растворение эритроцитов. Для постановки основного опыта берут дозу комплемента, увеличенную на 20-25% по сравнению с установленным титром. Титром гемолитической сыворотки является то ее максимальное разведение, которое, будучи смешано с равным объемом 10% раствора комплемента, полностью гемолизует соответствующую дозу эритроцитов в течение 1 ч при 37°C. В основной опыт берут сыворотку, разведенную до 1/3 своего титра.

**Непрямая реакция гемолиза** используется как ускоренный метод обнаружения специфических АТ. В качестве носителя АГ используют эритроциты. При наличии в сыворотке большого специфических АТ сенсibilизированные эритроциты в присутствии комплемента лизируются.



### 5.1.8. Реакции нейтрализации

Этот тип иммунологических реакций основан на способности АТ специфически подавлять (нейтрализовать) биологическую активность возбудителя или его токсинов в различных тест-системах - организме животных, в куриных эмбрионах, культурах клеток или каким-то иным способом. Это зависит от природы возбудителя и цели исследования. Например, для оценки эффективности иммунизации против дифтерии и столбняка определяют уровни антитоксинов в сыворотке крови привитых по их способности нейтрализовать биологическое действие определенной дозы токсина (реакция Шика). Широкое применение они получили в диагностике ботулизма, в вирусологической практике как для серологической диагностики вирусных заболеваний, так и для идентификации вирусов. С этой целью используют реакции нейтрализации роста вирусов в культуре ткани, подавления бляшкообразования, гемадсорбции, торможения гемагглютинации (РТГА) и др.

## 6. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЭНТЕРОБАКТЕРИОЗОВ

Прежде, чем приступить к работе с возбудителями особо опасных инфекций (чума, туляремия, холера, сибирская язва, бруцеллез), слушателям предлагается изучение биологических свойств представителей родовых групп семейства *Enterobacteriaceae*, а также современных методов обнаружения, выделения и идентификации наиболее значимых в патологии человека микроорганизмов основных родов: *Escherichia*, *Shigella* и *Salmonella*.

### 6.1. Характеристика семейства *Enterobacteriaceae*



Название семейства *Enterobacteriaceae* (enteron - кишка) связано с тем, что средой обитания для большинства бактерий является кишечный тракт позвоночных животных и человека. В организме человека многие энтеробактерии находятся в состоянии микробных биоценозов толстой и тонкой кишок. При изменении условий существования они могут вызывать заболевания. Это так называемые условно-патогенные бактерии. Патогенные виды встречаются только у больных и бактерионосителей. С испражнениями людей и животных энтеробактерии попадают в окружающую среду, где могут сохраняться длительное время.

Микроорганизмы, принадлежащие к семейству энтеробактерий, многочисленны и разнообразны по биологическим свойствам. Их классификация и номенклатура многократно подвергались и подвергаются ревизии, дополнениям и изменениям.

Согласно определителю бактерий Берджи (1997 г., перевод 9-го американского издания 1994 г.), семейство *Enterobacteriaceae* включает в себя 31 род, среди которых *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Morganella*, *Proteus*, *Yersinia*, *Edwardsiella* и другие. Основными свойствами, характеризующими семейство энтеробактерий, являются палочковидная форма (ширина - 0,3-1,0, длина - 1,0-6,0 мкм), наличие общего антигена Кунина, грамотрицательная окраска, расщепление глюкозы ферментацией, способность восстанавливать нитраты в нитриты (за исключением некоторых штаммов *Yersinia*, *Erwinia*), наличие каталазы (кроме *S. dysenteriae* серовара 1), отсутствие оксидазы и способности к спорообразованию, содержание Г+Ц в ДНК - 39-59 моль%.

Идентификация энтеробактерий по родам осуществ-

вляется на основе морфологических, физиологических и биохимических признаков, а также генетического анализа микроорганизмов. Особое место отводят ферментативным свойствам, так как именно они служат первоочередной основой для идентификации в пределах семейства (табл. 7). Эти свойства признаны наиболее стабильными. Для бактерий каждого рода характерен определенный спектр биохимических признаков, выявление которых технически не сложно и позволяет получать достаточно наглядные результаты. Разработана схема, включающая минимум наиболее значимых тестов (минимальный дифференцирующий ряд), необходимых для получения достоверных результатов идентификации энтеробактерий.

Таблица 7  
Дифференциация родовых групп Enterobacteriaceae по биохимическим свойствам

Тест или субстрат		<i>Esherichia</i>	<i>Shigella</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Hafnia</i>	<i>Serratia</i>	<i>Proteus</i>	<i>Yersinia</i>	<i>Edwardsiella</i>	<i>Erwinia</i>
Комбинированная среда	Сероводород	-	-	+,-	+,-	-	+	-	-	+,-	-	+	-,+
	Лактоза	+,-	-	-,+	x	+	+	-,+	-,+	-	-	-	x
	Глюкоза (газ)	+,-	-	+,-	+	+	+	+,-	-,+	+,-	+	+	-
	Мочевина	-	-	-	x	-	(+),-	-	x	+,-	+,(+)	-	-
Минимальный дифференцирующий ряд	Мочевина (по Преусу или Кристенсену)	-	-	-	x	(+)	(+),-	-	x	+,-	x	-	-
	Подвижность	+,-	-	+,-	+	-	+	x	+	+,-	-	+	+,-
	Индол	+,-	-,+	-	-,+	-,+	-	-	-	+,-	-,+	+	-
	Фенилаланиндезаминаза	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	x
	Цитрат Симмонса	-	-	+,-	+	+	+	x	+	x	-	-	+
	Ацетат натрия	+,(+)	-	x	x	+	+	-(+)	x	x	x	x	x
	Лизиндекарбоксилаза	+,-	-	+,-	-	+	-,+	+	+	-	-	+	-

	Орнитинде-карбоксилаза	x	-,+	+	x	-	+	+	+	-,+	x	+	-
Среда Кларка	Реакция с метиловым красным	+	+	+	+	-,+	-	+	x	+	+	+	-
	Реакция Фогес-Проксауэра	-	-	-	-	+,-	+	x	x	-	-	-	x
	Сорбит	x	x	+	+	+	+	-	+	-,+	x	-	x

*Примечание: + положительная реакция; (+) замедленно положительная реакция (позже 24 ч); - отрицательная реакция; x - различные результаты реакции*

При установлении родовой принадлежности культур используют серологические тесты с соответствующими поливалентными сыворотками. Достаточно полно изучена антигенная характеристика таких бактерий как сальмонеллы, шигеллы, эшерихии, цитробактеры, отчасти протеи и клебсиеллы. Из числа известных антигенов энтеробактерий для идентификации имеют значение: липополисахаридные (О), жгутиковые (Н) и капсульные полисахаридные (К) антигены.

Дополнительным тестом для подтверждения принадлежности культур к патогенным энтеробактериям служат пробы с соответствующими поливалентными родоспецифическими бактериофагами. Для внутривидовой дифференциации бактерий используют серологические признаки, анализ плазмидного состава, отношение к бактериофагам и колицинам и некоторые другие тесты.

В последние годы в практике бактериологических лабораторий для экспрессной идентификации энтеробактерий все большее применение находят АРІ-тесты, биохимический экспресс-анализатор «АТВ identification» фирмы Bio-Merieux (Франция), тест-система BBL

«Crystall» фирмы Becton Dickinson (Германия), а также идентификатор микроорганизмов Micro Tax фирмы SY-LAB (Австрия) и микробиологический анализатор Vitek-2 Compact (Bio-Merieux, Франция). В референс-лабораториях и научно-исследовательских учреждениях эффективно применяют методы генетических зондов и полимеразную цепную реакцию.

Одним из эффективных методов диагностики ОКИ является иммунохроматографический анализ, который доступен для исполнения у постели больного, в кабинете врача, для самодиагностики в домашних условиях. Многие зарубежные компании (Merck, Merieux) предлагают набор компонентов для экспресс-обнаружения *E. coli* O157, сальмонелл, кампилобактера, веротоксинов и других.

Для бактериологического исследования на энтеробактерии пригоден самый разнообразный материал. Отбор проб из клинических образцов (испражнения, кровь, моча, желчь, дуоденальное содержимое, пунктаты органов, экссудат, спинномозговая жидкость, мокрота, слизь из зева, носа, уха, отделяемое ран, секционный материал) производится с учетом локализации, патогенеза патологического процесса и стадии заболевания. Пробы из объектов окружающей среды отбирают с учетом путей и факторов передачи инфекции, сроков сохранения этих микроорганизмов в тех или иных объектах. Взятый на исследование материал должен быть посеян в течение двух часов на питательные среды. Если это не представляется возможным, то его следует поместить в консервант (глицериновый, фосфатно-буферный, изотонический раствор хлорида натрия) в соотношении 1:3.

Посевы проб исследуемого материала производят в жидкие питательные среды и на чашки с плотными

селективно-дифференциальными средами.

Жидкие накопительные среды предназначены для посева материала, содержащего разнообразную микрофлору (испражнения, гнойное отделяемое, секционный материал и т.п.). Они содержат вещества, подавляющие рост сопутствующей микрофлоры. К средам, предназначенным для выделения сальмонелл, относятся селенитовый бульон, магниевая среда, среда Мюллера или Кауфмана. Исследуемый материал вносят в эти среды в соотношении 1:5 и тщательно перемешивают. Кровь засевают в среды в соотношении 1:10. Обогащительные среды для материалов, обычно не обсемененных микроорганизмами (кровь, спинно-мозговая жидкость), содержат только вещества, стимулирующие рост искомым возбудителей болезни. Для сальмонелл это - среда Рапопорта, желчный бульон.

Плотные высокоселективные среды (ВСА, агар Плоскирева и др.) целесообразно применять для посева испражнений и другого материала, содержащего сопутствующую микрофлору.

Для выделения условно-патогенных энтеробактерий используют слабоселективные питательные среды (среда Эндо, эозин-метиленовый агар и др.). Оптимальным является одновременное применение тех и других сред. Посевы инкубируют при 37°C в течение 18-20 ч (до 48 ч на ВСА).

## 6.2. Эшерихиозы

Эшерихиозы - группа инфекционных заболеваний, вызываемых микроорганизмами рода *Escherichia*, в большинстве случаев - *E. coli*.

Заболевания протекают, главным образом, в виде инфекций желудочно-кишечного тракта, мочевыводящих путей, бактериемии и менингита новорожденных.

Кишечные инфекции обусловлены диареегенными *E. coli* пяти групп: энтеротоксигенными (ЭТКП), энтеропатогенными (ЭПКП), энтероинвазивными (ЭИКП), энтерогеморрагическими (ЭГКП) и энтероадгезивными (ЭАКП). Способность диареегенных *E. coli* вызывать заболевания связана с наличием у них факторов патогенности:

- адгезии и колонизации (кодируется плазмидными генами);
- инвазии (белки наружной мембраны, кодируемые плазмидой м.м. 140 мДа);
- экзотоксинов (цитотонины, два типа цитотоксинов, синтез которых контролируется генами умеренных конвертирующих фагов - 933 J (SLT-I) и 933 W (SLT-II));
- эндотоксинов (липополисахариды).

ЭТКП вызывают холероподобную инфекцию у детей и взрослых. Это связано с наличием белковых энтеротоксинов, напоминающих по механизму действия холероген. ЭТКП принадлежат к сероварам O6, O8, O15, O20, O25, O27, O139 и др.

ЭПКП вызывают колиэнтериты преимущественно у детей первого года жизни. Адгезия патогена на эритроцитах происходит с участием белков наружной мембраны. В процессе развития инфекции бактерии разрушаются и освобождается эндотоксин - ЛПС, который вызывает развитие системной воспалительной реакции в тонком кишечнике больного. Колиэнтериты обусловлены ЭПКП преимущественно сероваров O44, O55, O119, O142 и др.

ЭИКП вызывают дизентериеподобные заболевания у детей и взрослых. Адгезия на эритроцитах происходит за счет капсулоподобной оболочки. Аналогично шигеллам они пенетрируют и размножаются в эритроцитах. Это приводит к гибели эритроцитов и образо-

ванию язв в толстом кишечнике. ЭИКП вырабатывают токсин, подобный токсину шигелл. ЭИКП относятся к сероварам O29, O124, O143, O144 и др.

ЭГКП (например, *E. coli* O157:H7) являются представителями микрофлоры крупного рогатого скота, овец. Они вызывают диарею с примесью крови и развитие гемолитико-уремического синдрома. Патогенез диареи связан с выработкой веротоксина двух типов, один из которых (VT-1) имеет структурное и антигенное сродство с токсином *S. dysenteriae* серовара 1, а другой (VT-2) является цитотоксином. Токсин связывается с субъединицей 60 S рибосом, блокирует синтез белка, разрушает эндотелий мелких кровеносных сосудов, вызывает поражение почек. В некоторых случаях это приводит к летальному исходу. К ЭГКП относятся бактерии сероваров O11, O145, O157.

ЭАКП (или аутоагглютинирующие *E. coli*) - плохо изученная группа. Идентификация ее представителей основывается на их способности к адгезии на поверхности клеток Нер-2. Роль ЭАКП в развитии инфекций желудочно-кишечного тракта до конца не выяснена.

Кроме диареи, *E. coli* вызывает гнойно-воспалительные заболевания различной локализации: пиелиты, циститы, холециститы, менингит новорожденных, нагноение ран и др. При выраженном иммунодефиците *E. coli* может вызывать сепсис.

**Морфология и физиология.** По морфологическим и тинкториальным свойствам *E. coli* напоминает другие энтеробактерии. Среди кишечных палочек встречаются подвижные и неподвижные варианты. Бактерии некоторых штаммов имеют капсулу или микрокапсулу и формируют на плотной среде колоний в S- и R-формах. *E. coli* - факультативный анаэроб, хорошо растет на обычных питательных средах при слабоще-

лочном значении рН и оптимальной температуре 37°C.

Кишечная палочка обладает высокой ферментативной активностью, утилизирует ацетат в качестве единственного источника углерода. Большинство штаммов ферментируют лактозу с образованием кислоты и газа, что является одним из основных признаков при конструировании дифференциально-диагностических сред.

**Антигены.** *E. coli* имеет сложную антигенную структуру. Схема ее типирования основана на вариабельности соматических О-антигенов, жгутиковых Н-антигенов и капсульных (поверхностных) К-антигенов.

О-антигены имеют сходную химическую структуру и связаны с ЛПС клеточной стенки. О-антигены определяют серологическую группу эшерихий. В настоящее время описано около 170 О-серогрупп *E. coli*. Эшерихии разных О-серогрупп в большинстве своем характеризуются перекрестными антигенными связями. Около 100 серогрупп кишечной палочки имеют перекрестнореагирующие антигены с шигеллами, сальмонеллами и другими энтеробактериями.

У эшерихий описано 50 Н-антигенов, которые типоспецифичны. Н-антигены имеются только у жгутиковых форм бактерий и состоят преимущественно из белка флагеллина.

Эшерихии содержат около 97 К-антигенов, которые подразделены на три типа - А, В и L. Они различаются чувствительностью к нагреванию и химическим веществам. К-антигены способны маскировать О-антигены, которые можно выявить только после разрушения первых кипячением культуры.

Антигены *E. coli* обозначают антигенными формулами, указывающими на серогруппу, например, *E. coli* 026:К 60 (В6), или серовар *E. coli* 026:К 60 (В6) : Н<sub>2</sub>.



Патогенность эшерихий для людей связана с определенными серогруппами.

**Лабораторная диагностика** эшерихиозов основана на бактериологическом анализе биоматериала (испражнений, рвотных масс, желчи, мочи, дуоденального содержимого, крови и др.). Исследование проводится по стандартной схеме с целью выделения культуры, ее идентификации по морфологическим и биохимическим признакам и определения серовара возбудителя.

Для посева исследуемого материала используют селективно-дифференцирующие среды: Плоскирева, Левина, Эндо, Аселя-Либермана. С целью выделения и идентификации энтерогеморрагической кишечной палочки *E. coli* O157:H7 материал от больных неосложненными диареями, острыми кишечными инфекциями с гемоколитом и гемолитико-уремическим синдромом засевают на питательную среду Сорбитол *E. coli* O157:H7 (агар) и в соотношении 1:5 - в среды накопления (бульон лактозный с бриллиантовым зеленым и желчью). Посевы инкубируют при 37°C в течение 18-20 ч. Колонии патогенных и непатогенных эшерихий не различаются и имеют на среде Эндо круглую форму, ровный край, матовую поверхность и малиново-красный цвет; на среде Левина - темно-синий цвет; на среде Аселя-Либермана - розовую окраску при неизменности других признаков. Из 10 подозрительных колоний берут часть материала для оксидазной пробы, микроскопии и ориентировочной РА с поливалентными ОК-антисыворотками, Ig и адсорбированными О-сыворотками. При положительных результатах колонии пересевают на среду Клигlera (Олькеницкого, Ресселя) для выделения и дальнейшего изучения чистой культуры.

При просмотре посевов исследуемого материала на

чашках с Сорбитол *E. coli* O157:H7 агаром отбирают колонии средней величины, выпуклые, круглые, влажные, прозрачные, бесцветные (сорбитолотрицательные колонии). Если на чашках выросли 1-2 сорбитолотрицательные колонии, то серологические реакции ставят после посева на одну из сред первичной дифференциации (Клиглера, Олькеницкого, Ресселя). В случае роста однотипной культуры материал с 3-5 колоний серологически идентифицируют на стекле с О- и Н-сыворотками к антигенам *E. coli* O157:H7 и не менее 5 сорбитол-отрицательных колоний пересевают на среду первичной дифференциации для последующего изучения.

Биохимическую активность выделенной культуры определяют с помощью стандартных наборов или проводят идентификацию на минимальном дифференцирующем ряду. Изучают образование индола, ставят реакции с метиловым красным и Фогеса-Проскауэра, определяют характер роста на цитратных агарах Симонса или Кристенсена, среде с малонатом, агаре с фенилаланином, средах с аминокислотами, на среде с 10% лактозы. Характерной особенностью энтерогеморрагических кишечных палочек *E. coli* O157:H7, в отличие от других *E. coli*, является отсутствие способности продуцировать β-D-глюкуронидазу (95% штаммов) и расщеплять сорбитол. По другим биохимическим свойствам штамм *E. coli* O157:H7 практически не отличается от *E. coli* (табл. 8).

Таблица 8  
Основные биохимические свойства *E. coli*

Тест или субстрат	Наименование штаммов	
	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> O157: H7
1	2	3
Сорбитол	+	-

β-D-глюкуронидаза	+	-
Цитрат Симонса	-	-
Мочевина	-	-
Малонат натрия	-	-
Сероводород	-	-
Фенилаланиндезаминаза	-	-
Ацетат натрия	+	+
Рамноза	±	±
Глюкоза (газ)	+	+
Лактоза	±	+
Сахароза	±	±
Арабиноза	+	+
Маннит	+	+
Адонит	-	-
Инозит	-	-
Дульцит	±	(±)
Салицин	±	(±)
Рафиноза	±	±
Ксилоза	±	+
β-D-галактозидаза	+	+
Орнитиндекарбоксилаза	±	+
Лизиндекарбоксилаза	+	+
Аргининдегидролаза	±	-
Индол	+	+
Реакция с метиловым красным	+	+
Реакция Фогеса-Проскауэра	-	-

*Примечание:*

+ *положительный ответ*

- *отрицательный ответ*

± *признак непостоянный*

(±) – *признак непостоянный, реакция замедленная*

Кроме изучения биохимической активности, проводят определение подвижности, антигенной структуры бактерий и вирулентности выделенной культуры.

Токсигенность *E. coli* изучают на клетках почек мы-

шей линии Y-1 или методом иммунопреципитации, инвазивность - на культурах клеток Нер-2, адгезивные свойства - на культурах клеток Нер-2, HeLa. Для обнаружения патогенных *E. coli* используются метод ДНК-ДНК гибридизации и полимеразная цепная реакция.

При выделении *E. coli* O157 или *E. coli* O157:H7 определяют способность их продуцировать веротоксины (VT-1, VT-2). Для выявления веротоксинов предложен ряд методов: реакция пассивной латексной агглютинации, иммуноферментный анализ, биологическая проба на белых мышах, цитопатическая активность в отношении культуры клеток HeLa или почечных клеток Vero, полимеразная цепная реакция.

### 6.3. Шигеллезы

Бактерии рода *Shigella* являются возбудителями дизентерии, или шигеллеза, поражающей, главным образом, толстый кишечник. Дизентерия характеризуется общей интоксикацией организма и «кровавым поносом».

Дизентерия - полиэтиологическое заболевание. Род *Shigella* включает четыре вида: *S. dysenteriae* (серогруппа А), *S. flexneri* (серогруппа В), *S. boydii* (серогруппа С), *S. sonnei* (серогруппа D). Три первых вида подразделены на серовары, а *S. flexneri* - еще и на подсеровары.

**Морфология и физиология.** По морфологическим свойствам шигеллы мало отличаются от эшерихий, неподвижны, клетки некоторых штаммов имеют пили. Возбудителя дизентерии - хемоорганотрофы, не требовательны к питательным средам. Температурный оптимум – 37°C. При выделении из организма больных микроб на плотных средах формирует, как правило, S-формы колоний. Шигеллы вида *S. sonnei* образуют два типа колоний: мелкие круглые выпуклые

- S-формы (I фаза) и крупные плоские - R-формы (II фаза). Характер колоний зависит от наличия (I фаза) или отсутствия (II фаза) плазмиды м.м. 120 мДа, которая определяет также вирулентность шигелл Зонне. Бактерии I фазы при пересевах образуют колонии обоих типов. Шигеллы разлагают углеводы с образованием кислоты, в некоторых случаях - кислоты и газа, но не ферментируют лактозу (за исключением *S. sonnei*). Не образуют лизиндекарбоксилазу и аргининдигидролазу. Дифференциальные признаки рода *Shigella* представлены в таблице 9.

Таблица 9

Основные биохимические свойства бактерий рода *Shigella*

Ферментация	глюкозы (газ)	-
	лактозы	-
	сахарозы	-
	маннита	±
	дульцита	±
	салицина	-
	адонита	-
	инозита	-
Образование индола		±
Образование сероводорода		-
Реакция с метиловым красным		+
Реакция Фогеса-Проскауэра		-
Дезаминирование фенилаланина		-
Гидролиз мочевины		-
Гидролиз желатина		-
Рост на среде с KCN		-
Утилизация цитрата аммония		-
Утилизация малоната Na		-

*Примечание:*

+ *положительный ответ;*

- *негативный ответ*

± *признак непостоянный*

**Антигены.** Шигеллы имеют сложную антигенную

структуру. В составе их клеточных стенок имеется О-, а у бактерий некоторых видов (*S. flexneri*) и К-антигены. О-антигены различаются по специфичности: общие для семейства *Enterobacteriaceae*, родовые, видовые, групповые, типоспецифические. В классификации учитываются только групповые и типоспецифические О-антигены. В соответствии с этим род *Shigella* подразделяется на 4 подгруппы и включает 44 серотипа.

В подгруппу А (вид *S. dysenteriae*) включены шигеллы, не ферментирующие маннит. Вид включает 12 серотипов (1-12).

К подгруппе В (вид *S. flexneri*) относятся шигеллы, обычно ферментирующие маннит, содержащие типоспецифические антигены (I-VI), по которым подразделяются на серотипы (1-6). Кроме того, они содержат групповые антигены, по которым серотипы подразделяются на подсеротипы. Этот вид включает два антигенных варианта - Х и Y. Серотип *S. flexneri* 6 не имеет подсеротипов, но его разделяют на 3 биохимических типа по особенностям ферментации глюкозы, маннита и дульцита (биотипы Бойд 88, Манчестер, Ньюкасл).

К подгруппе С (вид *S. boydii*) относятся шигеллы, обычно ферментирующие маннит. Вид включает 18 серотипов (1-18), каждый из которых имеет свой главный типовой антиген.

В подгруппу Д (вид *S. sonnei*) входят шигеллы, обычно ферментирующие маннит и способные медленно (через 24 ч и позже) разлагать лактозу и сахарозу. Вид *S. sonnei* включает один серотип, однако колонии I и II фаз обладают своими типоспецифическими антигенами. Для внутривидовой классификации шигелл Зонне предложено два метода: а)

деление их на 14 биохимических типов и подтипов по способности ферментировать мальтозу, рамнозу и ксилозу; б) деление на фаготипы по чувствительности к набору соответствующих фагов.

Эти способы типирования имеют, главным образом, эпидемиологическое значение.

### **Серологическая идентификация шигелл**

Исследование антигенной структуры культуры начинают с ОРА на стекле со смесью № 1, в которую входят адсорбированные поливалентные сыворотки к *S. flexneri* 1-5, *S. sonnei*, *S. flexneri* 6. При положительной РА со смесью № 1 выделенную культуру агглютинируют отдельно каждой моносывороткой. Положительная реакция агглютинации с адсорбированной сывороткой к *S. sonnei* дает право дать ответ. Для установления серотипа и подсеротипа *S. flexneri* необходимо дополнительно поставить РА с серотипоспецифическими (к антигенам I, II, III, IV, V, VI), а затем с групповыми (3, 4, 6, 7, 8) сыворотками.

При отсутствии агглютинации со смесью № 1 ставят реакцию агглютинации с другими адсорбированными поливалентными сыворотками, при этом учитывают отношение изучаемой культуры к манниту. Так, культуры, не расщепляющие маннит, исследуют с адсорбированными поливалентными сыворотками к *S. dysenteriae*; расщепляющие маннит – с адсорбированными поливалентными сыворотками к *S. boydii*.

При наличии агглютинации выделенную культуру исследуют серотипоспецифическими сыворотками, обращая внимание на индолообразование. *S. boydii* сероваров 5, 7, 9, 11, 13, 15, 16, 17 и *S. dysenteriae* 2, 7, 8 сероваров способны образовать индол, у бактерий остальных серотипов это свойство отсутствует.

Таблица 10

Схема определения биоваров *S. sonnei*

(по Солодовникову Ю.П. и др., 1971)

Биовар	Ферментация углеводов		
	Рамноза	Ксилоза	Мальтоза
I a	+ (1)	-	+ (1-2)
I b	+ (1)	-	+ (> 2)
II g	+ (>1)	-	+ (1-2)
II e	+ (>1)	-	+ (> 2)
III d	+ (1)	+ (1)	+ (1-2)
III c	+ (1)	+ (1)	+ (> 2)
IV f	+ (1)	+ (2 и позже)	+ (1 и позже)

*Примечание:*

+ ферментация (в скобках указанные сроки ферментации в днях);

- отсутствие ферментации

**Лабораторная диагностика.** Основным материалом для бактериологического исследования на дизентерию служат испражнения больного, которые засевают на дифференциально-диагностические среды (Плоскирева, Левина и др.) с последующим выделением чистой культуры и ее идентификацией на средах пестрого ряда и по антигенным свойствам для определения вида и серовара. Посевы просматривают через 18-20 ч после первичного высева. На средах Плоскирева и Эндо шигеллы формируют бесцветные (не ферментируют лактозу) прозрачные или полупрозрачные круглые выпуклые с ровным краем (S-формы) колонии диаметром 1-4 мм. Для *S. sonnei* характерно наличие колоний в R-форме (с зазубренным краем). При микроскопии выявляют грамотрицательные короткие палочки. Подозрительные колонии пересевают в пробирки со средами Ресселя, Клиглера или Олькеницкого. С каждой чашки снимают не менее трех колоний.



При проведении массовых обследований лактозонегативные бесцветные колонии, выросшие на любой из используемых сред, исследуют в ориентировочной реакции агглютинации со смесью видовых дизентерийных сывороток.

На 3-й день учитывают изменения в комбинированных средах, проводят серологическую идентификацию. Отбирают культуры, не ферментирующие лактозу и мочевины, но разлагающие глюкозу, и засевают их на полужидкие среды Гисса с маннитом, мальтозой, лактозой, сахарозой, 1%-ную пептонную воду с индикаторными бумажками на индол и сероводород и в пробирку с 0,3%-ным питательным агаром для изучения подвижности. При необходимости проводят другие биохимические тесты. Ставят пробу с поливалентным дизентерийным бактериофагом и ориентировочную реакцию агглютинации с адсорбированными дизентерийными сыворотками. Если выделенная культура, обладающая биохимическими признаками шигелл, не реагирует с сыворотками, то ее следует прокипятить в течение 30 мин, т.к. многие шигеллы (особенно серогрупп А и С) обладают термолабильными антигенами, ингибирующими взаимодействие антител с О-антигенами. При необходимости определяют чувствительность выделенной культуры к антибиотикам.

На 4-й день исследования учитывают результаты посевов предыдущего дня.

Кроме проведения бактериологического анализа на дизентерию, для обнаружения антигенов возбудителя в крови, моче и испражнениях могут быть использованы следующие серологические реакции: РПГА, РСК, реакция коаггутинации, а также ИФА и ПЦР. Эти методы высокоэффективны, специфичны, пригодны

для ранней диагностики.

Для серологической диагностики используют РПГА с соответствующими эритроцитарными диагностикумами, НМФА, реакцию Кумбса. Диагностическое значение имеет также аллергическая проба.

#### 6.4. Сальмонеллезы

Род *Salmonella* получил название в честь американского микробиолога Сальмона (Salmon). Заболевания, вызываемые сальмонеллами, развиваются преимущественно в результате употребления инфицированных пищи и воды. Природный резервуар большинства возбудителей - человек и различные животные, в том числе пресмыкающиеся, земноводные, рыбы и птицы. Сальмонеллы вызывают брюшной тиф, паратифы, гастроэнтероколиты, септицемию. Бактерии некоторых видов являются возбудителями внутрибольничного сальмонеллеза.

В настоящее время род *Salmonella* включает два вида: *S. salamae* и *S. choleraesuis*, два одноименных подвида, из которых первый содержит около двух тысяч сероваров, а второй - четыре серовара: *S. typhi*, *S. paratyphi A*, *S. gallinarum*, *S. pullorum*.

**Морфология и физиология.** Сальмонеллы - мелкие грамотрицательные палочки, окруженные микрокапсулой, подвижны за счет перитрихально расположенных жгутиков. Температурный оптимум для их роста - 35-37 °С. Оптимум pH - 7,2-7,4. На питательных средах большинство сальмонелл образует мелкие (2-4 мм) прозрачные голубоватые S-формы колоний. На агаре Эндо они розоватые, прозрачные; на агаре Плоскирева - бесцветные и выглядят более плотными и мутноватыми; на висмут-сульфитном агаре - черные с металлическим блеском, окружены

черным гало (*S. paratyphi A*, *S. choleraesuis*, *S. abortusovis*, *S. gallinarum-pullorum* образуют светлые зеленоватые колонии), среда под колониями также окрашена в черный цвет. Следует помнить, что компоненты висмут-сульфитного агара ингибируют рост возбудителя брюшного тифа. Сальмонеллы могут формировать также переходные и шероховатые тусклые и сухие R-колонии с неровными краями.

Сальмонеллы отличаются от *E. coli* меньшей ферментативной активностью. При ферментации глюкозы и ряда других углеводов образуют кислоту и газ (за исключением *S. typhi* и некоторых других серотипов), обладают лизин- и орнитиндекарбоксилазами, не имеют фенилаланиндезаминазы, растут на голодном агаре с цитратом (кроме *S. typhi*), не ферментируют лактозу (кроме *S. arizonae*, *S. diarizonae*), не образуют индола, не имеют уреазы, дают отрицательную реакцию Фогеса-Проскауэра.

**Антигены.** Сальмонеллы содержат O- (соматические), H- (жгутиковые) и некоторые - K- (капсульный) антигены. H-антигены могут существовать в двух разных фазах: специфической 1-й фазе и менее специфической, или групповой, 2-й фазе. Анализ антигенного строения является обязательным элементом микробиологической диагностики сальмонеллезов и проводится по схеме Ф. Кауфмана и П. Уайта, в основу которой положена общность O-антигена сальмонелл, объединенных в серологические группы: А, В, С, D, Е, F и т.д. Всего известно около 65 серогрупп, в которых O-антигены обозначены цифрами. В сокращенном варианте эта схема представлена в таблице 11.

Таблица 11

Классификация сальмонелл по антигенной структуре  
(в сокращенном варианте)

Серогруппа, вид или серовар	О-антиген	H-антиген	
		фаза 1	фаза 2
1	2	3	4
1	2	3	4
Серогруппа А			
<i>S. paratyphi</i> А	1,2,12	a	(1,5)
Серогруппа В			
<i>S. schottmuelleri</i>	1,4, (5), 12	b	1,2
<i>S. abony</i>	1,4, (5), 12	b	e,n,x
<i>S. typhimurium</i>	1,4, (5), 12	i	1,2
<i>S. derby</i>	1,4, (5), 12	f,g	(1,2)
<i>S. wien</i>	1,4,12,27	b	1,w
<i>S. haifa</i>	1,4, (5), 12	z	1,2
<i>S. heidelberg</i>	1,4, (5), 12	r	1,2
Серогруппа С			
<i>S. hirschfeldii</i> ( <i>S. paratyphi</i> С)	6,7,(Vi)	c	1,5
<i>S. choleraesuis</i>	6,7	c	1,5
<i>S. montevideo</i>	6,7	m,s,(p)	-
<i>S. leopoldville</i>	6,7	b	1,5
<i>S. bonn</i>	6,7	1,v	-
Серогруппа D			
<i>S. typhi</i>	9,12	d	-
<i>S. enteritidis</i>	1,9,12	g,m	(1,7)
<i>S. dublin</i>	1,9,12	g,p	-
<i>S. rostock</i>	1,9,12	g,p,u	-
<i>S. moscow</i>	9,12	b,g	-
<i>S. gallinarum</i>	1,9,12	s,q	-
Серогруппа Е			
<i>S. london</i>	3,10	1,v	1,6
<i>S. anatum</i>	3,10	e,h	1,6
<i>S. amsterdam</i>	3,10	g,m,s	-
<i>S. zanzibar</i>	3,10	k	1,5

К факторам вирулентности *S. typhi* относится Vi-антиген, представляющий собой капсульный полисахарид, защищающий микроб от фагоцитоза и комплемента. У подавляющего большинства других

сальмонелл Vi-антиген отсутствует.

Определение сероварианта сальмонелл (серологическая идентификация) по схеме Кауфмана-Уайта

Выделенную культуру исследуют в ориентировочной реакции агглютинации на стекле с сальмонеллезной поливалентной сывороткой ABCDE. При положительном результате переходят к расшифровке сероварианта.

Определение антигенной структуры начинают с выявления O-антигена. На крышку от чашки Петри наносят пастеровскими пипетками капли сывороток, содержащих антитела против основных соматических антигенов 2, 4, 6, 9 групп A, B, C, D, соответственно. Если с одной из сывороток наступит агглютинация (например, 0-4), дальнейшее определение вида осуществляют сыворотками против жгутиковых антигенов (H) в специфической фазе в пределах установленной группы (0-4 группы B). Для агглютинации O-сывороткой следует брать верхнюю часть выросшей культуры на скошенном агаре, а для агглютинации H-сыворотками – из конденсата или из самой нижней части роста. После установления принадлежности культуры к тому или иному виду определяют полную структуру O-антигенов и H-антигена и таким образом устанавливают антигенную формулу (серovar) выделенной культуры. При отсутствии реакции агглютинации с поливалентной адсорбированной O-сывороткой к сальмонеллам групп ABCDE культуру испытывают с поливалентной сывороткой, включающей антитела к антигенам сальмонелл редких групп.

**Лабораторная диагностика.** Основу лабораторной диагностики заболеваний, вызываемых сальмонеллами, выявления носительства, изучения обсемененности объектов окружающей среды, инфицированности пищевых продуктов составляет бактериологическое ис-

следование материала по стандартной схеме.

При проведении лабораторной диагностики тифо-паратифозных заболеваний учитывают патогенетические особенности этих инфекций, связанные с локализацией возбудителя в лимфоидной ткани внутренних органов, крови, желчи и выделением его с испражнениями и мочой. В первые дни заболевания выделяют гемокультуру путем посева крови в соотношении 1:10 в жидкие питательные среды, например, желчную среду Рапопорт. Накопительные среды с желчью являются селективными для возбудителей тифо-паратифозных заболеваний. Другие бактерии на них не растут или рост их замедлен. Желчь препятствует свертыванию крови, нейтрализует нормальные антитела сыворотки, разрушает комплемент и тем самым снижает бактерицидные свойства крови при сохранении ее питательных свойств, а также препятствует действию бактериофага. Результаты посевов крови на среде Рапопорт учитывают через 18-24 ч, изучают характер роста. При брюшном тифе среда Рапопорт окрашивается в красный цвет вследствие ферментации глюкозы, при паратифах А и В дополнительно выявляют газообразование. При отсутствии роста на среде Рапопорт посева продолжают инкубировать и просматривают через 48, 72 ч, на 5-е и 10-е сутки. При наличии роста, после проверки на однородность выросшей культуры микроскопией окрашенного по Граму мазка, делают высев на дифференциально-диагностические среды. На 2-ой неделе заболевания выделяют копро- или уринокультуру после посева фекалий и мочи на обогатительные и дифференциально-диагностические среды. Выделенную культуру идентифицируют по биохимическим и антигенным свой-

ствам. Из крови часто высеивается брюшнотифозная культура, содержащая Vi-антиген, которая не агглютинируется O-сывороткой, т.к. Vi-антиген препятствует такой агглютинации. Если выделенный штамм не агглютинируется или агглютинируется не до диагностического (менее  $\frac{1}{2}$ ) титра, ставят реакцию агглютинации на стекле с Vi-сы-вороткой. Все культуры *S. typhi* фаготипируют с помощью набора Vi-фагов. Определяют чувствительность патогена к антибактериальным препаратам.

Для диагностики гастроэнтероколитов, возникающих в результате пищевых токсикоинфекций, для анализа отбирают испражнения, рвотные массы, промывные воды желудка, кровь, мочу, дуоденальное содержимое, секционный материал. Дополнительными объектами исследования являются остатки пищи, употреблявшейся заболевшими, исходные продукты и полуфабрикаты, корма животного и растительного происхождения, смывы с различного оборудования и предметов, предполагаемых в качестве фактора передачи возбудителя.

Окончательный диагноз пищевой токсикоинфекции устанавливают только после выделения возбудителя из организма больных людей и пищевых продуктов, его идентификации с установлением вида и серовара или биовара. Определение серовара проводят с помощью монорецепторных сывороток. Наиболее часто при токсикоинфекциях выявляют серовары *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. anatum*.

Возбудителем внутрибольничного сальмонеллеза чаще всего является *S. typhimurium*, которая может встречаться в виде трех биоваров, одинаковых по антигенной структуре, но различающихся по патогенности для белых мышей при энтеральном заражении и

по чувствительности к антибиотикам. Однако нередки заболевания, вызываемые *S. derby*, *S. heidelberg*, *S. wien*, *S. haifa* и др., которые относятся к группе В. Эти сальмонеллы по своим морфологическим, физиологическим и антигенным признакам не отличаются от возбудителей пищевых токсикоинфекций.

Как правило, сальмонеллы, выделяемые при внутрибольничной инфекции, резистентны к 15-20 антибиотикам. Это связано с наличием у них конъюгативных R-плазмид, несущих множественную устойчивость к антибиотикам. Лабораторная диагностика внутрибольничных сальмонеллезов осуществляется по общепринятой схеме.

**Серологические исследования.** Серологическую диагностику брюшного тифа и паратифов, выявление и дифференциацию различных форм носительства проводят постановкой реакции агглютинации Видаля с О- и Н-диагностикумами. Основное диагностическое значение имеет реакция с О-диагностикумом, т.к. Н-антитела появляются позже О-антител и сохраняются после болезни или прививки более длительное время. Положительная реакция Видаля только с Н-диагностикумом указывает либо на ранее перенесенное заболевание (анамнестическая реакция) либо появляется в результате вакцинации (прививочная реакция). Диагностический титр с О-антигеном - 1:200. Большое значение для диагностики имеет нарастание титров в течение болезни.

Постановка реакции Видаля

Реакцию ставят с О-монодиагностикумом и Н-тифозными, Н-паратифа А и Н-паратифа В. На каждый диагностикум готовят ряд разведений испытуемой сыворотки. Контроль сыворотки – один для всех диагностикумов (таб.12).



Таблица 12

## Постановка реакции Видала

Ингредиенты (мл)	П р о б и р к и					
	1	2	3	4	5 (КС)	6 (КА)
Физиологический раствор	-	1,0	1,0	1,0	-	1,0
Сыворотка больного (1:100)	1,0	Титровать по 1,0			1,0	-
Диагностикум <sup>x</sup> (капли)	1-2	1-2	1-2	1-2	-	1-2
Конечное разведение сыворотки	1:100	1:200	1:400	1:800	-	-

РНГА чувствительна и специфична с эритроцитарными O- и Vi-диагностикумами. Диагностическое значение имеет реакция с O-диагностикумом, т.к. антитела к Vi-антигену невысоки. Vi-антитела после полного выздоровления быстро исчезают, но при наличии брюшнотифозного носительства они присутствуют постоянно. В связи с этим РНГА с эритроцитарным Vi-диагно-стикумом применяется для выявления бактерионосительства.

Эффективным способом экспресс-диагностики сальмонеллезных и некоторых других болезней являются экспресс-тесты. Определение патогенных микроорганизмов с помощью Singlepath-тестов производства фирмы Merck (Германия) основано на методе визуальной иммунохроматографии (разновидность иммуноферментного анализа).

Singlepath-тест *Salmonella* представляет собой диагностическую панель с лункой для добавления обогащенного образца, тестовой (Т) и контрольной (С) зонами. Антигены определяемых в образце бактерий взаимодействуют с мечеными золотом антителами, включенными в состав теста, с образованием окрашенного комплекса антиген-антитело. Окрашенный комплекс связывается с иммобилизованными антителами с образованием линий в тестовом и контрольном окнах.

Схема выявления сальмонелл из образцов продуктов:

1. Неселективное обогащение на забуференной пептонной во-де (25 г образца + 225мл BPW) при 37°C в течение 18-24 ч.
2. Селективное обогащение на среде RVS - Rappaport-Vassiliadis (магниевая среда). 0,1 мл культуральной жидкости добавляют к 9,9 мл RVS среды. Инкубируют при 41°C 18-24 ч.
3. Инактивация. 2 мл культуральной жидкости прогревают на водяной бане при 100°C в течение 15 мин.
4. Singlepath-тест. В лунку диагностической панели вносят 160 мкл инаktivированной культуральной жидкости. Результаты учитывают визуально в тестовой и контрольной зонах через 20 мин.
5. Подтверждение. Высев положительных результатов на дифференциально-диагностические среды РАМ-БАХ-агар, XLD-агар или висмут-сульфитный агар.

Преимущества метода:

- Экспрессность. Результат через 20 мин.
- Надежность. Высокая чувствительность и специфичность метода (99%). Ясный и четкий положительный или отрицательный результат. Встроенный положительный контроль.
- Легко использовать. Нет необходимости в ходе исследования добавлять какие-либо реагенты. Все компоненты включены в одну тест-пластинку. Отсутствуют сложные этапы в исследовании. Одноэтапный формат теста исключает возможные ошибки.
- Удобный. Необходимо добавить образец и учесть результат.
- Экономичный. Сокращает время исследования, снижает трудозатраты, уменьшает количество пересевов.
- Нет необходимости приобретать и обслуживать до-

рогостоящее оборудование.  
Singlepath-тест одобрен Федеральным Центром Госсанэпиднадзора РФ (МР №24ФЦ/976) и разрешен к применению в лабораториях санитарно-эпидемиологической службы, осуществляющих государственный и ведомственный контроль, а также в производственных лабораториях.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ

### Занятие 1.

**Биологические свойства представителей родовых групп семейства энтеробактерий (*Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Morganella*, *Proteus*, *Yersinia*, *Edwardsiella*)**

- Изучение морфологии роста на скошенном агаре.
- Изучение морфологии микробов в мазках, окрашенных по Граму.
- Постановка пробы Gregersen с 3% КОН.
- Посев полученной культуры на среду Клиглера, в среды минимального дифференцирующего ряда, на скошенный МПА, среды Эндо, Плоскирева, ЭМС, ВСА.

*Примечания:*

- при посеве на пластинчатые среды получить рост изолированных колоний;
- здесь и в дальнейшем посевы инкубировать 18-24 ч при 37°C;
- посевы в среду Кларка и полужидкий агар дублировать и инкубировать при 37 и 22°C.

### Занятие 2.

**Биологические свойства представителей родовых групп семейства энтеробактерий (*Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Morganella*, *Proteus*, *Yersinia*, *Edwardsiella*)**

### ***Edwardsiella*)**

- Изучение морфологии колоний на дифференциально-диагностических средах.
- Изучение морфологии роста культуры в бульоне.
- Подготовка мазков из бульонной и агаровой культур, окрашивание их по Граму.
- Учет результатов роста культуры на среде Клиглера и в средах минимального дифференцирующего ряда.
- При необходимости проведение предварительной серологической диагностики испытуемой культуры.
- Предварительное заключение о родовой принадлежности изучаемой культуры.

*Примечание: при отрицательном результате реакции Фогеса-Проскауэра посева на среде Кларка инкубировать еще 18-24 ч.*

### **Занятие 3.**

**Биологические свойства представителей родовых групп семейства энтеробактерий (*Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Morganella*, *Proteus*, *Yersinia*, *Edwardsiella*).**

- Изучение морфологии 2-суточного роста культур на висмут-сульфитном агаре.
- Учет результатов роста в средах минимального дифференцирующего ряда через 48 ч.
- Постановка реакции с метиловым красным и Фогеса-Проскауэра.
- Заключение о родовой принадлежности изучаемой культуры.

### **Занятие 4.**

**Бактериологический диагноз эшерихиозов**

- Исследование испражнений больного. Посев нативного материала.
- Посев испражнения больного на 2 чашки со средой Эндо или ЭМС.

### **Занятие 5.**

#### **Бактериологический диагноз эшерихиозов**

- Исследование испражнений больного. Выделение чистой культуры.
- Просмотр первичных посевов на дифференциальных средах Эндо (ЭМС).
- Отбор различных по морфологии колонии, постановка ОРА с частью колонии с ОКА-эшерихиозной поливалентной сывороткой.
- Посев на среду Клиглера и скошенный МПА колоний (не менее трех), давших положительную ОРА.

### **Занятие 6.**

#### **Бактериологический диагноз эшерихиозов**

- Исследование испражнений больного. Идентификация выделенной культуры.
- Просмотр посевов на среде Клиглера, на скошенном МПА; выбор для дальнейшей работы посева с подозрительным ростом на *E. coli*.
- Проверка чистоты роста мазком с окраской по Граму.
- Постановка ОРА с ОКА-эшерихиозной поливалентной сывороткой, с ОКВ-, ОКС-, ОКД-, ОКЕ-эшерихиозными поливалентными сыворотками.
- Посев культуры, давшей положительную РА, в среды минимального дифференцирующего ряда, скошенный МПА.
- Определение чувствительности выделенной культуры к антибиотикам дискодиффузионным методом.

*Примечание: серологическую идентификацию культуры проводить со скошенного МПА.*

### **Занятие 7.**

#### **Бактериологический диагноз эшерихиозов**

- Исследование испражнений больного. Идентификация выделенной культуры.
- Учет результатов роста в средах минимального дифференцирующего ряда.
- Проведение серологической идентификации выделенной культуры с O-эшерихиозными групповыми и факторными сыворотками и с H-эшерихиозными сыворотками.
- Постановка РА с ОК-эшерихиозными иммуноглобулинами.
- Учет результата определения чувствительности выделенной культуры к антибиотикам.

### **Занятие 8.**

#### **Бактериологический диагноз эшерихиозов**

- Исследование испражнений больного. Окончание исследования.
- Учет РА с ОК-эширихиозными иммуноглобулинами.
- Заключение по исследованию испражнений больного.
- Заполнение паспорта на выделенную культуру.

### **Занятие 9.**

#### **Бактериологический диагноз шигеллезов**

- Исследование испражнений больного. Посев нативного материала.
- Посев испражнения больного на чашку со средой Эндо (или ЭМС) и чашку со средой Плоскирева,

чтобы получить рост изолированных колоний.

### **Занятие 10.**

#### **Бактериологический диагноз шигеллезов**

- Исследование испражнений больного. Выделение чистой культуры.
- Просмотр первичных посевов на дифференциально-диагностических средах Эндо (ЭМС) и Плоскирева.
- Отбор 3-5 подозрительных колоний, их посев на среду Клиглера и скошенный МПА.

### **Занятие 11.**

#### **Бактериологический диагноз шигеллезов**

- Исследование испражнений больного. Идентификация выделенной культуры.
- Просмотр роста на среде Клиглера, скошенном МПА.
- Отбор посевов с подозрительным ростом на возбудителя дизентерии.
- Проверка чистоты роста мазком с окраской по Граму.
- Проведение ориентировочной серологической диагностики выделенной культуры.
- Посев изучаемой культуры в среды минимального дифференцирующего ряда, на скошенный МПА, при подозрении на возбудителя дизентерии *S. Sonnei* - в среды Гисса с рамнозой, ксилозой и мальтозой.
- Постановка пробы с поливалентным дизентерийным бактериофагом.
- Определение чувствительности выделенной культуры к антибиотикам дискодиффузионным методом.

*Примечание: - посевы инкубируют 18-24 ч.*

### **Занятие 12.**

#### **Бактериологический диагноз шигеллезов**

- Исследование испражнений больного. Идентификация выделенной культуры.
- Учет результата роста культур в средах минимального дифференцирующего ряда.
- Определение биовара выделенной культуры для *S. sonnei*.
- Учет пробы с поливалентным бактериофагом.
- Учет чувствительности выделенной культуры к антибиотикам.
- Проведение серологической идентификации выделенной культуры.
- Заключение по исследованию испражнений больного.
- Заполнение паспорта на выделенную культуру.

### **Занятие 13.**

#### **Бактериологический диагноз сальмонеллеза**

- Исследование испражнений больного. Посев нативного материала.
- Посев испражнения больного на чашку со средой Плоскирева и чашку ВСА.
- Посев испражнения больного в среду обогащения (магниевою).
- Исследование крови больного. Посев нативного материала.
- Посев крови больного в среду Рапопорт.

### **Занятие 14.**

#### **Бактериологический диагноз сальмонеллеза**

- Исследование испражнений больного. Выделение чистой культуры.
- Высев со среды обогащения на чашку ВСА.
- Просмотр первичных посевов на дифференциальных средах Плоскирева и ВСА (первые сутки).



- Посев подозрительных на сальмонеллы колоний на среду Клиглера и скошенный МПА.
- Исследование крови больного. Высев со среды накопления.
- Изучение роста в среде Рапопорт.
- Приготовление мазка с окраской по Граму.
- Приготовление раздавленной капли для изучения подвижности.
- Высев со среды Рапопорт на одну из дифференциальных сред: Плоскирева, Эндо или ЭМС и скошенный МПА.
- Серологическая диагностика тифо-паратифозных заболеваний и бактерионосительства.
- Постановка реакции Видаля с сывороткой крови больного.
- Постановка РПГА с сывороткой крови предполагаемого бактерионосителя и эритроцитарным Vi-диагностикумом.

## **Занятие 15.**

### **Бактериологический диагноз сальмонеллеза**

- Исследование испражнений больного. Идентификация выделенной культуры.
- Просмотр посевов на среде Клиглера, скошенном МПА, ВСА (вторые сутки).
- Отбор посевов с подозрительным ростом на сальмонеллы.
- Проверка культуры на чистоту роста мазком с окраской по Граму.
- Постановка ОРА с поливалентной сальмонеллезной сывороткой ABCDE.
- Посев изучаемой культуры в среды минимального дифференцирующего ряда, на скошенный МПА.

- Постановка пробы с сальмонеллезным бактериофагом.
- Определение чувствительности выделенной культуры к антибиотикам дискодиффузионным методом.
- Просмотр посевов со среды обогащения на ВСА (первые сутки).
- Исследование крови больного. Выделение чистой культуры и идентификация выделенной культуры.
- Просмотр посевов на среде Плоскирева, ЭМС (высев со среды Рапопорт).
- Посев подозрительных на сальмонеллы колоний на среду Клиглера, скошенный МПА.
- Проверка культуры на чистоту роста на скошенном агаре мазком с окраской по Граму.
- Постановка ОРА с поливалентной сальмонеллезной сывороткой ABCDE.
- Посев изучаемой культуры в среды минимального дифференцирующего ряда, на скошенный МПА.
- Постановка пробы с сальмонеллезным бактериофагом.
- Определение чувствительности выделенной культуры к антибиотикам дискодиффузионным методом.
- Серологическая диагностика тифо-паратифозных заболеваний и бактерионосительства.
- Учет реакции Видаля с сывороткой больного, выдача результатов исследования.
- Учет РПГА с сывороткой крови брюшнотифозного бактерионосителя и эритроцитарным Vi-диагностиком, выдача результатов исследования.

## **Занятие 16.**

### **Бактериологический диагноз сальмонеллеза**

- Исследование испражнений и крови больного. Окончание исследования.
- Учет результатов роста культур в средах минималь-

- ного дифференцирующего ряда, на скошенном МПА.
- Учет пробы с сальмонеллезным бактериофагом.
  - Серологическая идентификация выделенной культуры по схеме Кауфмана-Уайта.
  - Учет чувствительности выделенной культуры к антибиотикам.
  - Заключение, выдача результата исследования испражнений больного.
  - Заполнение паспорта на выделенные культуры.

### **Занятие 17 (демонстрационное).**

#### **Определение генотипа, ассоциированного с патогенностью *salmonella* sp., методом полимеразной цепной реакции**

В качестве одной из стабильных и перспективных мишеней в ДНК сальмонелл при использовании молекулярно-диагностических методов экспресс-диагностики (ПЦР и ДНК-зондирование) и анализа потенциальной патогенности штаммов выбран и используется фрагмент гена инвазивности *inv*, расположенный в пределах «острова патогенности» SP-I на хромосоме бактерий *Salmonellae* sp. Наличие данного гена (или всего «острова патогенности») у тестируемого штамма свидетельствует о наличии у него инвазивных свойств и потенциальной патогенности.

- Приготовление суспензии  $10^7$  КОЕ/мл в дистиллированной  $H_2O$  из «чистой» культуры анализируемых штаммов сальмонелл.
- Проведение термоинактивации и экстракции тотальной ДНК сальмонелл путем прогревания суспензии микробов при  $100\text{ }^\circ\text{C}$  в течение 15 мин.
- Приготовление 1,4% агарозного геля и трис-боратного буфера для гель-электрофореза.
- Осуществление программирования амплификато-

ра «Терцик» для ПЦР-детекции гена инвазивности (inv) сальмонелл.

- Подготовка реакционной смеси для постановки ПЦР и осуществление амплификации проб на термоциклере.
- Выполнение гель-электрофореза ампликонов и учет результатов ПЦР.
- Предварительное заключение о патогенности изучаемой культуры.

ПЦР проводят только в одноразовых микропробирках с использованием одноразовых наконечников для внесения всех компонентов амплификационной смеси. Устанавливают в штатив и маркируют пробирки для амплификации по числу исследуемых проб и две дополнительные пробирки (положительный и отрицательный контроли).

На одну пробу объемом 25 мкл готовят амплификационную смесь следующего состава:

1. 2 мкл 10x ПЦР-буфера;
2. 1 мкл 2,5 mM раствора дНТФ;
3. 1 мкл БСА;
4. Дистиллированная вода до - 20 мкл;
5. 5-10 пкм каждого праймера (по 1 мкл);
6. 0,2 мкл Taq-ДНК-полимеразы.

Приготавливают общую амплификационную смесь на все число проб и две пробы (положительный и отрицательный контроли). Перемешивают полученную смесь пипетированием и вносят в амплификационные пробирки по 20 мкл в каждую. Исследуемые образцы тотальной ДНК сальмонелл в количестве 5 мкл вносят в амплификационные смеси с помощью отдельных наконечников для каждого образца, после чего смесь перемешивают пипетированием и наслаивают 40-50 мкл вазелинового масла (три капли из наконечника

объемом 200 мкл). В качестве положительного контроля применяют 2 мкл образца ДНК, экстрагированной методом кипячения из суспензии клеток штаммов *S. typhimurium* 4244 или другого вирулентного тест-штамма сальмонелл, с концентрацией  $1 \cdot 10^7$  КОЕ. В качестве отрицательного контроля используют 5 мкл дистиллированной воды. Пробирки закрывают и помещают в амплификатор со следующей температурно-временной программой:

«горячий» старт – 94°C - 3 мин, затем 35 циклов: денатурация при температуре 94°C - 1 мин, «отжиг» 50°C - 1 мин, элонгация цепи при 72°C - 1 мин; завершающий этап при 72°C - 5 мин.

После амплификации препараты смешать с 3 мкл лидирующего красителя - бромфенолового синего. Для проведения электрофореза используется заранее приготовленный 1,4% агарозный гель. Гель-электрофорез проводится в трис-боратной буферной системе в течение 30 мин при напряжении 10 в/см. Визуализацию продуктов ПЦР осуществляют окрашиванием геля в течение 10 мин бромистым этидием в концентрации 0,5 мкг/мл и видеорегистрацией результатов электрофореза цифровой камерой при помощи УФ-трансиллюминатора с длиной волны 260-300 нм.

В положительных образцах должна наблюдаться интенсивно окрашенная полоса ампликонов ДНК, соответствующая размеру 240 п.н.

## 6.5. Приложение

### **Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам диско-диффузионным методом**

При тестировании микроорганизмов семейства *Enterobac-teriaceae* рекомендуется использовать от-

дельные наборы антибактериальных препаратов (АБП) для определения чувствительности возбудителей:

- внекишечных инфекций (кроме инфекций мочевыводящих путей);
- кишечных инфекций (*Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Escherichia* spp.);
- внебольничных инфекций мочевыводящих путей.

Готовят взвесь 18-20-часовой культуры в изотоническом растворе хлорида натрия, содержащей примерно  $1,5 \times 10^8$  КОЕ/мл. Инокулят в объеме 1 мл наносят на поверхность агаровой среды и равномерно распределяют путем покачивания чашки. Избыток жидкости удаляют пипеткой. Приоткрытые чашки подсушивают 10-15 мин. Стандартные диски с антибиотиками накладывают с помощью пинцета на расстоянии 2 см от края чашки. На одну чашку следует помещать не более 6 дисков. Инкубация 18-20 ч при 37°C, при 35°C - если использованы диски с цефалоспоридами и их комбинациями с клавулановой кислотой.

Результаты учитывают, измеряя диаметр зон задержки роста с точностью до 1 мм.

Интерпретация результатов оценки антибиотикочувствительности заключается в отнесении исследуемого микроорганизма к одной из трех категорий: резистентный (Р), промежуточный (П) и чувствительный (Ч) согласно таблице 13.

Таблица 13

Критерии интерпретации результатов определения чувствительности

*Enterobacteriaceae*: пограничные значения диаметров зон подавления роста (мм) и МПК (мг/л) АБП

Антибактериальные препараты	Содержание в диске (мкг)	Диаметр зон подавления роста (мм)			МПК (мг/л)		
		Р	П	Ч	Р	П	Ч

1	2	3	4	5	6	7	8
<b>БЕТА-ЛАКТАМЫ</b>							
Ампициллин	10	≤13	14-16	≥17	≥32	16	≤8
Ампициллин/ сульбактам	10/10	≤11	12-14	≥15	≥32/16	16/8	≤8/4
Амоксициллин/ клавуланат	20/10	≤13	14-17	≥18	≥32/16	16/8	≤8/4
Тикарциллин/ клавуланат	75/10	≤14	15-19	≥20	≥128/2	32/2- 64/2	≤16/2
Цефалотин	30	≤14	15-17	≥18	≥32	16	≤8
Цефазолин	30	≤14	15-17	≥18	≥32	16	≤8
Цефаклор	30	≤14	15-17	≥18	≥32	16	≤8
Цефамандол	30	≤14	15-17	≥18	≥32	16	≤8
Цефуросим Na	30	≤14	15-17	≥18	≥32	16	≤8
Цефуросим аксетил	30	≤14	15-22	≥23	≥32	8-16	≤4
Цефокситин	30	≤14	15-17	≥18	≥32	16	≤8
Цефотетан	30	≤12	13-15	≥16	≥64	32	≤16
Цефметазол	30	≤12	13-15	≥16	≥64	32	≤16
Цефоперазон	75	≤15	16-20	≥21	≥64	32	≤16
Цефотаксим	30	≤14	15-22	≥23	≥64	16-32	≤8
Цефтриаксон	30	≤13	14-20	≥21	≥64	16-32	≤8
Цефтазидим	30	≤14	15-17	≥18	≥32	16	≤8
Цефиксим	5	≤15	16-18	≥19	≥4	2	≤1
Цефподоксим	10	≤17	18-20	≥21	≥8	4	≤2
Цефтибутен	30	≤17	18-20	≥21	≥32	16	≤8
Цефепим	30	≤14	15-17	≥18	≥32	16	≤8
Азтреонам	30	≤15	16-21	≥22	≥32	16	≤8
Имипенем	10	≤13	14-15	≥16	≥16	8	≤4
Меропенем	10	≤13	14-15	≥16	≥16	8	≤4
Эртапенем	10	≤15	16-18	≥19	≥8	4	≤2
<b>АМИНОГЛИКОЗИДЫ</b>							
Канамицин	30	≤13	14-17	≥18	≥64	32	≤16
Гентамицин	10	≤12	13-14	≥15	≥16	8	≤4
Тобрамицин	10	≤12	13-14	≥15	≥16	8	≤4
Нетилмицин	30	≤12	13-14	≥15	≥32	16	≤8
Амикацин	30	≤14	15-16	≥17	≥64	32	≤16
<b>ХИНОЛОНЫ</b>							
Налидиксовая кислота	30	≤13	14-18	≥19	≥32	-	≤16
Норфлоксацин	10	≤12	13-16	≥17	≥16	8	≤4
Перфлоксацин	5	≤15	16-21	≥22	≥8	4	≤1
Офлоксацин	5	≤12	13-15	≥16	≥8	4	≤2

Ципрофлоксацин	5	≤15	16-20	≥21	≥4	2	≤1
Ломефлоксацин	10	≤18	19-21	≥22	≥8	4	≤2
Левифлоксацин	5	≤13	14-16	≥17	≥8	4	≤2
Гатифлоксацин	5	≤14	15-17	≥18	≥8	4	≤2
ТЕТРАЦИКЛИНЫ							
Тетрациклин	30	≤14	15-18	≥19	≥16	8	≤4
Доксициклин	30	≤12	13-15	≥16	≥16	8	≤4
ДРУГИЕ ПРЕПАРАТЫ							
Хлорамфеникол	30	≤12	13-17	≥18	≥32	16	≤8
Ко-тримоксазол	1,25/23,75	≤10	11-15	≥16	≥4/76	-	≤2/38
Нитрофурантоин	300	≤14	15-16	≥17	≥128	64	≤32
Фосфомицин*	200	≤12	13-15	≥16	≥256	128	≤64
<i>Примечание.* Для определения МПК фосфомицина необходимо использовать метод серийных разведений в агаре. При определении чувствительности к этому антибиотику как методом серийных разведений в агаре, так и ДДМ, в питательную среду необходимо вносить 25 мг/л глюкозо-6-фос-фата.</i>							

## 7. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ХОЛЕРЫ

### 7.1. Биологические свойства холерных вибрионов

Холера – особо опасная инфекционная болезнь, с диарейным синдромом, фекально-оральным механизмом передачи возбудителя, водным, пищевым и контактно-бытовым путями распространения инфекции.

Холерные вибрионы относятся к сем. *Vibrionaceae*, роду *Vibrio*, виду *Vibrio cholerae*, который включает как патогенные, способные вызывать заболевания, склонные к эпидемическому и пандемическому распространению, так и свободноживущие в воде вибрионы, безопасные для человека или обуславливающие спорадические случаи диарей и инфекций с внекишечной локализацией возбудителя.

Холерные вибрионы грамотрицательные, аспорогенные полиморфные прямые или слегка изогнутые палочки, варьирующие в размерах (0,2-0,6 мкм в ширину и 1,5-3,0 мкм в длину), с одним полярно расположен-



ным жгутиком, благодаря которому очень подвижны.

Холерные вибрионы хорошо растут на щелочных питательных средах рН 7,6-8,6, содержащих до 2% NaCl. Оптимальная температура выращивания - 35-38 °С. На щелочных жидких питательных средах - мясо-пептонном бульоне (МПБ) и 1% пептонной воде (ПВ) - через 6-8 ч инкубирования при 37 °С наблюдается образование нежной пленки на поверхности и легкое помутнение среды. На пластинках щелочного мясо-петонного агара (МПА) холерные вибрионы в типичной S-форме через 18-24 ч выращивания образуют гладкие, прозрачные, влажные с ровным краем колонии, диаметром 2-3 мм. Могут встречаться атипичные колонии – шероховатые, мутные, пигментированные (коричневые или желтые), коккоподобные. На элективной среде TCBS на зеленом фоне среды колонии вибрионов круглые, гладкие с ровным краем, плоские, желтого цвета. При более длительной инкубации желтый цвет колоний часто переходит в зеленый цвет.

Холерные вибрионы, как и другие представители рода *Vibrio*, продуцируют индофенолоксидазу, ферментируют до кислоты без газа глюкозу в аэробных и анаэробных условиях, декарбоксилируют лизин и орнитин, не обладают дигидролазой аргинина. Холерные вибрионы относятся к 1 ферментативной группе по Хейбергу: расщепляют до кислоты сахарозу и маннозу и не разлагают арабинозу. Отношение к лактозе непостоянное. Вибрионы разжижают желатину, казеин, фибрин; вырабатывают лецитиназу, липазу, нейраминидазу, хитиназу, пенициллиназу.

*V.cholerae* по наличию специфического O-антигена распределяются на серологические группы, их более 200. Возбудителями холеры являются холерные вибрионы O1 и O139 серологических групп. Холерные

вибрионы других не O1/не O139 серологических групп могут вызывать спорадические или групповые случаи диарей, не склонные к эпидемическому распространению.

Холерные вибрионы, относящиеся к O1 серогруппе делятся на три серовара - Огава, Инаба, Гикошима. Принадлежность культур к *V. cholerae* O1 серогруппе устанавливают по результатам агглютинации видоспецифической холерной сывороткой O1. Вариантоспецифические холерные сыворотки Огава и Инаба позволяют определить соответственно серовар культуры. Холерные вибрионы, реагирующие в одинаковых титрах с сыворотками обоих вариантов – Инаба и Огава, относятся к серовару Гикошима. Типичные штаммы холерных вибрионов в S-форме агглютинируются видо- и вариантоспецифической сывороткой не меньше, чем до 1/2 титра. Культуры в R-форме взаимодействуют с холерной RO-сывороткой, при этом агглютинация с видоспецифической холерной сывороткой O1 серогруппы снижена или отсутствует совсем.

Холерные вибрионы в пределах O1 серогруппы делятся на два биовара: классический и эльтор, имеющие существенные фенотипические и генетические отличия.

При выделении атипичных культур проводят дополнительные исследования. Штаммы, агглютинирующиеся диагностическими сыворотками O1, RO, Инаба (Огава) ниже 1/2 титра или агглютинирующиеся только RO сывороткой, с полной или частичной утратой способности лизироваться диагностическими холерными бактериофагами, изучают в тестах, определяющих их принадлежность к роду *Vibrio* (табл. 14). Слабоагглютинирующиеся холерной O1 сывороткой и фагорезистентные культуры исследуют также в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА), флюорес-

центно-серологическим методом (МФА), реакцией иммобилизации вибрионов (РИВ) или адсорбцией по Кастеллани. Культуру, агглютинирующуюся сывороткой O139, относят к холерным вибрионам O139 серогруппы.

Если культура не агглютинируется холерными сыворотками O1, O139, но по совокупности признаков относится к виду холерных вибрионов, ее изучают в реакции агглютинации с набором диагностических холерных сывороток O2-O83 серогрупп по отечественной классификации. Кроме того, штаммы *V. cholerae* не O1/O139 серогрупп типируют бактериофагами диагностическими холерными ТЭПВ 1-7. Энтеропатогенные холерные вибрионы не O1 группы относятся преимущественно к O2, O5, O6, O8, O9, O14, O17, O22, O24, O28, O34, O36, O41, O42, O47, O50 серогруппам и, как правило, лизируются фагами ТЭПВ 1, 4, 7.

Таблица 14

Основные дифференциальные признаки рода *Vibrio* и некоторых других микроорганизмов

Признаки	Роды сем. Vibrionaceae							
	Vibrio		Aeromonas	Enhydrobacter	Plesiomonas	Photobacterium	Enterobacteriaceae	Pseudomonadaceae
	<i>V. cholerae</i>	др. виды						
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Окраска по Граму, морфология	Грамотрицательные полиморфные прямые или слегка изогнутые палочки							
Подвижность	+	+(-)	+(-)	-	+	+	+(-)	+
Оксидаза	+	+(-)	+	+	+	+(-)	-	+(-)
Рост на средах без NaCl	+	- (+)	+	+	+	-	-	-
Чувствительность к 0-129 <sup>1)</sup>	+	+(-)	-	-	+	+	-	-
О/Ф глюкозы в среде Хью-Лейфсона	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/-
Газ из глюкозы	-	- (+)	+(-)	-	-	+	+/-	-
Лизиндекарбоксилаза	+	+(-)	- (+)	+	+	+	+/-	- (+)

Орнитиндекарбоксилаза	+	+/-	- (+)	+	+	+	+/-	- (+)
Аргининдигидролаза	-	- (+)	+	+	+	+	-/+	+/-
Ферментация: лактозы	-	- (+)	- (+)	-	+	X	+/-	- (+)
маннита	+	+(-)	+(-)	X	-	-	+(-)	+(-)
арабинозы	-	- (+)	+(-)	X	-	-	+(-)	- (+)
сахарозы	+	+(-)	+	X	-	- (+)	+/-	-
инозита	-	- (+)	-	X	+	-	- (+)	X
Образование: ацетилметилкарбинола	+(-)	- (+)	+(-)	-	-	+	- (+)	X
индола	+	+(-)	+(-)	-	-	-	+(-)	+/-
нитратредуктазы	+	+(-)	+	+	+	+(-)	+	+/-
b-галактозидазы	+	+(-)	+	X	+	+	- (+)	X
желатиназы	+	+(-)	+	X	-	+	- (+)	+/-
Биолюминесценция	- (+)	- (+)	-	X	-	+	-	-
Мол.% G+C в ДНК	38	51	57-63	66	51	40-44	39-59	58-70

*Примечания:* <sup>1)</sup>

– бактериостатический агент 2,4-диамино-6,7-ди-изопропил-птериодин;

X - нет данных;

+ - положительный результат в 90%;

- - отрицательный результат в 90%;

+/- - положительный и отрицательный результаты встречаются в равной степени;

+(-) или -(+) - в скобках редко наблюдается результат.

Основными признаками дифференциации биоваров холерных вибрионов являются проба с холерными диагностическими фагами классическим и эльтор, реакция агглютинации с эритроцитами цыпленка или морской свинки, тест на чувствительность к 50 ед/мл полимиксина и образование ацетилметилкарбинола в реакции Фогес-Проскауэра (табл. 15).

Таблица 15

Дифференциальные признаки биоваров *V. cholerae* O1

Признаки	Биовары	
	<i>V. cholerae cholerae</i>	<i>V. cholerae eltor</i>

Лизабельность холерными фагами: классический	+	-
эльтор	-(+)	+/-
Агглютинация эритроцитов	-	+(-)
Чувствительность к 50 ед полимиксина	+	-(+)
Образование ацетилметилкарбинола	-	+(-)

Условные обозначения см. в таблице 14.

Холерные вибрионы являются носителями умеренных фагов с низкой литической активностью. Известны фаги, активные в отношении холерных вибрионов O1 и не O1, включая O139 серологическую группу, а также с более узким спектром литического действия, в пределах отдельных групп штаммов, например  $ctx^+$  и  $ctx^-$  холерных вибрионов.

Одним из основных факторов вирулентности (и эпидемической значимости) холерных вибрионов, определяющих тяжесть клинической картины при холере, является холерный энтеротоксин, синтез которого контролируется кластером генов  $ctxAB$ .

Понятие эпидемической значимости базируется на определении комплекса показателей:

- прямые - выявление гена холерного токсина в ПЦР и определение активности его продукции на кроликах-сосунках;
- косвенные - отсутствие гемолитической, липазной активности, поздняя ферментация маннита, высокая адгезивная активность *in vitro* (на модели эритроцитов).

Холерные вибрионы имеют две хромосомы: большую размером 2 960 т.п.н. и малую размером 1 070 т.п.н.. На большой хромосоме *V. cholerae* расположены гены патогенности:  $ctxAB$ , кодирующий биосинтез СТ, гены, определяющие продукцию дополнительных

холерных токсинов, гены *tcrA-F*, кодирующие продукцию ТСР, а также гены, необходимые для репликации, транскрипции, репарации ДНК, биосинтеза клеточной стенки и О-антигена. Биосинтез О1 антигена определяет кластер генов, обозначенный как *wbe*. Продукция О139 антигена кодируется кластером генов, также локализованном на большой хромосоме и имеющим обозначение *wbf*. Выявление с помощью ПЦР генов *wbe* и *wbf*, специфичных для холерных вибрионов О1 и О139 серологических групп, позволяет определить серогруппу возбудителя холеры. На малой хромосоме, помимо генов с неустановленной функцией, локализованы структурные гены *hlyA*, отвечающие за синтез термолabile гемоллизина, а также остров интегров, содержащий гены, кодирующие антибиотикоустойчивость, и участвующий в приобретении новых генов. Следует отметить, что ген *hlyA* присутствует в хромосоме всех штаммов *V. cholerae*, как способных к биосинтезу термолabile гемоллизина, так и не продуцирующих этот белок. Однако в гене *hlyA* холерных вибрионов классического биовара, в отличие от такового *V. cholerae* эльтор, имеется делеция протяженностью 11 п.н., вследствие чего продукция гемоллизина вибрионами этого биовара невозможна.

Штаммы холерных вибрионов О1 и О139 серогрупп, содержащие гены *ctxAB* и *tcrA-F*, вызывают холеру и являются эпидзначимыми. Эти штаммы не лизируют эритроциты барана в пробе Грейга. Эпидемически не значимые штаммы холерных вибрионов, не содержащие генов *ctxAB* и *tcrA-F*, лизируют эритроциты барана в пробе Грейга. Нетоксигенные (не содержащие гена холерного токсина) *ctxAB* варианты холерных вибрионов О1, также как и других серогрупп могут вызывать спорадические (единичные) или групповые

(при общем источнике инфицирования) заболевания, не склонные к эпидемическому распространению.

Чувствительным и специфичным методом детекции *ctxAB*-оперона является генодиагностика на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР). Этот метод применяют при исследовании выделенной культуры, проб воды, испражнений больных холерой людей или сред накопления.

Наличие гена холерного токсина (*ctxAB*), независимо от его экспрессии, отличает токсигенные (эпидемические) от свободноживущих холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп; кроме того, в геноме токсигенных эпидемически значимых вариантов присутствует ряд генов, кодирующих синтез белка *TOX T*, передающего сигналы запуска синтеза холерного токсина (*CT*), токсинорегулируемых пилей адгезии (*TCP*) и фактора колонизации (*ACF*). Известно, что свободноживущие атоксигенные холерные вибрионы O1 чрезвычайно редко имеют *tcr* ген в своей хромосоме.

Токсигенные (содержащие ген холерного токсина) штаммы вызывают гибель в течение первых двух суток с типичным «синдромом холерогенности» кроликов-сосунков, зараженных  $1 \times 10^5$  и  $1 \times 10^7$  м.к. Штаммы холерных вибрионов, не содержащие гена холерного токсина, не вызывают гибели животных и изменений в кишечнике или обуславливают накопление в кишечнике выживших или павших животных мутной, коричневатой-желтой жидкости, т.е. развитие энтеропатогенного синдрома, связанного с реализацией других факторов патогенности.

Обязательной проверке на модели кроликов-сосунков в отсутствие возможности определения гена холерного токсина подлежат следующие штаммы *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп:

а) выделенные от людей:

- гемолизнегативные штаммы холерных вибрионов O139 серогруппы;
- гемолизпозитивные штаммы холерных вибрионов обеих серогрупп;
- гемолизотрицательные штаммы холерных вибрионов O1 серогруппы, атипичные по серологическим свойствам и устойчивые к фагу эльтор и stx<sup>+</sup>;

б) выделенные из объектов окружающей среды:

- гемолизотрицательные штаммы холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп, выделенные при отсутствии эпидемических осложнений по холере.

Для полной характеристики штаммов изучают чувствительность к антибиотикам (табл. 16).

Таблица 16

Пограничные значения диаметров зон ингибиции роста (мм) и величин МПК (мкг/мл) антибиотиков в отношении *Enterobacteriaceae*

Антибактериальные препараты	Содержание в диске (мкг)	Диаметры зон ингибиции (мм)			МПК (мкг/мл)		
		Устойчивые	Промежуточные	Чувствительные	Устойчивые	Промежуточные	Чувствительные
Беталактамы							
Ампициллин*	10	≤13	14-16	≥17	≥32	16	≤8
Цефотаксим	30	≤14	15-22	≥23	≥64	16-32	≤8
Цефтриаксон	30	≤13	14-20	≥21	≥64	16-32	≤8
Цефтибутен	30	≤17	18-20	≥21	≥32	16	≤8
Аминогликозиды							
Канамицин	30	≤13	14-17	≥18	≥64	32	≤16
Гентамицин	10	≤12	13-14	≥15	≥16	8	≤4
Тобрамицин	10	≤12	13-14	≥15	≥16	8	≤4
Амикацин	30	≤14	15-16	≥17	≥64	32	≤16
Сизомицин	10	≤12	13-14	≥15	≥16	8	≤4
Хинолоны							
Налидиксовая к-та	30	≤13	14-18	≥19	≥32	-	≤16
Норфлоксацин	10	≤12	13-16	≥17	≥16	8	≤4



Пефлоксацин	5	<=12	13-16	>=16	>=8	4	<=2
Офлоксацин	5	<=12	13-15	>=16	>=8	4	<=2
Ципрофлоксацин	5	<=15	16-20	>=21	>=4	2	<=1
Ломефлоксацин	10	<=18	19-21	>=22	>=8	4	<=2
Тетрациклины							
Тетрациклин*	30	<=14	15-18	>=19	>=16	8	<=4
Доксициклин	30	<=12	13-15	>=16	>=16	8	<=4
Другие препараты							
Хлорамфеникол*	30	<=12	13-17	>=18	>=32	8	<=4
Ко-тримоксазол*	1,25/23,75	<=10	11-15	>=16	>=4/76	-	<=2/38
Нитрофурантоин	300	<=14	15-16	>=17	>=128	64	<=32
* - методы и критерии оценки стандартизованы для холерного вибриона							

Определение антибиотикограммы холерных вибрионов, выделенных от первых больных, необходимо проводить методом серийных разведений, поскольку этот метод позволяет дифференцировать не только высокую чувствительность или высокую степень резистентности культур к антибактериальным препаратам, но и выявлять промежуточные значения минимально-подавляющей концентрации (МПК) препарата. Дискодиффузионный метод используют как ориентировочный при изучении чувствительности к антибактериальным препаратам последующих культур холерных вибрионов.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ

### Занятие 1.

#### Изучение культурально-морфологических, биохимических и серологических свойств *V. cholerae cholerae* и *V. cholerae eltor*

- Изучение характера роста культур на скошенном МПА.
- Посев агаровых культур секторами на одну чашку МПА, селективные среды (Монсура, СЭДХ и др.), пробирки со скошенным МПА, лактозо-сахароз-

ной средой, МПБ, 1% ПВ, 0,3% полужидким агаром (ПЖА), средами Гисса с сахарозой, маннозой, арабинозой, крахмальной средой с индикатором Андрее, средой Кристенсена и желатиной.

- Посев смеси культур холерного вибриона и кишечной палочки секторами на МПА и селективные среды (Монсура, СЭДХ и др.).
- Изучение культуры в слайд-агглютинации с холерными сыворотками О1, РО, Инаба и Огава.
- Слайд-агглютинацию ставят на обезжиренном стекле, помещенном в чашку Петри, используя подозрительную на холерный вибрион колонию и/или агаровую 12–18-часовую культуру и сыворотки О1 серогруппы в разведении 1:50-1:100, Инаба и Огава в разведениях 1:50. Сыворотку О139 разводят в соответствии с указанием на этикетке. Реакцию обязательно сопровождают контролями культуры в физиологическом растворе.
- Постановка с *V.cholerae cholerae* и *V. cholerae eltor* развернутой реакции агглютинации (РА), используя холерные сыворотки О1, РО, Инаба и Огава. (приложение).

*Примечание:*

*Все посе́вы поместить при 37 °С, желатину - при комнатной температуре.*

## **Занятие 2.**

### **Изучение культурально-морфологических, биохимических и серологических свойств *V. cholerae cholerae* и *V. cholerae eltor***

- Изучение характера роста культур на МПБ и 1% ПВ.
- Изучение морфологии колоний на МПА и селективных средах.
- Сравнение характера роста холерных вибрионов и

- кишечной палочки на МПА и селективных средах.
- Изучение морфологии клеток в окрашенных по Граму мазках, приготовленных из агаровой (МПА) и бульонной культур.
  - Изучение подвижность вибрионов:
  - в 0,3% ПЖА.
  - в препарате «раздавленная капля», приготовленном из агаровой и бульонной культур (в поле зрения светового и фазово-контрастного микроскопа).
  - Определение у культур ферментативной группы Хейберга по результатам разложения сахарозы, маннозы, арабинозы.
  - Определение характера изменения лактозо-сахарозной среды.
  - Определение у культур диастатической активности по результатам ферментации крахмала.
  - Определение у культур уреазной активности по результатам изменения среды Кристенсена.
  - Провести предварительный учет протеолитической активности.
  - Провести учет результата РА: установить принадлежность изучаемых культур к *V. cholerae* O1 серогруппе, определить серовар.
  - **Изучение дифференциальных признаков биоваров *V. cholerae cholerae* и *V. cholerae eltor***
  - Постановка пробы с холерными диагностическими бактериофагами классическим и эльтор двухслойным методом.
  - Посев 3-часовой бульонной культуры на МПА с 50 ед/мл полимиксина (приложение).
  - Постановка гемагглютинации.
  - Посев агаровых культур в бульон Кларка.

### Занятие 3.

#### Изучение дифференциальных признаков биоваров *V. cholerae cholerae* и *V. cholerae eltor*

- Учет пробы с диагностическими холерными фагами классическим и эльтор (приложение).
- Учет пробы с полимиксином.
- Постановка реакции Фогес-Проскауэра.
- Посев культуры в 20-30 мл МПБ (для изучения чувствительности к антибиотикам).
- **Изучение эпидемической значимости *V. cholerae eltor* комплексным методом**
- Подготовка 3-часовой бульонной культуры
- Постановка пробы с фагами  $ctx^+$  и  $ctx^-$  (приложение).
- Постановка пробы Грейга (приложение).

### Занятие 4.

#### Изучение эпидемической значимости *v. cholerae eltor* комплексным методом

- Учет пробы Грейга.
- Учет пробы с фагами  $ctx^+$ ,  $ctx^-$  и определение эпидемической значимости культуры по таблице.
- Определение оперона гена токсинообразования холерных вибрионов с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Экстрагирование ДНК из выделенной культуры. Для этого прокипятить суспензию клеток вибрионов в дистиллированной воде ( $10^7$  КОЕ/мл) 30 мин. При этом клеточная стенка холерного вибриона легко разрушается и освобождается ДНК, одновременно происходит обеззараживание образца. После кипячения использовать образец в ПЦР в количестве 3–5 мкл на 25 мкл амплификационной смеси.

*Приготовление амплификационной смеси и поставка ПЦР.*

На одну пробу необходимо:

- 2 мкл 10x ПЦР-буфера;
- 1,5 мкл 2,5 mM раствора дНТФ;
- 1,5 мкл 25 mM MgCl<sub>2</sub>;
- по 10 pmol каждого праймера (обычно по 0,5-1 мкл).

Для оценки эпидзначимости штаммов используют два праймера для детекции *ctxAB*:

P1 5'- TGA AAT AAA GCA GTC AGG TG – 3'

P3 5' - GGT ATT CTG CAC ACA AAT CAG - 3'

–для детекции *tcpA*:

В реакцию взять эквимольное количество праймеров. Расчет концентрации провести в зависимости от оптической плотности и количества оснований в олигонуклеотидах по следующей формуле:

$C \text{ (pmol/}\mu\text{l)} = A_{260} / (0,01 \times N)$ , где:

$A_{260}$  - поглощение раствора праймера при 260 нм;

$N$  - число оснований в одном праймере;

0,2 мкл Taq-ДНК-полимеразы;

стерильной бидистиллированной воды до 22 мкл (в зависимости от количества вносимых праймеров).

Приготовить общую амплифицированную смесь и две пробы (положительный и отрицательные контроли), перемешать пипетированием и внести в амплификационные пробирки по 22 мкл в каждую. Исследуемые образцы в количестве 3 мкл внести в соответствующие пробирки с амплификационной смесью, используя отдельные наконечники для каждого образца, после чего смесь перемешать пипетированием и наслоить 40-50 мкл вазелинового масла (три капли из наконечника объемом 200 мкл).

В качестве положительного контроля применить 3 мкл образца ДНК, экстрагированной методом кипячения из суспензии клеток штамма *V.cholerae* eltor M-878, с концентрацией  $1 \times 10^7$  КОЕ/мл. В качестве от-

рицательного контроля использовать 3 мкл дистиллированной воды.

Аmplификацию проводить в термоциклере по следующей программе:

стартовая денатурация 94 °C - 2 мин

далее 35 циклов 94 °C - 45 сек

57 °C - 45 сек

72 °C - 45 сек

заключительная элонгация 72 °C - 10 мин

*Примечания: Солевой ПЦР-буфер, раствор дНТФ, раствор MgCl<sub>2</sub>, праймеры, Taq-ДНК-полимеразу хранят при -10 °C или -20 °C и размораживают (кроме Taq-ДНК-полимеразы) только перед приготовлением амплификационной смеси;*

*Учет результата амплификации.*

По окончании программы амплификации анализируемые образцы смешать с 2-2,5 мкл раствора для нанесения проб и внести в лунки горизонтального агарозного геля плотностью 1,3%. Электрофорез проводить в 1x TBE-буфере в присутствии бромистого этидия в концентрации 0,5 мкг/мл, при напряженности 6 В/см в течение 1 ч, не допуская выхода красителя бромфенолового синего из геля. Затем - просмотр геля в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе.

Аmplифицированные фрагменты идентифицируют по размеру, сравнивая флюоресцирующие в геле полосы анализируемых образцов с полосами положительного контроля или в соответствии с маркерами молекулярного веса.

*Оценка результатов:*

В случае обнаружения в одной пробе амплифицированных фрагментов размером 777 н.п. (ctxAB оперон), соответствующий штамм расценивается как эпидемиологически опасный. Проба с отрицательным контролем не

должна иметь флюоресцирующих фрагментов в геле.

### **Занятие 5.**

#### **Изучение чувствительности *V. cholerae cholerae* и *V. cholerae eltor* к антибиотикам**

- Определение чувствительности культур к антибиотикам методом диффузии в агаре, используя 18-20-часовую бульонную культуру.
- Определение чувствительности культур к тетрациклину методом серийных разведений в жидкой питательной среде, используя 18-часовую бульонную культуру.

### **Занятие 6.**

#### **Изучение чувствительности *V. cholerae cholerae* и *V. cholerae eltor* к антибиотикам**

- Учет результата изучения чувствительности культур к антибиотикам по зонам задержки роста вокруг дисков антибиотиков.
- Определение чувствительности (устойчивости) культур к антибиотикам методом диффузии в агаре по таблице 16.
- Учет результата изучения чувствительности культур к тетрациклину методом серийных разведений в жидкой среде. Определение МПК антибиотика в отношении изучаемых культур. Оценка результата по таблице 16.

### **Занятие 7.**

#### **Дифференциация некоторых представителей семейства *Vibrionaceae* (*Vibrio*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*)**

- Изучение морфологии колоний на МПА *V. cholerae* не O1, *Aeromonas*, *Plesiomonas*.

- Изучение морфологиии микробных клеток в мазках, окрашенных по Граму.
- Изучение подвижности:
- - в 0,3% ПЖА (посейте каждую культуру в пробирку ПЖА).
- - в препарате «раздавленная капля», приготовленном из агаровой культуры.
- Определение оксидазной активности.
- Посев культуры на среду Хью-Лейфсона.
- Посев культуры на среды Гисса с маннитом, инозитом, сахарозой, маннозой, арабинозой.
- Посев культуры на среду Биргер-Крушинской с лизином, орнитином и аргинином.
- Посев культуры на среду Кристенсена.
- Изучение лецитиназной активности. Посев культуры секторами на одну чашку желточного агара.
- Изучение протеолитической активности. Посев культуры уколом в столбик желатины.

### Занятие 8.

#### Дифференциация некоторых представителей семейства *Vibrionaceae* (*Vibrio*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*)

- Учет характера роста культур в 0,3% ПЖА
- Определение типа утилизации глюкозы по результатам изменения среды Хью-Лейфсона.
- Просмотр результатов изменения сред Гисса с маннитом, инозитом, сахарозой, маннозой и арабинозой.
- Учет декарбоксилирования культурами аминокислот.
- Учет уреазной активности на среде Кристенсена.
- Просмотр результата изучения лецитиназной активности.
- Учет протеолитической активности.
- Сравнение полученных результатов с таблицей 14.



## 7.2. Бактериологический анализ

В системе противохолерных мероприятий существенное значение имеют лабораторные методы исследования, среди которых основным является бактериологический, направленный на обнаружение возбудителей холеры – *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп. Бактериологический анализ проводится с диагностической целью и по эпидемиологическим показаниям.

Объектами исследования могут быть испражнения, рвотные массы, желчь, трупный материал (отрезки тонкого кишечника, желчный пузырь), различные предметы, загрязненные выделениями больного, вода, пищевые продукты, обитатели водоемов и другие объекты окружающей среды.

Забор, доставка и порядок исследования материала проводятся в соответствии с действующими методическими указаниями МУ 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры» (2007 г.)

Алгоритм бактериологического исследования на холеру основан на поэтапном использовании жидкой накопительной среды (1% ПВ, 1% ПВ с теллуридом калия) с последующим высевом из неё на плотные щелочные агары (мясо-пептонный, Мартена, Хоттингера), элективные дифференциально-диагностические среды (TCBS, СЭДХ, Монсура, Седук и др.) и набор сред для идентификации. Используемые для диагностики холеры питательные среды подлежат бактериологическому контролю в установленном порядке.

Агаровые среды перед использованием должны быть тщательно подсушены. Посев делают так, чтобы получить рост в виде изолированных колоний. Все посеvy инкубируют при температуре  $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . Посевы исследуемого материала на всех этапах выращивают в 1%-й пептонной воде 6 - 8 ч, в пептонной воде с теллу-

ритом калия - 12 - 18 ч, на щелочном агаре - не менее 14 - 16 ч, а на плотных элективных средах - 18 - 24 ч.

### **Исследование клинического материала.**

На I этапе бактериологического анализа испражнений и рвотных масс больного, содержимого кишечника и желчного пузыря трупа лиц, умерших от холеры, исследуемый материал в количестве 0,5–1 мл засевают пипеткой в 50–100 мл 1% ПВ (I-ая среда накопления) и петлей на пластинку щелочного агара и одну из элективных сред. Целесообразно на этом этапе применить ускоренные методы исследования (МФА, РИВ и ПЦР со специфическими праймерами).

При исследовании материала от больных, подозрительных на заболевание холерой, не допускается в качестве накопительной среды использование 1% пептонной воды с теллуридом калия.

Материал от подозрительных на вибрионосительство засевают в 50 мл среды накопления при индивидуальных анализах и в 100 мл – при групповых, объединяя в один флакон по 0,5-1 мл пробы не более чем от 5 человек. К групповым посевам прибегают в редких случаях при проведении массовых обследований на вибрионосительство.

Материал, доставленный в 5 мл 1% пептонной воды, полностью используется для посева в 50 мл среды накопления. В случае поступления в лабораторию материала, забранного в 50 мл 1% пептонной воды во флаконе и доставки его не позже 2 ч после забора пробы, флакон помещают в термостат на 6 ч для накопления возбудителя. При доставке материала в более поздние сроки 5 мл его засевают в 50 мл 1% пептонной воды.

В отдельных случаях при бактериологическом исследовании материала от лиц, принимавших антибио-

тики, его засевают в 200-300 мл 1% пептонной воды (предпочтительно в широкодонные колбы) и на 2 чашки щелочного агара так, чтобы получить рост в виде изолированных колоний. Посевы инкубируют при 37°C в течение 24 ч и спустя 8–10 ч инкубации делают последовательные высевы с поверхностного слоя среды на пластинки щелочного агара. Использование второй среды обогащения в этом варианте исследования не целесообразно.

На II этапе (через 6-8 ч от начала исследования) с поверхности I-ой среды накопления производят пересев на пластинку щелочного агара, на одну из элективных сред, и в 5-8 мл 1% ПВ (II-ая среда накопления). Пересевы в жидкие и на плотные среды делают с поверхности жидкой среды большой бактериологической петлей диаметром 5 мм.

При отрицательных результатах ускоренных методов исследования нативного материала их повторяют, исследуя I-ую среду накопления.

На III этапе (через 12-16 ч от начала исследования) высевают с поверхности II-ой среды накопления на пластину щелочного агара.

В случае необходимости ускорения хода анализа материала от больного, подозрительного на заболевание холерой, отбор колоний со щелочного агара, засеянного в начале исследования, можно начинать уже на этом этапе, в остальных случаях - на следующем.

На IV этапе (через 18-24 ч от начала исследования) производят отбор подозрительных на холерный вибрион колоний в посевах на плотные среды нативного материала, а также в посевах из 1 и 2 накопительных сред. При отборе колоний обращают внимание, как на типичные, так и на атипичные колонии. На щелочном агаре колонии холерных вибрионов O1 и O139 серо-

групп в типичной S-форме – круглые, гладкие, плоские, голубоватые, гомогенные с ровными краями, прозрачные в проходящем свете, светло-голубые под стереоскопическим микроскопом в косопадающем свете с голубым или зеленоватым оттенком.

Колонии холерных вибрионов на элективных средах TCBS и СЭДХ имеют ярко-желтую окраску на зеленом или синем фоне среды, полупрозрачные; на среде Монсура – матовые, серовато-белого цвета с черным центром (окраска центра наиболее выражена через 24 – 48 ч).

Атипичные колонии холерных вибрионов: мутные с плотным центром, пигментированные (коричневые или светло-желтые), шероховатые или мелкие коккоподобные.

Отобранные по оксидазной пробе агглютинирующиеся и неагглютинирующиеся холерными сыворотками O1 или O139 колонии отсеивают для последующей идентификации на одну из полиуглеводных сред (лактозосахарозную, Клиглера, универсальный скошенный столбик, Ресселя и др.), на косячок МПА и пробирку МПБ для выделения чистой культуры, её идентификации и определения чувствительности к антибиотикам.

При положительной реакции агглютинации с холерной O1 сывороткой в разведении 1:50 и 1:100 и достаточном количестве подозрительных колоний ставят слайд-агглютинацию с варианто-специфическими сыворотками Инаба и Огава в том же разведении, реакцию иммобилизации, готовят мазки для окраски по Граму и обработки флюоресцирующими иммуноглобулинами. При положительных результатах выдают предварительный ответ об обнаружении в исследуемом материале холерного вибриона O1, а в случае положительной реакции с сывороткой O139 – холерного вибриона O139 серогруппы.

V этап (через 24-36 ч от начала исследования). Просматривают полиуглеводные среды и отбирают культуры с типичным для вибрионов характером роста и изменений среды. На двухуглеводных средах наблюдается характерное для кислой реакции изменение цвета столбика при сохранении цвета скошенной части без образования газа, а также сероводорода, улавливаемого в среде Клигlera. Культуры, выросшие на щелочном агаре, проверяют на наличие индофенолоксидазы.

Определяют морфологию микроорганизмов и чистоту отобранных культур на щелочном агаре и полиуглеводных средах в мазках, окрашенных по Граму. Подозрительные культуры проверяют в ориентировочной реакции агглютинации с холерными сыворотками O1 в разведении 1:100, PO, Инаба, Огава в разведении 1:50. При отрицательных результатах с этими сыворотками ставят слайд-агглютинацию с холерной сывороткой O139 серогруппы, используя её в соответствии с инструкцией по применению.

На основании положительных результатов агглютинации с холерными сыворотками O1, Инаба и/или Огава выдают предварительный положительный ответ о выделении из исследуемого материала культуры холерного вибриона O1 соответствующего серовара. Если выделенная культура реагирует с холерной сывороткой O139 при отрицательных результатах с сыворотками O1 серогруппы выдают ответ о выделении холерного вибриона O139 серогруппы.

Проводят идентификацию выделенных оксидазопозитивных агглютинирующихся или не агглютинирующихся культур по сокращенной или полной схеме.

VI этап (через 36-48 ч от начала исследования). Учитывают результаты идентификации и выдают окончательный ответ о выделении культуры холерного ви-

бриона соответствующей серогруппы и биовара. Для холерных вибрионов O1 (Инаба, Огава или Гикоши-ма) указывают эпидемическую значимость ориентировочно по тестам гемолитической активности, чувствительности к фагам  $ctx^+$  и  $ctx^-$  и окончательно – по результатам молекулярного зондирования или ПЦР на присутствие в геноме выделенной культуры  $ctx$  АВ гена, а также токсигенности на модели кроликов-сосунков. Эпидемическую значимость холерных вибрионов O139 серогруппы определяют по тем же тестам, кроме чувствительности к фагам  $ctx^+$  и  $ctx^-$ . К окончанию этого этапа исследования должна быть определена антибиотикограмма выделенной культуры.

При выделении от больного или вибриононосителя культуры холерного вибриона, не агглютинирующей холерными сыворотками (O1 и O139), выдают ответ о выделении холерных вибрионов не O1 и не O139 серогрупп. При наличии вибрионных агглютинирующих диагностических сывороток определяют принадлежность к другим серогруппам (O2-O83).

### **Исследование объектов окружающей среды.**

Схема анализа объектов окружающей среды отличается от схемы исследования материала от больных только на I этапе, II - VI этапы изложены выше.

При исследовании воды (питьевой, поверхностных водоемов и др.) необходимо учитывать время доставки проб и выбирать наиболее подходящий вариант исследования.

Если вода поступила в лабораторию утром, к исследуемой пробе добавляют основной раствор пептона до 1% концентрации, определяют рН и при необходимости подщелачивают 10% раствором едкого натрия до рН  $8,4 \pm 0,1$ . Анализ пробы (1000 мл) проводят в двух

объемах по 500 мл, время инкубации 8-10 ч. В конце рабочего дня производят высев на II-ую среду накопления – 1% ПВ или 1% ПВ с теллуридом калия (в концентрации 1:100000 или 1:200000) в объеме 10 мл. Время инкубации в среде без теллурида калия 6 ч, с теллуридом калия – 18–20 ч. Ход анализа, начиная со II этапа, аналогичен исследованию материала от больного.

При поступлении анализа воды в лабораторию во второй половине дня – в исследуемую воду (в двух объемах по 500 мл) вносят основной раствор пептона до 1% концентрации и теллурид калия. При необходимости в воду добавляют 10% раствор едкого натрия до pH  $8,4 \pm 0,1$ . Через 18–24 ч инкубирования при 37°C производят пересев в 10 мл 1% ПВ (II-ая среда обогащения). Время выращивания 6 ч.

Возможен и другой вариант исследования – после установления щелочной реакции и добавления основного раствора пептона (I-ая среда обогащения) пробы сохраняют при комнатной температуре (не выше 25°C) до утра. Утром 5 мл с поверхностного слоя засевают в 100 мл 1% ПВ (II-ая среда обогащения) и делают высев на щелочной агар.

При интенсивном бактериальном загрязнении проб можно использовать III среду накопления.

При исследовании воды можно применять метод концентрирования пробы путем фильтрования её через мембранные фильтры № 2 или № 3, смывы с которых сеют в накопительную среду и на пластинки агара. Осадок на фильтре исследуют МФА, в РНГА, ставят ПЦР со специфическими праймерами.

Сточные воды перед исследованием фильтруют через бумажный или марлевый фильтр.

Исследование пищевых продуктов также принципиально не отличается от исследования другого матери-

ала и проводится по обычной классической схеме. Молоко и молочные продукты в количестве 5 мл (г) сеют в 50-100 мл 1% ПВ и петлей на агаровые среды или к 500 мл молока добавляют основной раствор пептона до 1%-ной концентрации. Другие молочные продукты (кефир, сметану, творог, мороженое и т.д.) в количестве 5 - 10 мл засевают в 1%-ю пептонную воду. Из твердых пищевых продуктов берут навеску 25 г, растирают в стерильной ступке с 2 - 3 г кварцевого песка и физиологическим раствором, а затем переносят в 125 мл накопительной среды и петлей на агаровые среды. Масло перед посевом размягчают на водяной бане или в термостате.

После посева продукта устанавливают рН среды  $8,4 \pm 0,1$ .

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ**

### **Занятие 9**

#### **Исследование испражнений больного**

##### **I этап (начало исследования)**

- Проведение бактериоскопии мазков и изучение подвижности в препарате «раздавленная капля» из нативного материала.
- Посев пипеткой 0,5-1,0 мл испражнений в 50-100 мл 1% ПВ (I-ая среда накопления).
- Посев бактериологической петлей нативного материала на чашку МПА и чашку селективной среды.
- Применение ускоренных методов исследования нативного материала: МФА, РИВ (приложение), РНГА с использованием холерного иммуноглобулинового диагностикума.
- Выдача предварительного ответа по результатам исследования ускоренными методами.

##### **II этап (через 6 ч от начала исследования)**



- Посев пипеткой или бактериологической петлей с поверхности I-ой среды накопления в 5-8 мл 1% ПВ (II-ая среда накопления).
- Высев стандартной петлей с поверхности I-ой среды накопления на пластинки МПА и селективной среды.
- При отрицательных результатах ускоренных методов исследования нативного материала повторение их, исследуя I-ую среду накопления. Выдача предварительного ответа.

### **III этап (через 12 ч от начала исследования)**

- Высев со II-ой среды накопления на пластинчатый МПА.
- Исследование посевов нативного материала:
- Просмотр в проходящем свете невооруженным глазом или под стереоскопическим микроскопом с косым освещением посевы нативного материала и отбор подозрительных на рост вибриона колоний.
- При наличии подозрительных колоний (типичных и атипичных) - постановка ОРА с холерной O1 сывороткой в разведениях 1:50 и 1:100. При положительной реакции с видоспецифической холерной сывороткой - предварительный положительный ответ. *При отрицательной реакции с сывороткой O1, агглютинирование подозрительных колоний сывороткой O139 .*
- Посев подозрительных на рост вибриона 2-3 колоний, агглютинирующихся и неагглютинирующихся холерными сыворотками O1 или O139, на одну из полиуглеводных сред (например, лактозо-сахарозную), косяк МПА и пробирку МПБ.
- Проведение ускоренной идентификации колоний агглютинирующими на стекле холерными сыворотками. При наличии четких положительных результатов ускоренной идентификации - окончательный ответ о выделении возбудителя холеры.

## Занятие 10

### Исследование испражнений больного

#### IV этап (через 24 ч от начала исследования)

- Исследование посевов нативного материала:
- Отбор культуры на полиуглеводных средах с типичным для вибрионов характером роста
- Проверка культуры на индофенолоксидазу.
- Определение чистоты культур на МПА и полиуглеводных средах в мазках, окрашенных по Граму.
- Проверка культуры в ОРА с холерными сыворотками О1, Инаба, Огава или 0139.
- Проведение идентификации культуры, агглютинирующей холерной О1 сывороткой, по полной схеме:
- постановка РА с холерными сыворотками О1, РО, Инаба, Огава;
- постановка пробы с холерными фагами классическим и эльтор;
- определение ферментации сахарозы, маннозы, арабинозы;
- определение чувствительности к полимиксину (приложение);
- постановка реакции гемагглютинации;
- отсев культуры на косячок МПА и 0,3% ПЖА (для хранения).
- При выделении холерного вибриона эльтор проведение определения эпидзначимости культуры комплексным методом (приложение):
- постановка пробы с фагами  $ctx^+$  и  $ctx^-$  (приложение);
- изучение гемолитической активности (приложение).

#### Изучение чувствительности к антибиотикам методом серийных разведений в жидкой среде

- Изучение у культур, не агглютинирующихся на стекле холерными сыворотками, но оксидазополо-

жительных:

- свойства агглютинироваться холерными сыворотками по сле прогревания антигена в течение 2 ч при 100 °С;
  - чувствительности к холерным фагам классическому и эльтор (приложение);
  - утилизации глюкозы в среде Хью-Лейфсона;
  - декарбоксилирования аминокислот;
  - ферментации маннита, инозита, маннозы, сахарозы, арабинозы.
- Просмотр посевов на селективных средах.
  - Исследование посевов с I-ой среды накопления:
  - Просмотр посевов.
  - Если культура не выделена из посевов нативного материала, ведение исследования как указано в занятии 9, III этап.

### **Исследование воды:**

#### **I этап (начало исследования)**

- Анализ пробы (1000 мл) в двух объемах по 500 мл. Добавление к 500 мл исследуемой воды 55,5 мл основного раствора пептона (до 1% концентрации) и 11,1 мл или 5,6 мл 0,05% рабочего разведения теллурида калия (до концентрации 1: 100000 или 1: 200000) в соответствии с данными проверки препарата. Осторожное перемешивание круговыми движениями колбы (бутылки).
- Определение рН. При необходимости подщелачивание 10% раствором едкого натрия до рН 8,0. Инкубирование при 37 °С 14-18 ч.

## **Занятие 11**

### **Исследование испражнений больного**

#### **V этап**

- Исследование посевов нативного материала:
- Учет результатов окончательной идентификации выделенной культуры.
- Выдача окончательного ответа о выделении возбудителя холеры при положительных результатах изучения культуры.
- Учет результатов идентификации неагглютинирующей холерными сыворотками культуры.
- Исследование посевов с I-ой среды накопления, если культура не выделена из нативного материала:
- Проведение полного изучения культуры (занятие 10)
- Исследование посевов со II-ой среды накопления:
- Просмотр посевов.
- Если культура не выделена из посевов нативного материала и I-ой среды накопления, проведение исследований, как указано в занятии 9, III этап.

#### **VI этап**

- Исследование посевов с I-ой среды накопления, если культура не изолирована из нативного материала;
- Учет результатов идентификации культуры. При положительных результатах выдача окончательного положительного ответа о выделении холерного вибриона.
- Учет результатов идентификации неагглютинирующей холерной O1 сывороткой культуры.
- Исследование посевов со II-ой среды накопления, если культура не выделена из посевов нативного материала и I-ой среды обогащения:
- Учет результата ускоренной идентификации культуры, выдача ответа.
- Проведение полного изучения выделенной культуры (занятие 10).

#### **VII этап**

- Исследование посевов со II-ой среды накопления,

- если культура не выделена ранее.
- Учет результата идентификации культуры холерного вибриона. Выдача окончательного ответа, если он не был выдан ранее.
  - Учет результата идентификации неагглютинирующей холерной O1 сывороткой культуры.
  - Выдача окончательного отрицательного ответа, если культура не выделена на всех этапах исследования.

### **Исследование воды:**

#### **II этап (через 18 ч от начала исследования)**

- Пересев с поверхности I-ой среды накопления в 10 мл 1% ПВ (II-ая среда накопления); инкубируйте при 37 °С 6 ч.
- Высев с поверхности I-ой среды накопления на пластинку МПА.

#### **III этап (через 24 ч от начала исследования)**

- Высев с поверхности II-ой среды накопления на пластинку МПА.

### **Занятие 12**

#### **Исследование воды:**

#### **IV и V этап**

- Исследование посевов с I-ой и II-ой сред накопления:
- Просмотр посевов, отбор подозрительных на рост вибрионов типичных и атипичных колоний, проверка их в ОРА с холерными сыворотками O1, Инаба, Огава или O139.
- Отсев 2-3 колоний, агглютинирующихся и неагглютинирующихся холерными сыворотками, на полиуглеводную среду (например, лактозо-сахарозную), косячок МПА и МПБ. Инкубирование посевов при 37 °С.

#### **Методы ускоренной диагностики холеры.**

#### **Исследование испражнений больного с типичной клиникой**

- Применение МФА:
- Приготовление из нативного материала мазка, обработка его люминесцирующей холерной сывороткой и просмотр. Через 1,5-2 ч - предварительный ответ.
- Посев нативного материала по 0,1 мл в 5-8 мл 1% ПВ и на 4 чашки МПА. Через 3, 4, 5, 6 ч инкубирования при 37 °С приготовление мазков с 1% ПВ и чашек (путем смыва физиологическим раствором), обработка их люминесцирующей холерной сывороткой и просмотр. Через 3–6 ч при нарастании количества специфически «окрашенных» вибрионов, определяемых в мазках, - ответ о наличии возбудителя холеры в исследуемом материале.
- Исследование нативного материала в РИВ под влиянием холерных сывороток О1 (разведение 1: 100), Инаба и Огава (разведении 1: 50). Через 15-20 мин - предварительный ответ.
- Исследование нативного материала в РА в 1% ПВ и в пробе с диагностическими холерными бактериофагами классическим и эльтор:
  - добавление 2-3 капель исследуемого материала в разведенные 1% ПВ в объеме 1 мл холерные сыворотки О1, Инаба, Огава (с 1: 100 до титра) и контроль антигена (1 мл 1% ПВ). Контроль сыворотки: 1 мл сыворотки в разведении 1: 100 (без исследуемого материала). Учет реакции агглютинации через 1 ч. При положительном результате виден агглютинативный рост с просветлением среды при отсутствии агглютинации в контрольной пробирке. При отрицательном результате – гомогенное помутнение среды (наблюдение вести в течение 3 часов).
- Постановка пробы с холерными фагами классическим и эльтор двуслойным методом, внося в 5 мл расплавленного и охлажденного 0,7% ПЖА 0,5 мл

- исследуемого материала (приложение). Учет фаголизиса через 1,5-2 ч инкубирования.
- При положительных результатах РА, фаголизиса и данных микроскопии - окончательный ответ.
  - Постановка микрометодом РПГА и РТПГА с холерным иммуноглобулиновым эритроцитарным диагностикумом. Исследуемый материал предварительно прогреть в течение 20 мин при 100 °С. Через 2 ч - предварительный ответ.
  - Применение мультиплексного ПЦР-анализа нативного материала от больного холерой (занятие 4).
  - Посев исследуемые испражнения в 5-8 мл 1% ПВ и на пластинку МПА для выделения культуры и ее изучения.

### **Занятие 13**

#### **Исследование воды:**

Работа по плану занятия 10.

#### **Ускоренная идентификация культуры по основным признакам**

- Просмотр чашки МПА с посевом испражнений больного (предыдущее занятие), отбор подозрительных на рост вибрионов колоний.
- Микроскопия мазков, постановка ОРА с подозрительными колониями, используя агглютинирующую холерную О1 сыворотку.
- При положительной ОРА отсев колонии в 3 мл МПБ и после 3 ч инкубации изучение следующих признаков:
  - агглютинабельности в пределах титра с холерными сыворотками О1, Инаба и Огава, разведенными 1% ПВ в объеме 1 мл (занятие 12).
  - чувствительности к холерным фагам классическому и эльтор.
  - ферментации сахарозы, маннозы, арабинозы с использованием среды в объеме 0,5-1 мл. Закапывание

- во все пробирки по 1 капле изучаемой культуры.
- Учет результатов через 3-6 ч инкубирования посевов при 37°C. При наличии четких положительных результатов - окончательный ответ о выделении возбудителя холеры.

## **Занятие 14**

### **Исследование воды:**

- Учет результатов изучения выделенной культуры.
- По результатам изучения культуры - окончательный ответ.

### **7.3. Серологическая диагностика**

Серологические методы исследования, как правило, имеют дополнительное значение, и лишь в отдельных случаях при проведении оперативного и ретроспективного эпидемиологического анализа их результаты могут быть решающими.

Для серологической диагностики холеры используют иммунологические реакции, выявляющие в сыворотке крови больных, переболевших и вибрионосителей, а также вакцинированных специфические антитела: агглютинины, антитоксины и вибриоцидные антитела. Исследуют парные сыворотки с интервалом 7-10 дней. Первую пробу берут на 5-7 день болезни. В лаборатории сыворотки инактивируют при 56 °С в течение 30 мин и при необходимости сохраняют при 4°C.

Агглютинины у больных холерой появляются на 5-7 день заболевания и максимального титра достигают к 14-15 дню от начала заболевания. Затем их титр постепенно снижается.

Агглютинины в сыворотке крови больного холерой определяют в объемной реакции агглютинации. В качестве антигена используют живую культуру, выде-



ленную в очаге холеры, или диагностикумы - клетки холерных вибрионов, убитые кипячением или формалином. Диагностическое значение имеет четырехкратный и более высокий подъем титров антител при исследовании парных сывороток. Противохолерные антитела можно выявить методом фазово-контрастной микроскопии, используя в качестве индикаторного штамма культуру холерного вибриона, выделенную в данном очаге, или музейный штамм того же биовара и серовара. Кроме того, можно поставить реакцию нейтрализации антигена (РНАг) с холерным иммуноглобулиновым эритроцитарным диагностикумом и РНГА с антигенным холерным эритроцитарным диагностикумом.

Вибриоцидные антитела в крови больных холерой в титрах  $10^{-1}$ - $10^{-3}$  обнаруживают с 1-3 дня болезни. Вибриоцидины достигают максимального значения ( $10^{-4}$ - $10^{-8}$ ) к 10-12 дню, а к 30 дню болезни быстро снижаются. У переболевших, вибрионосителей и вакцинированных титр вибриоцидных антител колеблется от  $10^{-1}$  до  $10^{-8}$ .

Для выявления вибриоцидных антител предложен ряд методов, основанных на том, что в присутствии вибриоцидных антител в сыворотке не происходит размножение холерных вибрионов. Наиболее простыми и быстрыми являются методы, разработанные Домарадским И.В., Ерохиным Е.П. (1971), Наумшиной М.С. и др. (1973). Определение вибриоцидных антител этими методами основано на ферментации углеводов. О наличии или отсутствии вибриоцидных антител судят по разложению сахарозы, регистрируемому с помощью индикатора. В практических лабораториях для определения вибриоцидных антител также применяют микрометод Бененсона и др. (1968), макро- и

микрометод с использованием диагностикума холерного эритроцитарного О-иммуноглобулинового.

В сыворотках крови больных холерой, вибрионосителей и привитых холероген-анатоксином можно выявлять антитела к энтеротоксину холерного вибриона. Титр антитоксинов нарастает медленно и достигает максимального значения к концу 2-ой недели заболевания.

Для определения токсиннейтрализующих антител разработан ряд методов *in vivo* и *in vitro*. Наиболее трудоемкими являются методы с использованием животных: 10-дневных крольчат, изолированных петель взрослых кроликов, белых мышей. В практической работе целесообразно ставить РНГА с эритроцитарным холерным энтеротоксическим диагностикумом (ЭХЭД). Диагностическим титром РНГА с ЭХЭД следует считать 1:160. Целесообразно исследовать парные сыворотки. Для определения токсиннейтрализующих антител можно использовать также реакцию преципитации в геле, встречный иммуноэлектрофорез, пробу Крейга.

## Занятие 15

### Определение агглютининов в парных сыворотках крови больного в объемной РА

- Титрование 1-ой и 2-ой инактивированных сывороток двукратно в 1% ПВ в объеме 1 мл (с 1:10 до 1:640); КС-сыворотка в разведении 1:10, КА – 1% ПВ.
- Внесение в пробирки с раститрованными сыворотками и в КА по 1 капле 3-часовой бульонной культуры холерных вибрионов О1 или О139 серогруппы.
- Инкубирование пробирки с реакцией при 37°C; через 1 ч проведение предварительного учета результатов.
- Перенос пробирок в холодильник (при 4±0,5°C). На

следующее утро - учет реакции. Положительной считайте РА на 3-4 креста в разведении 1:40 и выше. Диагностическое значение имеет четырехкратное и более нарастание титра антител.

### **Определение вибриоцидных антител в сыворотке крови больного**

- Исследование сыворотки крови больного методом Наумшиной:
- Приготовление суспензии агаровой культуры *V. cholerae eltor*, содержащей  $10^4$  м.кл./мл.
- В восьми пробирках 10-кратно в объеме 0,9 мл на льду, который помещен в любую емкость, раститровать 2-ую инактивированную сыворотку в комплексе, разведенном 1:40. В девятую пробирку внести 0,9 мл комплекса (контроль).
- Во все пробирки, в том числе и контрольную, на холоду, добавить по 0,1 мл суспензии холерного вибриона, содержащей  $10^4$  м.кл./мл.
- Инкубирование смеси  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 1 ч.
- Агар для реакции готовится заранее. К 100 мл МПА рН 7,6 добавляют 1% сахарозы (2,5 мл 40% сахарозы), 0,1-0,2 мл спиртового насыщенного раствора основного фуксина и 2-3 мл 10% водного раствора сульфита натрия. Растворы фуксина и сульфита натрия предварительно подтитровывают. Цвет среды слегка розовый. Агар разливают в чашки Петри по 30 мл.
- Предварительно простерилизованным металлическим пробойником (диаметр 10 мм) прорежьте агар в чашке Петри так, чтобы одна луночка находилась строго в центре чашки, а восемь – по окружности на одинаковом расстоянии друг от друга. Удалите из луночек агар, расплавьте и залейте им дно лунок.
- Помещение на лед штатива с пробирками и через 1 ч инкубирования внесение из каждой пробирки

отдельной стерильной пипеткой по 0,1 мл строго в центр соответствующей луночки агара смесь культуры и сыворотки. В девятую лунку перенести содержимое девятой пробирки (контроль).

- Накрывание чашки крышкой и, не переворачивая, установка на металлический лоток. Инкубирование 16-18 ч при 37 °С.
- Учет результатов. В контроле должно быть покраснение среды (разложение сахарозы). Титр вибриоцидных антител определяют по 100% лизису вибрионов. За титр принимают максимальное разведение сыворотки, которое еще лизирует вибрионы (луночки не окрашены).
- Исследование парных сывороток больного микрометодом с диагностикумом холерным эритроцитарным О-иммуно-глобулиновым:
  - внесение в два ряда лунок микротитровальной пластинки по 0,025 мл 1% ПВ.
  - добавление в первые и последние лунки по 0,025 мл исследуемых сывороток 1: 10 и титратором, рассчитанном на 0,025 мл, титрование в 10 луночках (от 1: 20 до 1: 10240).
  - приготовление из 18-часовой агаровой культуры *V. cholerae eltor* суспензии  $4 \times 10^5$  м.кл./мл и добавление в нее 1:1 комплемента, который предварительно развести в 5 раз.
  - внесение в первые 10 лунок по 0,025 мл приготовленной суспензии холерного вибриона (концентрацией  $2 \times 10^5$  м.кл./мл).
  - выдерживание микротитровальной пластинки, прикрытой чистой крышкой, при 37°С на 5 ч.
  - инактивирование содержимого лунок добавлением по 0,025 мл формалина, разведенного в 10 раз, экспозиция - 1 ч.

- добавление во все лунки по 0,025 мл диагностикума холерного эритроцитарного О-иммуноглобулинового 0,6% концентрации.
- Учет результата через 2–3 ч (можно на следующее утро); за титр вибриоцидных антител принимают последнюю лунку, в которой отсутствует гемагглютинация (эритроциты выпадают на дно лунок в виде «пуговки»).

### **Определение токсиннейтрализующих антител (проба Крейга)**

*Примечания:*

- начать работу с посева агаровой культуры *V. cholerae eltor* в пробирку МПБ для получения 3-часовой культуры.

- занятие проводится в виде объяснения курсантам методики постановки пробы Крейга и демонстрации положительной и отрицательной реакции на кролике.

## **7.4. Приложение**

### **Реакция иммобилизации вибрионов**

Чувствительность метода иммобилизации вибрионов под влиянием холерной О1-сыворотки  $4,3 \cdot 10^5$  м.к. в 1 мл.

На предметное стекло наносят 2 капли исследуемого материала (испражнений, верхнего слоя I-ой или II-ой среды обогащения). Первую каплю накрывают покровным стеклом (контроль), ко второй добавляют каплю холерной О1-сыворотки в разведении 1:50, перемешивают и накрывают покровным стеклом. Раздавленные капли смотрят под микроскопом при увеличении 400–600х, используя фазово-контрастное устройство или конденсор темного поля.

При наличии в исследуемом материале холерных вибрионов в первой капле наблюдают характерную под-

вижность, во второй – подвижность вибрионов прекращается немедленно или в течение 1-2 мин.

Для определения принадлежности холерных вибрионов к серовару можно пользоваться сыворотками Инаба и Огава в разведении 1:50. Реакция иммобилизации специфична и позволяет дать первый сигнальный ответ через 15-20 мин от начала исследования нативного материала. При отрицательном результате исследование повторяют после подрачивания в 1% пептонной воде.

В случае отрицательного результата необходимо провести аналогичное исследование с холерной сывороткой O139 серогруппы, которую разводят 1:5.

### **Тесты дифференциации биоваров *V. cholerae* O1 серогруппы**

#### **Определение чувствительности к диагностическим холерным фагам**

В лабораторной диагностике холеры используют бактериофаги диагностические холерные классический и эльтор. При оценке результатов проб с фагами необходимо ориентироваться на диагностический рабочий титр (ДРТ), который обычно обозначают на этикетках. Определение чувствительности к фагам проводят как с цельными препаратами, так и с их 10-кратными разведениями до ДРТ в мясо-пептонном бульоне. Дифференциальный рабочий титр не ниже  $1 \times 10^2$ .

Для постановки реакции в чашки разливают щелочной агар. После застывания агара и подсушивания его в течение 30 мин при 37°C дно чашек делят на квадраты по количеству образцов фагов и 10-кратных разведений фага. В пробирку с 5 мл 0,5-0,7% питательного агара, расплавленного и охлажденного до 45°C, добавляют 0,1-0,2 мл 3-4-часовой бульонной культуры, тща-

тельно смешивают и выливают на поверхность агара. Чашки оставляют при комнатной температуре с открытыми крышками на 30 мин. В центр квадратов наносят штампом-репликатором, стандартной петлей или тонко оттянутой пастеровской пипеткой по капле фагов в соответствующих разведениях. После подсыхания капель чашки переворачивают вверх дном и помещают в термостат при температуре  $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . Результаты учитывают через 2-4 ч и 18-20 ч. Наличие лизиса в виде одного «стерильного» пятна или группы мелких негативных колоний оценивается как положительный результат.

#### **Определение чувствительности к полимиксину В**

В расплавленный и остуженный до  $45^{\circ}\text{C}$  питательный агар ( $\text{pH } 7,2\pm 0,1$ ) добавляют полимиксин В из расчета 50 единиц на 1 мл среды. После тщательного перемешивания среду разливают в чашки Петри. На застывшие агаровые пластинки наносят обычной бактериологической петлей 18- или 3-часовую бульонную культуру. Результаты учитывают после инкубирования посевов при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 18 ч. Холерные вибрионы биовара *cholerae* не растут на полимиксиновом агаре, биовара *eltor* - признак вариабелен.

#### **Постановка реакции гемагглютинации**

На предметное стекло, помещенное в чашку Петри наносят каплю физиологического раствора и суспендируют в ней петлей 18-часовую агаровую культуру. Затем добавляют каплю 2,5% взвеси куриных эритроцитов, трижды отмытых физиологическим раствором. Стекло покачивают до смешивания взвеси эритроцитов и вибрионов. При положительной реакции в течение 1 мин наступает склеивание эритроцитов. Реакцию сопровождают двумя контролями: а) в каплю физиологического раствора добавляют каплю 2,5%

взвеси эритроцитов; б) в капле физиологического раствора суспендируют испытуемую культуру. Контроли должны быть отрицательными. Для постановки пробы могут быть использованы эритроциты морской свинки.

### **Постановка реакции Фогес-Проскауэра (на ацетилметилкарбинол)**

См. выше.

### **Оценка эпидемической значимости холерных вибрионов Определение гемолитической активности (по Грейгу)**

К 1 мл 18-24-часовой культуры, выращенной в 4-5 мл мясо-пептонного бульона или сердечно-мозгового инфуза, добавляют 1 мл 1% взвеси трижды отмытых эритроцитов барана в физиологическом растворе. Смесь микробов и эритроцитов осторожно перемешивают встряхиванием и помещают на 2 ч в термостат при температуре  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , а затем в холодильник до следующего дня. Предварительный учет результатов проводят через 2 ч, окончательный - на следующий день. При положительной реакции наступает полный или частичный лизис эритроцитов (лаковая кровь). В контроле (1 мл бульона + 1 мл взвеси эритроцитов) гемолиз отсутствует. Чистоту опыта следует контролировать путем посева «смеси» на агаровую среду.

Для постановки пробы Грейга может быть использована дефибринированная кровь барана, консервированная борной кислотой или консервантом Алсевера. Консервированные эритроциты сохраняют свои свойства в течение 3-х месяцев. Перед постановкой пробы на гемолиз дефибринированную кровь центрифугируют при 2-3 тыс. оборотов/мин в течение 15 мин, надосадочную жидкость удаляют, а осевшие эритроциты отмывают физиологическим раствором 2-3 раза с про-



межуточным центрифугированием до получения прозрачной надосадочной жидкости. Из отмытых эритроцитов приготавливают 1% взвесь в физиологическом растворе, которую можно хранить при 4°C 2-3 дня и использовать для постановки пробы Грейга описанным выше способом.

### **Определение эпидзначимости холерных вибрионов эльтор комплексным методом**

Определение производят с помощью диагностических холерных бактериофагов эльтор  $ctx^+$  и  $ctx^-$  в соответствии с наставлением к препаратам и гемолитической активности.

Методику определения гемолитической активности см. выше.

Для постановки пробы с фагом используют метод агаровых слоев. Испытуемую культуру в объеме 0,5 мл добавляют пипеткой в пробирку с 5,0 мл 0,5-0,7% агара Мартена рН  $7,6 \pm 0,2$ , расплавленного и охлажденного до  $45 \pm 0,2^\circ\text{C}$ . После перемешивания все содержимое выливают на подсушенную поверхность агара Мартена рН  $7,6 \pm 0,2$  в чашки Петри. После застывания слоя агара с культурой на его поверхность наносят цельные фаги  $ctx^+$  и  $ctx^-$ . После высыхания капель фагов чашки переворачивают агаром вверх и инкубируют при  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ .

### **Определение токсигенности холерных вибрионов на модели кроликов-сосунков**

Для заражения животных используют 4-часовую агаровую культуру, выращенную при температуре  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$  или 18-ти часовую - при температуре  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . Необходимо использовать две заражающие дозы  $1 \times 10^5$  и  $1 \times 10^7$  м.кл., которые вводят внутрикишечно в объеме по 0,2 мл двум кроликам. Заражающую дозу контролируют путем посева на две чашки щелочного агара

0,1 мл взвеси из разведения  $1 \times 10^3$  м.кл./мл. Кроликов 10-12 дней, весом 130-160 г фиксируют к станку брюшком вверх, выстригают шерсть на операционном поле и смазывают его йодом. Дают эфирный или внутримышечно тиопенталовый наркоз (0,2 мл 1% р-ра на 100 г веса). Делают разрез длиной 1 см по средней линии живота на уровне пупка. Извлекают петлю тонкого кишечника на длинной брыжейке, фиксируют с помощью мягкого пинцета и вводят взвесь вибрионов. Петлю погружают в брюшную полость. Брюшную стенку и кожу послойно зашивают. Шов смазывают йодом. Оперированных крольчат кормят с помощью шприца молоком и наблюдают 48 ч. Всех погибших и умерщвленных через 48 ч животных вскрывают и производят высев содержимого кишечника на чашки щелочного агара. Наиболее выраженные изменения наблюдаются в толстом кишечнике, который растянут бесцветной или светло-желтой, прозрачной или слегка опалесцирующей жидкостью. Слепая кишка и прилегающие отделы толстого кишечника могут быть настолько растянуты, что сквозь них видны подлежащие петли кишечника, что создает видимость полной прозрачности кишечного содержимого. Тонкий кишечник расширен и также заполнен полупрозрачным содержимым. Описанные изменения характерны для «синдрома холерогенности», наблюдаемого при заражении эпидемически опасными, содержащими ген холерного токсина штаммами.

## **8. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ТУЛЯРЕМИИ**

### **8.1. Биологические свойства возбудителя туляремии**

Туляремия является острым инфекционным при-

родно-очаговым заболеванием с поражением лимфатических узлов, паренхиматозных органов, кожных покровов, иногда глаз, зева, легких и сопровождается выраженной интоксикацией. Заболевание преимущественно встречается в ландшафтах умеренного климатического пояса Северного полушария.

Основным резервуаром и источником инфекции при туляремии являются многочисленные виды диких грызунов, зайцеобразные и др. Основная роль в поддержании инфекции в природе принадлежит грызунам (водяная крыса, обыкновенная полевка, ондатра и др.). Больной человек не опасен для окружающих.

Механизм передачи заболевания множественный, чаще всего трансмиссивный. Возбудитель сохраняется в природе в цикле «клещ-животное», передается сельскохозяйственным животным и птицам клещами и кровососущими насекомыми. Специфические переносчики туляремии – иксодовые клещи. Человек заражается туляремией в результате прямого контакта с животными (снятие шкур, сбор павших грызунов и др.), а также алиментарным путем через инфицированные грызунами пищевые продукты и воду. Часто заражение происходит через кровососущих переносчиков (клещи, комары, блохи, слепни и другие членистоногие). Возможно заражение и аспирационным путем (при вдыхании инфицированной пыли от зерна, соломы, овощей). Зарегистрированы случаи заболеваний людей на производствах, связанных с переработкой природного сырья (сахарные, крахмалопаточные, спиртовые заводы, элеваторы и т.п.), на мясокомбинатах, при забое овец и крупного рогатого скота, на котором имелись инфицированные клещи.

Пути заражения: контактный (через кожу и слизистую оболочку глаз), трансмиссивный (при укусе пе-

реносчика), алиментарный (через ЖКТ), аспирационный (через дыхательные пути).

Возбудитель туляремии относится к  $\gamma$ -подклассу прото протобактерий, семейству *Francisellaceae*, роду *Francisella*, который включает два вида: *F. tularensis* и *F. philomiragia*.

В пределах вида *F. tularensis* выделяют 4 подвида: *F. tularensis* subsp. *tularensis* или *nearctica* - неарктический, *F. tularensis* subsp. *holarctica* – голарктический, *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* - среднеазиатский и *F. tularensis* subsp. *novicida*. Подвид *holarctica* включает в себя три биологических варианта: *japonica* - японский биовар, биовар I *Ery(S)* (эритромицинчувствительный) и биовар II *Ery(R)* (эритромицинрезистентный).

Внутривидовая дифференциация возбудителя туляремии основывается на различиях подвидов и биоваров по ряду фенотипических признаков: биохимической активности, степени патогенности для человека и животных, чувствительности к некоторым антибиотикам, на особенностях экологии возбудителя и его ареала. На генотипическом уровне подвиды различаются при VNTR – анализе генома. На территории России встречается *F. tularensis* подвида *holarctica* с двумя биоварами – I *Ery(S)* и II *Ery(R)*, циркуляция которых осуществляется главным образом среди грызунов и зайцеобразных. Распространение их также возможно через иксодовых клещей и водные объекты.

Возбудитель туляремии *F.tularensis* в мазках 1–2 суточной культуры, выращенной на плотных питательных средах, представляет собой кокковидные клетки диаметром 0,3–0,5 мкм. В мазках, приготовленных из культуры с жидких питательных сред, туляремийный микроб имеет форму коротких палочек. В тканях животных, погибших от туляремии, возбудителя об-

наруживают в виде коккобактерий. При длительном выращивании на питательных средах туляремиальные бактерии проявляют значительный полиморфизм: встречаются как более крупные, шарообразные до 3 мкм в диаметре клетки, так и мельчайшие до 0,1–0,2 мкм.

Туляремиальные бактерии неподвижны, грамотрицательны, но окрашиваются бледнее анилиновыми красителями, чем другие грамотрицательные бактерии, размножаются почкованием, спор не образуют, выделяют капсулоподобное слизистое вещество. Слизистую консистенцию культуры выявляют в окрашенных мазках и при эмульгировании бактериальной массы в капле физиологического раствора (культура тянется за петлей). В мазках, окрашенных по Граму, обильную слизь обнаруживают в виде сплошной тонкой сеточки розового цвета.

Бактерии туляремии – факультативные анаэробы. Оптимальная температура их выращивания 36–38 °С, при более низкой температуре размножение происходит медленнее, а ниже 20 °С – прекращается. Оптимальная концентрация водородных ионов в средах для выращивания туляремиального микроба 6,8–7,3. Возбудитель туляремии не растет на обычных питательных средах – МПА и МПБ (исключение – *F. tularensis* subsp. *novicida*), а требует для своего выращивания среды, содержащие кровь, яичный желток или их заменители. На этом основана дифференциальная диагностика туляремиального микроба. Из плотных питательных сред, применяемых для выращивания *F. tularensis*, наиболее распространена свернутая желточная среда Мак-Коя. Культура туляремиального микроба на ней растет в виде извилистого, блестящего, нежного, почти бесцветного, слизистого налета, хорошо снимающегося петлей. Поверхность посева состоит из множества слившихся

мелких колоний, напоминающих «шагреновую кожу». Рост в виде отдельных колоний встречается только при посеве из органов животных со скудным содержанием туляремиальных бактерий и появляется в более поздние сроки (на 9–12 сутки).

Наравне со свернутой желточной средой Мак-Коя для выращивания возбудителя туляремии используют кровяную среду Емельяновой, FT-агар, среды, приготовленные на основе сухого агара для выращивания туляремиального микроба, в том числе с добавлением антибиотиков.

Культура в S-форме на кровяной среде Емельяновой вырастает в виде круглых с ровными краями, равномерно выпуклых, гладких, слабо блестящих беловатого цвета гомогенных колоний, размером до 1–2 мм в диаметре. Бактерии, образующие колонии в S-форме, высоковирулентны для лабораторных животных, колонии слабовирулентных штаммов (SR-форма) более крупных размеров. Авирулентные культуры вырастают в R-форме и агглютинируются трипафлавином. Туляремиальные бактерии слабо ферментируют до кислоты лишь немногие углеводы и спирты на специальных средах. Среда Гисса для этого не пригодна. Ферментирующая способность у разных подвигов туляремиального микроба неодинакова (таблица 17).

Таблица 17

Характеристика *F. tularensis* (по подвидам)  
и *F. philomiragia*

Признак	Подвиды <i>Francisella tularensis</i>				<i>Francisella philomiragia</i>
	<i>tularensis</i>	<i>holartctica</i>	<i>media-siatica</i>	<i>novicida</i>	
1	2	3	4	5	6

1	2	3	4	5	6
Размер, мкм	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 1,5	< 1,5
Наличие капсулы	+	+	+	-	н/д
Тинкториальные свойства	Гр	Гр	Гр	Гр	Гр
Подвижность	-	-	-	-	-
Рост на стандартных средах	-	-	-	+ (-)	+
Рост на среде с цистеином	+	+	+	-	-
Рост в питательном бульоне, 0% NaCl	-	-	-	-	-
Рост в питательном бульоне, 6% NaCl	-	-	-	+(-)	+(-)
Оптимальная температура культивирования, °С	37	37	37	37	25 или 37
Образование H <sub>2</sub> S на среде с цистеином	+	+	+	+	+
Образование H <sub>2</sub> S на стандартных средах	-	-	-	-	+
Образование индола	-	-	-	-	+
Образование уреазы	-	-	-	-	-
Восстановление нитратов	-	-	-	-	-
β-лактамазная активность	+	+	-	+	+
Ферментация до кислоты:					
мальтоза	+	+	-	+ (-)	+
лактоза	-	-	-	-	-
сахароза	-	-	-	+	+
D-глюкоза	+	+	-	+	+ (-)
глицерин	+	-	+	+ (-)	-
Продукция цитриуллину-реидазы	+	-	+	+	н/д
Продукция индофенолоксидазы	-	-	-	-	+
Продукция каталазы	+	+	+	+	+
Протеолитическая активность	-	-	-	-	+
Агглютинабельность с противотуляремийной сывороткой	+	+	+	+(-)	-
Моль% G+C ДНК	33-36	33-36	33-36	34	33-34
% гомологии по гену 16 S рРНК с <i>F. tularensis</i> ATCC 6223	≥99,8	≥99,8	≥99,8	≥99,8	≥98,3

Наличие гена Ipn, кодирующего синтез белка молекулярной массой 17 kD	+	+	+	+	+
LD50 для кроликов, м.к.	< 101	> 106	> 106	> 106	н/д
Минимальная заражающая доза для мышей, м.к.	< 103	< 103	< 103	–	н/д
Ареал распространения	Только на территории Северной Америки	На территории северного полушария, за исключением Англии, Исландии и Португалии	Район поймы реки Чу и Или (Казахстан) и дельта реки Амударья (Узбекистан).	Территория Северной Америки, единичные случаи в Австралии и Тайланде	Территория Северной Америки

*Примечание: н/д – нет данных, +(-) – признак характерен для большинства выделенных штаммов.*

Липополисахарид туляремийного микроба является основным иммунодоминантным антигеном и мишенью специфического антительного ответа макроорганизма на возбудитель. На выявлении специфических туляремийных антител против эпитопов ЛПС основана серологическая диагностика туляремии у человека и животных. Структура и антигенная специфичность ЛПС бактерий *F. tularensis* трёх основных подвидов (кроме *F. tularensis* subsp. *novicida*) идентична. В отличие от классических эндотоксинов, препараты ЛПС возбудителя туляремии характеризуются биологической инертностью – они являются слабыми индукторами цитокинов и не токсичны для лабораторных животных. Экзотоксин у бактерий туляремии не обнаружен. Для человека высокопатогенен подвид *tularensis*, подвиды *holarctica* и *mediasiatica* умеренно па-



тогенны.

Геном туляремийного микроба представлен хромосомой, размер которой около 1830 т.п.н. У большинства представителей семейства *Francisellaceae* не обнаружены собственные фаги и плазмиды. Исключение составляет только *F.*

*tularensis* subsp. *novicida*, у которой выявлена мелкая криптическая плазида pFN. Для обнаружения ДНК возбудителя туляремии в исследуемом материале используется молекулярно-генетический метод – полимеразная цепная реакция (ПЦР). В основе ПЦР – выявление в геноме возбудителя нуклеотидных последовательностей, детерминирующих факторы патогенности *F. tularensis*. Причина высокой патогенности туляремийного микроба до конца не определена. Из числа возможных факторов вирулентности рассматриваются: липополисахарид (ЛПС), белок размером 23 kD, ферменты биосинтеза пуринов, пептидогликанов, Clp-протеаза теплового шока, белки патогенности Pdp, регуляторные белки MglA и MglB. Все они имеют значение для персистенции патогена в макрофагах – важного этапа в развитии инфекционного процесса. Однако наиболее специфичными из изученных генов являются *forA*, отвечающий за синтез наружной мембраны и *igl ABCD* оперон, кодирующий синтез белка размером 23 kD. Они имеют высокую степень сходства у всех подвидов туляремийного микроба и на их основе осуществляется синтез туляремийных родоспецифичных праймеров для ПЦР.

Генетическую вариабельность подвидов и отдельных штаммов туляремийного микроба связывают с наличием областей дифференциации RD, с вариабельными тандемными повторами (VNTR) и полиморфизмом единичных нуклеотидов (SNP). VNTR- и SNP-типирование

*F. tularensis* позволяет проводить межподвидовую и межштаммовую дифференциацию, устанавливая географическое происхождение возбудителя.

Возбудитель туляремии обладает выраженными аллергизирующими свойствами. Аллергенное действие характерно как для живых, так и убитых бактерий туляремии – различной степени вирулентности. На этом свойстве *F. tularensis* основан аллергический метод диагностики туляремии у человека. Туляремийный микроб патогенен для многих видов животных и человека. Из лабораторных животных высокую чувствительность к туляремии проявляют белые мыши и морские свинки. При подкожном заражении инфицированным материалом белые мыши в среднем погибают на 3–4 сутки, и при вскрытии у них обнаруживают: резкую гиперемию и отечность сосудов подкожной клетчатки; воспалительный инфильтрат в месте введения материала; увеличение, гиперемию и уплотнение регионарных лимфатических узлов, печени, селезенки; гиперемию стенок кишечника.

Морские свинки при подкожном заражении инфицированным материалом погибают на 6–9 сутки. Патологоанатомические изменения в органах морской свинки при гибели от туляремийной инфекции хорошо выражены. При вскрытии у них обнаруживают: гиперемию и отек сосудов подкожной клетчатки, воспалительный инфильтрат с геморрагиями и участками некроза в месте введения материала; резкое увеличение, гиперемию и уплотнение регионарных лимфатических узлов, печени, селезенки. На поверхности и в глубине ткани селезенки, печени хорошо заметны некротические узелки сероватого цвета («саговая селезенка»). В брюшной полости накапливается серозно-геморрагический экссудат.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ

### Занятие 1

#### Приготовление питательных сред для выращивания туляремийного микроба

##### *Среда Мак-Коя*

Свежие куриные яйца тщательно моют щеткой с мылом в теплой воде, обтирают спиртом и быстро обжигают в пламене горелки. Яйцо разбивают, отделяют желток от белка. Желток помещают в стерильный градуированный сосуд и смешивают с физиологическим раствором (рН 7,0–7,2) в соотношении: 60% желтка и 40% физиологического раствора. Полученную смесь разливают стерильной пипеткой по 5 мл в стерильные бактериологические пробирки и свертывают в аппарате Коха в наклонном положении при 80°C в течение ч. Правильно приготовленная желточная среда должна иметь конденсационную жидкость.

Для проверки стерильности среды ее помещают на сутки в термостат при 37°C. Готовая среда хранится в холодильнике при 4°C и используется в течение месяца с момента приготовления.

##### *Среда Анциферова*

Среду Анциферова готовят на основе сухого питательного агара Иркутского научно-исследовательского противочумного института с добавлением 5% желточной смеси.

К 100 мл стерильного расплавленного и остуженного до 45°C агара добавляют 5 мл смеси куриного желтка с физиологическим раствором (рН 7,0–7,2) в соотношении 3:2. Желточную смесь готовят как на среде Мак-Коя. Среду разливают по 5 мл в стерильные пробирки и скашивают в наклонном положении.

Готовую среду помещают в термостат при 37°C на сутки для контроля на стерильность, после чего ис-

пользуют для посевов.

### **Изучение биологических свойств туляремийного микроба**

- Изучение характера роста культуры на средах Мак-Коя и Анциферова.
- Изучение морфологии микроба в мазках, окрашенных по Граму и обработанных туляремийной люминесцирующей сывороткой.
- Окрашивание мазков-отпечатков из органов животных **по Романовскому-Гимза** и их просмотр:
- Постановка ориентировочной реакции агглютинации (ОРА) с туляремийной диагностической сывороткой 1:10.
- Постановка развёрнутой РА с туляремийной диагностической сывороткой 1:50.
- Посев изучаемой культуры в пробирку каждой среды: Мак-Коя, Анциферова, скошенного МПА, скошенного агара с глицерином, на среду с цитруллином.

### **Определение чувствительности выделенной культуры к эритромицину**

Для определения чувствительности выделенной культуры к эритромицину готовят суспензию культуры в концентрации  $10^9$  м.к./мл по оптическому стандарту мутности. 0,3–0,5 мл суспензии равномерно распределяют покачиванием по поверхности среды Анциферова и подсушивают. В центр чашки накладывают диск с эритромицином, содержащий 15 мкг антибиотика. Результат учитывают через 2 суток инкубирования при 37°C.

Культура, чувствительная к эритромицину (I биовар) дает выраженную зону задержки роста вокруг диска. Культура, резистентная к эритромицину (II биовар), равномерно растет по всей поверхности чашки.

## Занятие 2.

### Окончание изучения культуры туляремийного микроба

- Изучение характера роста культуры на средах Мак-Коя и Анциферова.
- Проверка чистоты роста культуры мазком, окрашенным по Граму.
- Учет отсутствия роста изучаемой культуры на МПА.
- Учет ферментации глицерина.
- Определение цитруллинуреидазной активности.
- Учет чувствительности изучаемой культуры к эритромицину.
- Учет и внесение результатов изучения биологических свойств туляремийного микроба в таблицу 18.

Таблица 18

#### Биологические свойства туляремийного микроба

Вид возбудителя	Морфология микроба в мазках по Граму	Рост на среде Мак-Коя	Рост на МПА	Ферментация глицерина	Цитруллинуреидаза	Чувствительность к эритромицину	Серологические свойства	
							МФА	Развернутая РА с туляремийной сыровоткой 1:50

*Примечание: учет результатов изучения биологических свойств туляремийного микроба провести через 48 ч. инкубации.*

### 8.2. Лабораторная диагностика туляремии

Лабораторная диагностика туляремии осуществляется в соответствии с методическими указаниями «Эпидемиологический надзор за туляремией» МУ 3.1.2007–05 и основана на комплексном подходе, направленном на выявление как живых бактерий, так и специфиче-

ских агентов или специфических антител против туляремийного микроба. Однако эффективность диагностики во многом зависит от правильности сбора и доставки исследуемого материала.

При проведении лабораторной диагностики исследуют:

- *от больных людей*: содержимое бубона, материал из зева, конъюнктивы глаза, отделяемое язвы, мокроту, кровь и сыворотку крови;
- *от умерших людей*: увеличенные лимфатические узлы, измененные участки легких и селезенки;
- *при эпизоотологическом обследовании*: диких млекопитающих или их трупов, подснежные гнезда грызунов, продукты жизнедеятельности млекопитающих, погадки птиц, помет хищных млекопитающих, а также солому, мякину, талую воду и другие объекты, загрязненные выделениями грызунов, воду из естественных водоемов и колодцев, гидробионтов, членистоногих (преимущественно иксодовых клещей), мелких эктопаразитов, собранных с млекопитающих (вшей, гамазовых и краснотелковых клещей, блох). При трансмиссивных вспышках исследуют кровососущих двукрылых (комаров, слепней и др.). Серологические исследования сывороток крови домашних животных проводят при соответствующих эпизоотологических и эпидемиологических показаниях.

При исследовании на туляремию в лабораторию поступает патологический материал от больных или переболевших людей, домашних животных, погадки хищных птиц, кровососущие членистоногие (клещи, блохи, вши, комары, слепни и т.д.), объекты окружающей среды (вода, пищевые продукты, зерно, фураж и т.д.).

Лабораторная диагностика туляремии базируется на

серологических (МФА, ИФА, реакция агглютинации, реакция непрямой гемагглютинации, реакция нейтрализации антител), молекулярно-генетических (ПЦР), бактериологических (бак бактериоскопия, посевы на питательные среды), биологических (заражение биопробных животных) и аллергических методах исследования.

Лабораторная диагностика туляремии у людей базируется, главным образом, на сероаллергических методах. Из аллергических методов используют кожную и внутрикожную пробу с тулярином, реакцию лейкоцитолита. Из серологических реакций ставят реакцию агглютинацию (РА), микрореакцию агглютинации с цветным туляреминым диагностикумом, реакцию непрямой гемагглютинации (РНГА), кровяно-капельную реакцию. Бактериологические методы не всегда эффективны, что определяется особенностями течения инфекции у человека, малой обсемененностью органов и тканей возбудителем. Выделение возбудителя наиболее вероятно в течение первых 2–3 недель от начала заболевания и реже в более поздние сроки. В эти же сроки с материалом от больного человека ставят ПЦР.

Домашних животных на туляремию исследуют иммунологическими методами.

При эпизоотологическом обследовании территорий, существенную роль играют серологические методы исследования, позволяющие с меньшими трудозатратами и в короткий срок дать заключение об эпизоотическом состоянии территории. В последние годы находит применение высокочувствительный метод ПЦР, позволяющий по обнаружению специфической ДНК судить о наличии возбудителя туляремии в пробе и выявлять «некультивируемые» формы микроорганизма. В практике эпизоотологического исследования

на туляремию основное место принадлежит бактериологическим методам, обеспечивающим выявление и выделение возбудителя. Отловленных с одной территории животных вскрывают, группируют по 5–10 особей и включают в одну биологическую пробу. При групповом анализе мазки и посевы от каждого зверька не делают. Для серологического исследования от грызунов, отловленных живыми, берут кровь из сердца на обнаружение антител к туляремийному микробу.

Животных, у которых на вскрытии обнаружены характерные для туляремии патологоанатомические изменения, исследуют индивидуально. Просматривают окрашенные по Романовскому-Гимза и обработанные люминесцентной сывороткой мазки-отпечатки из органов. Производят посевы органов на плотные питательные среды. Забирают материал для серологического исследования на обнаружение туляремийного антигена (РНГА, РНАт реакция кольцепреципитации) и на обнаружение специфической ДНК (ПЦР). Ставят индивидуальную биопробу.

Животных, погибших в природе, исследуют индивидуально. Органы трупа, если они не подверглись сильному разложению, засевают на плотные питательные среды с антибиотиками, готовят мазки-отпечатки и заражают биопробных животных. Параллельно ставят серологические реакции на обнаружение туляремийного антигена, ПЦР на обнаружение специфической ДНК. Если на исследование поступает труп грызуна, с выраженными процессами гниения, посевы на питательные среды не делают, а ограничиваются накожным или подкожным заражением белых мышей. В некоторых случаях от трупа исследуют только костный или головной мозг. Павших биопробных животных немедленно вскрывают. Выживших – хлороформиру-



ют (белых мышей на 15 сутки, морских свинок на 25 сутки) и делают посев селезенки на свернутую желточную среду.

Кроме грызунов, биологическим методом исследуют добытых в природе и снятых с грызунов кровососущих членистоногих и других беспозвоночных животных. Иксодовых клещей объединяют до 50 экземпляров в одну биологическую пробу. Гамазовых клещей, блох, вшей сортируют по родам, видам и группируют в отдельные пробы. Комаров объединяют до 100, мошек до 250, слепней по 25–50 экземпляров на одну биопробу.

Объекты окружающей среды также исследуют биологическим методом. Непосредственный посев материала на питательные среды не эффективен в виду его незначительной обсемененности возбудителем и загрязнением посторонней микрофлорой, подавляющей рост микроба туляремии. В этом случае можно использовать высокоселективные среды с антибиотиками. Идентификацию возбудителя туляремии проводят на основании следующих признаков:

- морфологии и окраски микроба в мазках;
- специфического свечения в МФА;
- характера роста на плотных питательных средах;
- отсутствия роста на простых питательных средах (МПА, МПБ);
- РА со специфической туляремийной сывороткой;
- выявление родоспецифичной ДНК в ПЦР;
- патогенности для лабораторных животных (белые мыши, морские свинки).

Культура должна иметь характерный для микроба туляремии рост на плотных питательных средах (Мак-Коя, Анциферова, FT-агаре и др.), не расти на простых питательных средах (кроме *F. tularensis* subsp. *novici-*

*da*), агглютинироваться диагностической туляреминой сывороткой до титра или до 1/2 титра, вызывать гибель биопробных животных. Выделенные штаммы желательно типировать до подвида и дифференцировать на биологические варианты.

К серологическим методам диагностики туляремии относятся:

- реакции, направленные на выявление антител к туляреминому микробу (кровяно-капельная, РА, РНГА, РТНГА и др.);
- реакции, направленные на выявление антигенов туляреминого микроба (РНАт, кольцепреципитации, МФА, РА, РНГА, РТНГА и др.).

Серологические реакции используют для обследования и выявления природных очагов туляремии, для диагностики туляремии у людей. С целью рекогносцировочного обследования значительных территорий используют реакции, направленные на выявление антигенов туляреминого микроба в исследуемом материале.

Серологически исследуют материал, который не содержит живых туляреминых бактерий и непригоден для бактериологического исследования: от диких позвоночных животных, погадки хищных птиц, помет хищных млекопитающих, субстраты гнёзд грызунов, почву и т. д.

На антитела к туляреминому микробу исследуют сыворотки грызунов, добытых при эпизоотологическом обследовании территории, сельскохозяйственных животных, больных или переболевших туляремией людей.

К аллергическим методам относится:

- реакции *in vivo* – внутрикожная и накожная туляриновые пробы;
- реакции *in vitro* – лейкоцитолитиза, показатель повреждения нейтрофилов (ППН), бласттрансформа-

ции и др.

Экспрессные и ускоренные методы поиска антигена (РА, РНГА, РТНГА, реакции кольцепреципитации, МФА, ИФА) в исследуемом материале или антител к нему (РНAt, РА, РНГА, РТНГА, кровяно-капельная реакция, МФА, ИФА), а также обнаружение специфической ДНК возбудителя (ПЦР) позволяют получить результат в течение 2–5 ч.

При использовании экспрессных и ускоренных методов диагностики получают лишь предварительный результат, который должен быть подтвержден выделением чистой культуры возбудителя туляремии.

Современные методы исследования позволяют быстро и в определенной степени надежно поставить диагноз туляремии у человека и осуществить выявление возбудителя при обследовании территорий.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ**

### **Занятие 3**

#### **Исследование грызунов:**

- Вскрытие трупа грызуна:
  - изучение патологоанатомических изменений внутренних органов;
  - приготовление и исследование мазков-отпечатков из органов трупа грызуна, обработанных туляремийной люминесцирующей сывороткой;
  - исследование в реакции кольцепреципитации суспензии органов (печень, селезенка) трупа грызуна;
  - постановка из суспензии внутренних органов трупа грызуна индивидуальной биологической пробы (п/к заражением белых мышей);
- Вскрытие отловленного грызуна с патологоанатомическими изменениями во внутренних органах, характерных для туляремии:

- изучение патологоанатомических изменений во внутренних органах грызуна;
- приготовление и просмотр мазков-отпечатков из органов грызуна, окрашенных по Романовскому-Гимза;
- посев на среды Мак-Коя и Анциферова лимфатического узла, крови, печени, селезенки;
- постановка из суспензии внутренних органов грызуна индивидуальной биологической пробы (п/к заражением белых мышей);
- Вскрытие отловленных грызунов без патологоанатомических изменений во внутренних органах:
  - постановка из суспензии внутренних органов грызунов биологической пробы (п/к заражением белых мышей).

*Примечания:*

- работа по заражению и вскрытию животных проводится курсантами в лаборатории экспериментальных животных;
- методы исследования диких грызунов отрабатываются на заранее зараженных возбудителем туляремии белых мышах;
- павших биопробных животных вскрывают медленно.

**Исследование воды:**

Вскрытие морской свинки, зараженной подкожно исследуемой водой:

- изучение патологоанатомических изменений во внутренних органах;
- приготовление и исследование мазков-отпечатков из внутренних органов морской свинки, обработанных туляреминой люминесцирующей сывороткой;
- посев печени, селезенки и пахового лимфатиче-

ского узла на среды Мак-Коя и Анциферова.

*Примечание: морскую свинку курсанты заражают исследуемой водой заранее с учетом сроков гибели.*

#### **Занятие 4**

##### **Продолжение исследования грызунов. Выделение чистой культуры**

- Просмотр посевов на средах Мак-Коя и Анциферова.
- Отбор подозрительных на туляремию культур, проверка её мазком, окрашенным по Граму, и в ОРА с туляремийной диагностической сывороткой 1:10, пересев на две пробирки каждой среды: Мак-Коя, Анциферова и скошенного МПА.

##### **Продолжение исследования воды. Выделение чистой культуры**

- Просмотр посевов на средах Мак-Коя и Анциферова.
- Отбор культуры, подозрительной на туляремию, проверка её мазком, окрашенным по Граму, и в ОРА с туляремийной диагностической сывороткой 1:10, пересев на две пробирки каждой среды: Мак-Коя, Анциферова и скошенного МПА.

#### **Занятие 5**

##### **Продолжение исследования грызунов. Идентификация культуры**

- Просмотр посевов на средах Мак-Коя и Анциферова.
- Проверка на чистоту роста культуры мазком, окрашенным по Граму.
- Учет отсутствия роста на скошенном МПА.
- Постановка развернутой РА с выделенной культурой и туляремийной диагностической сывороткой 1:50.
- Посев выделенной культуры в пробирку со средой Мак-Коя, скошенного агара с глицерином, среду с

цитруллином.

- Определение чувствительности выделенной культуры к эритромицину.

### **Продолжение исследования воды. Идентификация культуры**

- Просмотр посевов на средах Мак-Коя и Анциферова.
- Учет отсутствия роста на скошенном МПА.
- Проверка на чистоту роста культуры мазком, окрашенным по Граму.
- Постановка развернутой РА с выделенной культурой и туляремийной диагностической сывороткой 1:50.

*Примечание: окончательный учет результатов развернутой РА с туляремийной диагностической сывороткой через 18–24 ч.*

## **Занятие 6**

### **Окончание исследования грызунов и воды**

- Просмотр посевов на среде Мак-Коя, скошенном агаре с глицерином, на среде с цитруллином.
- Проверка на чистоту роста культуры мазком, окрашенным по Граму.
- Регистрация чувствительности выделенной культуры к эритромицину.
- Заполнение паспорта на выделенные культуры.

*Примечание: обеззараживание всех имеющихся посевов культур, выделенных от грызунов и из воды.*

## **Серологические методы исследования на туляремию**

## **Занятие 7**

### **Серологическая диагностика туляремии у человека**

- Постановка развернутой РА с сывороткой больного и туляремийным диагностикумом. Предваритель-

ный учет развернутой РА через 1 ч, окончательный - через 18–24 ч.

- Постановка РНГА и РТНГА с сывороткой больного и туляремийным эритроцитарным антигенным диагностикумом. Учет результатов РНГА и РТНГА через 2 ч.
- Постановка кровяно-капельной РА с кровью больного и туляремийным диагностикумом

Реакцию применяют для экспрессной серологической диагностики туляремии у людей. В качестве антигена используют туляремийный диагностикум из микробов вакцинного штамма, убитых формалином (1 мл диагностикума содержит 25 млрд. м. кл.).

В чашке Петри смешивают каплю исследуемой крови и каплю дистиллированной воды для получения гемолиза эритроцитов. Затем к крови добавляют каплю диагностикума и перемешивают. Реакция агглютинации наступает немедленно, если в сыворотке крови больного содержатся антитела с диагностическим титром 1:100 и выше. Реакция бывает слабо выраженной и появляется в течение 5 мин, если в сыворотке крови больного содержатся антитела в более низком титре (1:50).

#### **Исследование погадок хищных птиц**

- Определение двух минимальных сывороточных единиц (2 СЕ) туляремийной диагностической сыворотки и постановка РНАт с материалом из погадок хищных птиц и туляремийным эритроцитарным антигенным диагностикумом.

*Примечание: погадки хищных птиц курсанты получают предварительно подготовленными к исследованию.*

## **Занятие 8**

### **Окончание исследования погадок хищных птиц**

Учет РНАт с материалом из погадок хищных птиц.

**Аллергические методы исследования на туляремию.**

Исследование крови больного на туляремию в реакции лейкоцитоллиза.

Эта реакция основана на учете разрушения лейкоцитов сенсibilизированного организма под влиянием специфического аллергена. Реакция лейкоцитоллиза становится положительной к 3–4 дню с момента заболевания или вакцинации,

В две лунки полистироловой пластины вносят по 50 мкл 5% раствора цитрата натрия. Кровь для исследования берут у людей из пальца в объеме 200 мкл с помощью микропипетки и вносят по 100 мкл в обе лунки, в первую (опытную) лунку вносят 100 мкл кожного тулярина, во вторую (контрольную) – 100 мкл физиологического раствора (рН 7,2). Содержимое лунок перемешивают стеклянной палочкой, пластину закрывают и помещают на 2 ч в термостат при 37°C. Через 2 ч содержимое опытной лунки перемешивают, микропипеткой набирают 20 мкл и переносят в лунку, содержащую 400 мкл 3% уксусной кислоты, подкрашенной метиленовой синькой до светло-голубого цвета. То же проделывают с кровью из контрольной лунки. Затем производят подсчет лейкоцитов в камере Горяева. Разрушенные клетки, а также собирающиеся в кучки лейкоциты не учитывают. Коэффициент лейкоцитоллиза вычисляют по формуле:

$$K\% = \frac{mk - mo}{mk} \times 100\%$$

mk – количество лейкоцитов в контрольной лунке;

mo – количество лейкоцитов в опытной лунке.

Полученные результаты оценивают по шкале:

K – 15% и ниже – отрицательный или сомнительный;

K – от 16% до 20% – слабо положительный;

K – от 21% до 30% – положительный;

K – выше 30% – резко положительный.



## Молекулярно-генетические методы исследования

Одним из основных генетических методов, используемых в настоящее время при исследовании на туляремию, является полимеразная цепная реакция (ПЦР). Она даёт возможность с высокой надёжностью и в максимально сжатые сроки определить наличие возбудителя в пробах и начать своевременное проведение противоэпидемических мероприятий.

Сущность полимеразной цепной реакции состоит в избирательной амплификации определённых последовательностей, присутствующих в исследуемой ДНК. ПЦР представляет собой многократно повторяющиеся циклы синтеза (амплификацию) специфической области ДНК-мишени в присутствии термостабильной ДНК-полимеразы, соответствующего солевого буфера, дезоксинуклеозидтрифосфатов и олигонуклеотидных затравок-праймеров, определяющих границы амплифицируемого участка ДНК-мишени. Реакцию проводят циклически, многократно (на протяжении 25-40 циклов), повторяя три этапа реакции в приборе, называемом термоциклером. В каждом цикле происходит удвоение числа копий амплифицируемого участка, что позволяет наработать фрагмент ДНК, ограниченный парой выбранных праймеров, в количестве, достаточном для её детекции с помощью электрофореза. В настоящее время для постановки ПЦР используют генодиагностические препараты, в основе которых лежит амплификация *iglABCD*, *fopA* или других видоспецифичных генов туляремиального микроба. К таким препаратам относятся экспериментальные серии «ГенТул» – тест системы для выявления ДНК *F. tularensis* методом ПЦР» (производства ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб») и «АмплиСенс *F. tularensis* –FRT» – набора реагентов для выявления ДНК *F. tularensis*

в биологическом материале и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» (производства ФГУН ЦНИИ эпидемиологии, г. Москва).

Не допустимо применение для генной диагностики туляремии праймеров, комплементарных гену *16 S* рРНК и гену *lpn*, кодирующему синтез предшественника мембранного белка молекулярной массы 17 kD. Это связано с тем, что установлена высокая гомология этих генов у туляремиального микроба и *F. philomiragia*, *Wolbachia persica* и других эндосимбионтов клещей родов *Amblyomma*, *Ornithodoros* и *Dermacentor*.

К исследуемым образцам добавляют мертиолят натрия до конечной концентрации 1:10000 (0,01%) с последующим прогреванием их при 56 °С в течение 30 мин. После обработки мертиолятом натрия 100 мкл образца переносят в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл, добавляют лизирующий раствор на основе 6М гуанидинтиоизоцианата в объеме, указанном в инструкции к тест-системе, и инкубируют 15 мин при температуре 65 °С. После выполнения данного этапа материал считается обеззараженным.

Выделение ДНК, проведение ПЦР и учет результатов осуществляют в соответствии с инструкцией по применению.

Выявление фрагмента соответствующего по размеру фрагменту положительного контроля или наличие в пробе специфической флуоресценции по соответствующим каналам указывает на наличие в пробе ДНК туляремиального микроба.

## Занятие 9

### Исследование материала для выявления ДНК возбу-

## дителя туляремии с использованием ПЦР

Занятие включает три последовательных этапа, которые выполняются в течение одного полного учебного дня.

Для постановки реакции используется тест-система, разработанная в Российском научно-исследовательском противочумном институте «Микроб». Тест-система предназначена для выявления возбудителя *F. tularensis* в клиническом материале и объектах внешней среды при помощи системы праймеров, комплементарных участку гена, кодирующего белок молекулярной массой 23 kD. Принцип реакции заключается в многократно повторяющихся циклах синтеза (амплификации) специфичной области ДНК-мишени в присутствии термостабильной ДНК-полимеразы, дезоксинуклеозидтрифосфатов (дНТФ), соответствующего солевого буфера и олигонуклеотидных затравок – праймеров, определяющих границы амплифицируемого участка ДНК. Каждый цикл включает в себя три стадии с различными температурными режимами. На первой стадии при 94°C происходит разделение цепей ДНК, затем при 53°C – присоединение (отжиг) праймеров к гомологичным последовательностям на ДНК-мишени, на третьей стадии при температуре 72°C – синтез новых цепей ДНК путём удлинения праймеров в направлении 5' – 3' конца. В каждом цикле происходит удвоение числа копий амплифицируемого участка, ограниченного парой выбранных праймеров, что позволяет за 35 циклов наработать ДНК в количестве, достаточном для её детекции с помощью электрофореза.

Материалом для исследования могут быть пробы от больного (пунктат из бубона, соскоб из зева, отделяемое из глаза и др.), пробы из окружающей среды (вода, смывы, суспензии органов грызунов, кровь, кровососущие членистоногие и др.), бактериальные культуры.

Отбор проб осуществляется с соблюдением правил асептики, стерильным инструментом в одноразовые ёмкости. Обеззараживание материала, подлежащего исследованию, проводят согласно МУ 3.5.5-1034-01 мертиолятом натрия (1:10000) с последующей обработкой лизирующим буфером с гуанидинтиоцианатом и прогреванием при 65 °С в течение 15 мин.

Пробы крови, содержимого бубона, мазков из зева и с конъюнктивы глаза, отделяемого язвы исследуют без предварительной подготовки, отбирая для анализа по 0,1 мл нативного материала в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл.

К мокроте (1–2 мл) добавляют равный объем приготовленной *ex tempore* смеси NALC (0,25 г N-ацетил-L-цистеина, 25 мл 4% раствора NaOH, 25 мл 0,1 М тризамещенного цитрата натрия или набор Муколизин, ИнтерЛабСервис). Перемешивают покачиванием в течение 20–30 с. Смесь инкубируют в течение 15 мин при комнатной температуре, а затем разводят 0,067 М фосфатным буфером (рН 6,8) до 50 мл. Центрифугируют в течение 15 мин при 10000 об/мин. Осадок используют для выделения ДНК.

Кусочки органов массой до 10 г растирают в стерильной ступке со стеклянным порошком, после чего добавляют 0,9 % раствор натрия хлорида в соотношении 1:5 (вес/объем). Надосадочную жидкость отбирают с помощью пипетки через ватный тампон в отдельную пробирку. Центрифугируют в течение 15 мин при 12000 об/мин, осадок суспендируют в физиологическом растворе и используют для выделения ДНК. Подготовку гидробионтов осуществляют аналогичным образом.

Блох перед исследованием усыпляют эфиром, нанося каплю эфира на ватно-марлевую пробку. Ссыпают в стерильную ступку, куда вносят 0,5 мл 0,9% раствора

натрия хлорида и растирают. Затем с помощью пипетки через ватный тампон в отдельную микропробирку отбирают надосадочную жидкость, из которой проводят выделение ДНК.

Пробы клещей, объединенных по 5–50 шт., комаров, объединенных по 50–100 шт. (в зависимости от вида, точки сбора, упитанности и т.д.), растирают в охлажденной стерильной фарфоровой ступке с 0,5–1,0 г охлажденного стерильного стеклянного порошка, добавляют 1–2 мл охлажденного 0,9% раствора натрия хлорида. Затем переносят по 1,0 мл жидкой фазы в пластиковые микропробирки объемом 1,5 мл. Подготовленные образцы центрифугируют при 12000 об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость используют для выделения ДНК, для чего отбирают 0,1 мл образца.

Отобранные навески соломы и мякины измельчают при помощи ножниц и пинцета на листе бумаги, затем помещают в банки. К исследуемому материалу добавляют 0,9% раствор натрия хлорида 1:10, тщательно перемешивают в течение 15 мин, отстаивают в течение 10 мин для оседания крупных частиц. Надосадочную жидкость дробно центрифугируют: первоначально в течение 2–3 мин при 5000 об/мин, затем супернатант центрифугируют в течение 15 мин при 12000 об/мин. Осадок суспендируют в 0,2–0,5 мл дистиллированной воды. Подготовку гнезд грызунов осуществляют аналогичным образом.

Пробы погадок птиц и помета хищных млекопитающих суспендируют в физиологическом растворе из расчета 1:9 (1 часть пробы + 9 частей физиологического раствора). Для исследования отбирают 1 мл суспензии и переносят в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл. Пробирки центрифугируют при 5000 об/мин в течение 5 мин. Отдельным наконечником с

аэрозольным барьером из каждой пробирки отбирают надосадочную жидкость и переносят в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл. Затем центрифугируют при 12000 об/мин в течение 15 мин, надосадочную жидкость удаляют. Осадок ресуспендируют в 0,1 мл 0,9% раствора натрия хлорида и используют для исследования.

Пробы воды открытых водоемов объемом 1,0 л дробно центрифугируют. Первоначально в течение 15 мин при 10000–12000 об/мин. Полученный осадок ресуспендируют в 0,5 мл физиологического раствора, помещают в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл и центрифугируют при 2000–5000 об/мин в течение 1 мин. Надосадочную жидкость отбирают наконечником с аэрозольным барьером в микропробирку объемом 1,5 мл. Для выделения ДНК используют 0,1–0,2 мл надосадочной фракции.

Для проведения амплификации готовят необходимое количество микропробирок V-0,6 мл, соответствующее числу проб, а также две микропробирки для положительного и отрицательного контролей. Реакционную смесь готовят в отдельной пробирке из расчёта на одну пробу:  $H_2O$  – 7,0 мкл, 10ХБ – 2,5 мкл, дНТФ – 2,5 мкл,  $MgCl_2$  – 1 мкл, праймеров FT23s1 и FT23a1 – по 1 мкл каждого, фермента Taq-полимеразы – 0,2 мкл. Во все пробирки вносят по 15 мкл реакционной смеси и добавляют 30 мкл (1 капля) минерального масла. Все манипуляции осуществляют при 4–5°C.

В соответствующие пробирки для проведения амплификации, используя одноразовые наконечники, вносят под масло по 10 мкл подготовленных проб. В пробирку, помеченную как положительный контроль, вносят 2 мкл контрольной ДНК (1 нг/мкл) и 8 мкл  $H_2O$ ; в отрицательный контроль – 10 мкл  $H_2O$ . Все подготовлен-

ные микропробирки центрифугируют 20 сек при 2000 об/мин и помещают в амплификатор. Проводят ПЦР в следующем температурном режиме: денатурация при 94°C в течение 3 мин; затем 35 циклов: 94°C – 40 сек, 53°C – 40 сек, 72°C – 40 сек, в заключение проводят дополнительный цикл при 72°C в течение 5 мин.

Продукты ПЦР анализируют методом гель-электрофореза в 1,5% агарозе, которую готовят на ТАЕ-буфере с бромистым этидием (состав ТАЕ-буфера: трис-НСl – 4,84 г; ледяная уксусная кислота – 1,2 мл; раствор ЭДТА в концентрации 0,5 М; бромистый этидий – до конечной концентрации 0,5 мкг/мл, общий объем доводят дистиллированной водой до 1 литра, рН 8,0).

К 10–20 мкл ПЦР-продукта добавляют 1–2 мкл 10-кратного буферного раствора, содержащего: бромфеноловый синий – 0,25%, фиколл – 25% в дистиллированной воде. Подготовленные смеси вносят в лунки агарозного геля.

Окрашенный бромистым этидием гель просматривают под ультрафиолетовым излучением, для чего используют трансиллюминатор с максимальной длиной волны 254 нм. Анализируемые фрагменты проявляются в виде светящихся розово-красных полос.

При оценке результатов в отрицательном контроле полосы должны отсутствовать, в положительном контроле выявляется полоса фрагмента размером 548 н.п., в анализируемых пробах отсутствие полосы строго на уровне положительного контроля свидетельствует об отрицательном ответе, а наличие полосы, соответствующей по электрофоретической подвижности положительному контролю – свидетельствует о наличии в пробе ДНК *F. tularensis*.



## 9. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ

### 9.1. Биологические свойства возбудителя сибирской язвы

Сибирская язва является острым инфекционным заболеванием человека и животных (домашних и диких).

Основным источником инфекции при сибирской язве являются больные травоядные животные. Они в течение всего периода болезни выделяют возбудителя с мочой, испражнениями и слюной в почву, инфицируя ее, поэтому почва, особенно богатая органическими веществами, становится дополнительным резервуаром возбудителя. Заражение животных происходит главным образом элементарным путем (через корм и питьевую воду, зараженные спорами), реже – трансмиссивным – через укусы кровососущих насекомых и воздушным путем.

Заражение человека сибирской язвой происходит при непосредственном контакте с трупами погибших животных, при разделке туш вынужденно убитых животных, при уходе за больными животными, при употреблении мяса или мясных продуктов, полученных от больных животных, при контакте с шерстью, шкурами, кожей, щетиной, зараженными возбудителем или его спорами.

Возбудитель сибирской язвы *Bacillus anthracis* относится к семейству *Bacillaceae*, роду *Bacillus*. Это крупная палочка длиной 5-8, иногда до 10 мкм, диаметром 1,0–1,5 мкм. Концы у живых палочек слегка закруглены, у убитых они как бы обрублены и слегка вогнуты. Палочки в мазках располагаются цепочками напоминая бамбуковую трость. Сибиреязвенная палочка хорошо красится всеми анилиновыми красителями, грамположительна. Жгутиков не имеет, образует споры, но только вне организма человека или животного



при наличии кислорода и определенной влажности. Оптимум для спорообразования 30-35 °С (ниже 12°С и выше 43°С спорообразования не происходит). Споры располагаются центрально, их диаметр не превышает диаметра бактериальной клетки. Образование спор происходит в тех случаях, когда бактерии испытывают дефицит источников энергии. Поскольку в крови и тканях источники питания бактерий имеются, спорообразования в организме не происходит. Возбудитель сибирской язвы образует капсулу (рис.21), но только в организме животного и человека или на специальных питательных средах. Капсулообразование патогенных бактерий – защитный механизм.



Рис.21. Капсула возбудитель сибирской язвы *Bacillus anthracis*

Возбудитель сибирской язвы – аэроб или факультативный анаэроб. Температурный оптимум для роста 37 – 38°С, рН среды 7,2 – 7,6. К питательным средам не требователен. На плотных средах образует характерные крупные матовые шероховатые колонии R-формы. Структура колоний, благодаря цепочечному расположению палочек, которые образуют нити, отходящие от центра, имеют сходство с локонами или львиной гривой (рис.22).



Рис.22. Морфология колонии *Bacillus anthracis*.

На агаре и в бульоне, содержащем пенициллин (0,05 – 0,5 ЕД/мл), через 3 ч инкубации бациллы образуют цепочки из шарообразных клеток - феномен «жемчужного ожерелья». В бульоне палочка, находящаяся в R-форме, растет на дне, образуя осадок в виде комочка ваты, бульон при этом остается прозрачным. *B. anthracis* вирулентна в R-форме, при переходе в S-форму она утрачивает свою вирулентность. Такие палочки на плотной среде образуют круглые гладкие колонии с ровными краями, а в бульоне – равномерное помутнение. При этом палочки утрачивают способность располагаться в мазках цепочками и приобретают вид коккобактерий.

Основные свойства, выделяющие сибирезвездный микроб в отдельную систематическую единицу и обуславливающие патогенез заболевания, заключаются в его факторах патогенности – способности клетки синтезировать сложнокомпонентный экзотоксин и капсулу – полипептид d-глутаминовой кислоты. Гены, кодирующие синтез экзотоксина и капсулы, локализованы на плаزمиде РХ О1 и РХ О2 м.м. 110 и 60 мДа, соответственно. У близкородственных бацилл эти плазмиды не обнаружены. Токсин, секретируемый *B. anthracis*, состоит из трех белковых компонентов, биологическая активность которых проявляется при их сочетанном действии. Согласно принятой классификации, компоненты токсина обозначены как отечный

фактор (ОФ), протективный антиген (ПА) и летальный фактор (ЛФ). Установлено, что ОФ является ферментом - аденилатциклазой (цАТФ пиррофосфатлиаза), который в неактивной форме продуцируется бактериальной клеткой и способствует повышению уровня цАМФ более чем в 200 раз. Активация аденилатциклазы в клетках макроорганизма происходит под воздействием Са-связывающего белка - кальмодулина. Роль ПА заключается в создании рецепторной системы, через которую проникают ОФ и ЛФ. Кроме того, ПА способствует выработке в организме восприимчивого животного и человека специфических иммуноглобулинов, т.е. участвует в формировании антитоксического иммунитета. ЛФ проявляет цитотоксический эффект и вызывает отек легких.

Генетические детерминанты факторов патогенности сибиреязвенного микроба подробно изучены в результате клонирования генов отечного, протективного, летального компонентов токсина и капсулы, определения их нуклеотидных последовательностей, создания моделей возможных механизмов их регуляции. Наиболее распространенными подходами к генетическому типированию штаммов сибиреязвенного микроба являются определение плазмидного профиля штаммов, гибридизационный и ПЦР-анализ ДНК, которые в преимущественном большинстве случаев позволяют установить различия между полностью вирулентными штаммами, несущими гены факторов патогенности и штаммами со сниженной вирулентностью, частично или полностью утратившими детерминанты факторов патогенности.

Кроме возбудителя сибирской язвы, токсинообразующей способностью обладает *B. cereus*, который продуцирует растворимый диаррогенно-летальный токсин,

вызывающий гибель мышей, крыс, грызунов, кроликов в течение 5-30 минут, у людей вызывает пищевую токсикоинфекцию, кератит, эндофтальмит, паноптальмит, эндокардит, менингит, остеомиелит и пневмонию.

Существует ряд отличительных признаков, позволяющих дифференцировать *B. anthracis* от близкородственных микроорганизмов: капсулообразование, лизис культуры под действием специфических сибиреязвенных бактериофагов, положительная проба с пенициллином (тест «жемчужное ожерелье»), специфическое свечение при исследовании люминесцентно-серологическим методом, отсутствие фосфатазной и лецитиназной активности, роста в условиях культивирования при температуре 45°C и др.

Дифференциальные признаки *B. anthracis* и *B. cereus* (типовой штамм 504 Т) приведены в таблице 19. Наличие 3 положительных тестов, в числе которых один из признаков патогенности, дает возможность отнести культуру к возбудителю сибирской язвы.

Таблица 19  
Дифференциальные признаки *B. anthracis* и *B. cereus*

Вид возбудителя	Рост на бульоне	Подвижность	Наличие капсулы	Гемолиз	Протеолитическая активность (разжижение желатина)	Лецитиназная активность	Фосфатазная активность	Пенициллиназная активность	Феномен «жемчужного ожерелья»	Лизис сибиреязвенным фагом	Патогенность для животных (б/м и м/с)	Специфическое свечение при обработке ФА
<i>B. anthracis</i>	бульон прозрачен, осадок на дне (комочки ваты)	-	+	±	±	±	±	-	+	+	+	+ (свечение на 3+ и 4+)

В. cereus	бульон мутный (разбивающийся крошковатый осадок)	+	-	+	+	+	+	+	-	-	±	-

*Примечание:*

+ - положительный признак

- - отрицательный признак

± - в редких случаях, в поздние сроки (3-4 сут выращивания)

## ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ

### Занятие 1.

#### Изучение биологических свойств *B. anthracis* и *B. cereus*

- Изучение характера роста культур на скошенном мясопептонном агаре.
- Изучение морфологии микробов в мазках, окрашенных по Граму.
- Посев 24-часовых агаровых культур в мясопептонный бульон, 0,3% полужидкий агар, желатин, жидкую среду с желтком, на одну из капсулообразующих сред (скошенный молочно-солевой агар, среду ГКИ, скошенную среду Леффлера), на 2 чашки МПА, чашку МПА с желтком, чашку МПА с фенолфталеинфосфатом натрия и чашку 5% кровяного агара.

*Примечания:*

- посевы в желатине оставить при комнатной температуре;
- посев на капсулообразующей среде поместить в CO<sub>2</sub>-инкубатор и выращивать при 37 °С в течение 24 ч;
- остальные посевы поместить при 37 °С.

## Занятие 2.

### Изучение биологических свойств *B. anthracis* и *B. cereus*

- Изучение суточного роста:
  - а) просмотр колоний на МПА, в том числе морфологии колоний под микроскопом;
  - б) изучение характера роста в МПБ.
- Изучение морфологии микроба в мазках, окрашенных по Граму, приготовленных с МПА и МПБ.
- Изучение подвижности в 0,3% ПЖА.
- Изучение гемолитической активности на 5% кровяном агаре.
- Изучение лецитиназной активности на:
  - а) жидкой среде с желтком,
  - б) на агаре с желтком.
- Изучение протеолитической активности и характера роста в желатине.
- Изучение фосфатазной активности на МПА с ФФФ.

Наличие или отсутствие фосфатазной активности определяют на питательной среде с фенолфталеинфосфатом натрия, на которую штрихами засевают суточную агаровую культуру для получения изолированных колоний. Через 18-20 ч инкубации при 37 °С на крышку чашки Петри вносят 1-2 мл 25%-ного водного раствора аммиака. Чашку (крышкой вниз) выдерживают в течение 1 мин при 20±2°С, после чего визуально проводят учет теста (крышку при этом заменяют). Большинство сибиреязвенных штаммов не способны вырабатывать фосфатазу и, следовательно, разлагать фенолфталеинфосфат натрия. Спорообразующие сапрофиты разлагают фенолфталеинфосфат натрия с образованием индикатора фенолфталеина. Выросшие на питательной среде колонии *B. anthracis* после добавления аммиака, имеющего щелочную реакцию, остаются

ся бесцветными, а колонии спорообразующих сапрофитов окрашиваются в розовый или красный цвет.

- Изучение способности к капсулообразованию: из культур, выращенных на капсулообразующих средах в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе, приготовление мазков и окрашивание по методу Гинса.
- Изучение чувствительности к пенициллину:
  - а) посев стандартной бактериологической петлей суточные бульонные культуры на чашки МПА, содержащие 10 и 50 ЕД/мл пенициллина в 1 мл среды;
  - б) постановка теста «жемчужное ожерелье» методом Груз (приложение);
  - в) постановка теста «жемчужное ожерелье» методом посева на чашки МПА с пенициллином. Контроль - агар без пенициллина.
- Изучение чувствительности к сибирезвенному бактериофагу. При постановке пробы с фагом используют 3-6-часовую бульонную культуру, которую наносят пипеткой на пластинчатый МПА и в центр подсохшей капли петлей наносят бактериофаг. Учет через 6-24ч.

*Примечания:*

- работа начинается с посева культур в пробирку с МПБ и в пробирку МПБ с 0,5 ЕД/мл пенициллина для постановки теста «жемчужное ожерелье»;
- посевы в желатине оставляют при комнатной температуре.

### **Занятие 3.**

**Изучение биологических свойств *B. anthracis* и *B. cereus***

- Регистрация чувствительности к сибирезвенному бактериофагу.

- Регистрация чувствительности к пенициллину (рост на агаре с пенициллином в концентрации 10 и 50 ЕД/мл).
- Изучение протеолитической активности (характер роста в желатине).
- Изучение способности к спорообразованию:
  - а) приготовление мазков из 3-суточных агаровых культур;
  - б) окрашивание мазков по методу Пешкова или другим способом.
- Обеззараживание всех имеющихся в наличии культур;
- Заполнение журналов движения культур и учета ПБА, находящихся в рабочей коллекции
- Составление акта на уничтожение культуры возбудителя сибирской язвы.

## **9.2. Лабораторный диагноз**

Современная лабораторная диагностика сибирской язвы включает бактериоскопический, бактериологический, биологический, аллергический и серологический методы.

Лабораторное исследование при сибирской язве проводят с целью выявления возбудителя, фрагментов ДНК или специфических антигенов от больного человека (содержимое везикул, карбункулов, отделяемое язв, струп, мокрота, кровь), из органов павших животных, кожевенного сырья, шерсти и объектов окружающей среды (почва, вода, смывы, сточные воды, воздух и т.д.).

Материал от больных людей, из объектов окружающей среды, сырье животного происхождения забирают в стерильные пробирки, банки или другую лабораторную посуду. Кровь для исследования берут из вены в пробирку, засевают в питательную среду и делают два тонких мазка на предметных стеклах. Материал



следует отбирать так, чтобы полностью исключить возможность рассеивания заразного начала. С соблюдением строжайших мер предосторожности, согласно ветеринарной инструкции Министерства сельского хозяйства от 5 июня 1981 г. № 115/6 А «О мероприятиях против сибирской язвы», можно произвести отсечение уха у трупа животного с той стороны, на которой оно лежит, и направить его на исследование. Для этого ухо крепко перевязывают выше и ниже предполагаемой линии среза, место среза прижигают. Ухо заворачивают в пергаментную бумагу и полиэтиленовую пленку, упаковывают в металлическую коробку или ящик.

Сырье животного происхождения (шерсть, волосы, щетина) направляют для исследования в количестве не менее 30 г. Почву отбирают в количестве 50-70 г на пробу, воду на исследование направляют в объеме не менее 1 л. Отбор проб воздуха в количестве 50- 250 л производят с помощью приборов Кротова, Дьяконова, Речменского, Киктенко, каскадных импакторов.

Смывы с объектов окружающей среды рекомендуются брать тампоном, смоченным 0,9% раствором хлористого натрия, и помещать в стерильную посуду с плотно закрывающейся крышкой.

На объекты, подлежащие исследованию, составляют сопроводительный документ с указанием места, времени, даты забора и подписи взявшего материал. В лабораторию анализа направляют в пломбированных или опечатанных герметических деревянных или железных ящиках с нарочным.

Из исследуемого субстрата готовят несколько мазков. Окраску производят по Граму (на вегетативные клетки) и Пешкову (на споры). Бактериоскопию сочетают с люминесцентно-серологическим анализом. В мазках споры выявляются в виде овальных или круглых об-

разований, окрашенных в голубой или синий цвет. В мазках от больного или трупа человека и животных возбудитель сибирской язвы определяется в виде характерных крупных палочек, окруженных капсулой (окрашивание по Гинсу). По результатам микроскопического исследования немедленно дают предварительный ответ.

Не загрязненный посторонней микрофлорой патологический материал от больного засевают на МПА и в пробирки с МПБ.

Загрязненный материал (кусочки органов трупа, мокроту, испражнения, кожу, шерсть, зерно, фураж, почву, мясные продукты, щетину) заливают 5-10-кратным количеством стерильной воды или 0,9% раствором хлористого натрия. Полученную взвесь разливают в две пробирки. Одну пробирку с материалом прогревают на водяной бане при 65 °С в течение 30 мин с целью уничтожения вегетативных форм.

Подготовленный для исследования материал (не прогретый и прогретый) засевают на чашки с МПА; МПА, содержащим 5% дефибрированной крови барана; МПА, содержащим 0,01% ФФФ. Посевы помещают в термостат при температуре 37 °С.

Исследуемым материалом заражают биопробных животных (белых мышей и морских свинок) подкожно или внутрибрюшинно по 0,2-0,5 мл. Наблюдение за опытными животными длится до 10 дней, если они не пали. Павших животных вскрывают немедленно, производят посевы инфильтрата из места инъекции, крови и органов (сердце, селезенка, печень) на питательные среды, делают мазки, окрашивают их по Граму, одним из методов для выявления капсулы и антисоматической люминесцирующей сывороткой, отмечают патологоанатомические изменения. В положительном

случае в мазках обнаруживают вегетативные клетки в виде коротких цепочек, отдельные микробные клетки, окруженные капсулой и специфически светящиеся клетки типичной морфологии при МФА. При вскрытии животных, павших от сибирской язвы, отмечают увеличенную селезенку, гиперемию внутренних органов, несвернувшуюся кровь. На месте введения материала наблюдаются различной величины студенистый геморрагический отек. Животных, выживших после 10-дневного срока наблюдения, исследуют в полном объеме.

После 20-часовой инкубации посевов исследуемого материала или органов биопробных животных отбирают колонии для дальнейшей идентификации. В первую очередь исследуют колонии, имеющие морфологию, характерную для возбудителя сибирской язвы. В случае отсутствия «подозрительных» колоний с каждого посева следует отбирать и изучать не менее 10 любых шероховатых колоний. Колонии отсевают на МПА и МПБ. Культуру идентифицируют по основным (проба со специфическим сибиреязвенным фагом, тест «жемчужного ожерелья», способность к капсулообразованию) и дополнительным (гемолитическая, фосфатазная и лецитиназная активность, специфическая флуоресценция) тестам.

У выделенной культуры *B. anthracis* определяют DcL для кроликов и  $DL_{50}$  для морских свинок и белых мышей.

Для сокращения сроков бактериологического анализа предложен ускоренный биологический метод обнаружения возбудителя сибирской язвы. Согласно этому методу, исследуемый материал вводят внутрибрюшинно шести белым мышам по 0,5 мл. Через 1 и 2 ч вскрывают по паре мышей, из перитонеального экссудата и крови сердца делают мазки, из селезенки и печени - мазки-отпечатки. Мазки окрашивают одним из

методов на обнаружение капсулы и капсульно-соматической люминесцирующей сибиреязвенной сывороткой. Параллельно производят посевы на питательные среды с целью выделения чистой культуры возбудителя. Оставшуюся пару мышей наблюдают до 10 суток.

Реакцию термопреципитации Асколи используют в случаях, когда трудно рассчитывать на выделение чистой культуры возбудителя: при исследовании шерсти, шкур, щетины, войлока, овчины, костной муки и прочих объектов, а также при начавшихся явлениях трупного разложения и т.д. Реакция основана на обнаружении термостабильных антигенов возбудителя, которые сохраняются гораздо дольше, чем жизнеспособные вегетативные клетки. Реакция Асколи позволяет быстро обнаружить сибиреязвенный антиген. Тем не менее, эту реакцию нельзя признать строго специфичной, поскольку полисахаридный антиген возбудителя сибирской язвы вступает в реакцию с преципитирующими сыворотками против близкородственных микроорганизмов (*B. cereus*, *B. subtilis*).

При люминесцентной микроскопии, проводимой с использованием антисоматической или антиспоровой люминесцирующих сывороток, возбудитель обнаруживается в вегетативной или споровой формах. При специфической реакции наблюдается яркое свечение периферии клеток (спор), имеющих характерную морфологию. Чувствительность метода высока и колеблется в пределах сотен тысяч микробных тел в одном миллилитре материала.

Для текущей и ретроспективной диагностики сибирской язвы у человека используют аллергическую пробу с антраксином. Последний вводят в дозе 0,1 мл внутрикожно на внутреннюю поверхность левого предплечья обследуемого. Результат учитывают через

24-48 ч. Положительная реакция проявляется с первых дней заболевания в виде гиперемии и инфильтрата на месте введения и оценивается в зависимости от размера этих элементов.

В последнее время в практику лабораторных исследований, в том числе при сибирской язве, широко внедряются современные методы генетики и молекулярной биологии. Для типирования штаммов *B. anthracis* можно использовать величину мол% ГЦ, гибридизационный анализ, различные методы так называемого фингерпринтинга ДНК и РНК, которые методически основываются на рестрикционном анализе, гибридизационных пробах и ПЦР.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ**

### **Исследование материала от больного и почвы и сырья на обнаружение возбудителя сибирской язвы**

#### **Занятие 4**

#### **Исследование содержимого карбункула больного**

- Приготовление мазков для окраски по Граму и сибирезвенной люминесцирующей сывороткой.
- Посев исследуемого материала на 2 чашки МПА с целью получения изолированных колоний.
- Постановка пробы на белых мышах (ввести подкожно двум белым мышам по 0,3 мл содержимого карбункула).

#### **Исследование почвы**

- Приготовление взвеси почвы в 0,9% растворе хлористого натрия (1:10).
- Обработка  $\frac{1}{2}$  части полученной взвеси термическим методом:

Прогревание проводят на водяной бане при 65°C в течение 30 мин. Прогретый материал является ис-

ходным для посева на питательные среды и заражения биопробных животных.

- Посев обработанной и необработанной почвы на 2 чашки МПА, 2 чашки 5% кровяного агара и 2 чашки МПА с 0,01% ФФФ с целью получения изолированных колоний.
- Постановка биопробы на белых мышах (введение подкожно двум белым мышам по 0,3 мл суспензии термически обработанной почвы).

### **Занятие 5**

#### **Продолжение исследования содержимого карбункула больного: выделение чистой культуры**

- Просмотр роста на чашках МПА.
- Отбор подозрительных колоний, проверка их мазком с окраской по Граму, посев на сектора чашки с 5%-ным кровяным агаром и в МПБ.
- Вскрытие павших биопробных животных, зараженных содержимым карбункула больного.
  - а) описание патологоанатомической картины, заполнение протокола;
  - б) посев органов (печень, лимфатический узел, селезенка) на чашку МПА, кровь - в МПБ;
  - в) приготовление трех мазков: для окраски по Граму, люминесцирующей сибирезызенной сывороткой, для обнаружения капсулы по методу Бурри-Гинса.

#### **Продолжение исследования почвы: выделение чистой культуры**

- Просмотр роста на чашках с посевами нативного материала.
- Отбор подозрительных колоний под контролем мазка с окраской по Граму.
- Посев колоний на сектора 5% кровяного агара и в МПБ.
- Вскрытие павших биопробных животных, заражен-

ных суспензией обработанной почвы:

- а) описание патологоанатомической картины, заполнение протокола;
- б) посев органов (печень, селезенка) и лимфатического узла на чашку с МПА, кровь - в МПБ;
- в) приготовление трех мазков для окраски по Граму, люминесцирующей сибирезвенной сывороткой, для обнаружения капсулы одним из методов.

*Примечание: при отсутствии роста культур в посевах из нативного материала проведение выделения чистой культуры от биопробных животных.*

## Занятие 6.

### Идентификация культур, выделенных из карбункула больного и почвы

- Просмотр посевов на секторах 5% кровяного агара и МПБ. Проверка культуры на чистоту роста в мазках, окрашенных по Граму.
- Проверка выделенных культур на чувствительность к сибирезвенному бактериофагу.
- Посев каждой культуры в желатин уколом, в 0,3% ПЖА, на жидкую среду с желтком или на чашку МПА с желтком, на среду Леффлера, на чашку МПА с ФФФ, на МПА, содержащий 10 и 50 ЕД/мл пенициллина, на скошенный МПА.
- Постановка теста «жемчужное ожерелье» (приложение):
  - а) на плотной питательной среде с пенициллином 0,5 и 0,05 ЕД/мл;
  - б) методом Груз (приложение).
- Изучение чувствительности культуры, выделенной из карбункула больного, к антибиотикам методом диффузии в агар с использованием дисков (табл. 20).

Таблица 20

Пограничные критические значения диаметров зон задержки роста для определения чувствительности к антибиотикам методом диффузии в агар с использованием дисков

Антибиотик	Содержание антибиотиков в диске в мкг	Пограничные значения диаметров зон задержки роста штаммов (мм)		
		резистентных	промежуточных	чувствительных
Бензилпенициллин	6	≤ 10	11-16	≥ 17
Гентамицин	10	≤ 15	-	≥ 16
Тетрациклин	30	≤ 16	17-21	≥ 22
Эритромицин	15	≤ 17	18-21	≥ 22

*Примечания:*

- посевы культур в желатине - при комнатной температуре;

- за 3 ч до предлагаемой работы отсев изучаемых культур на МПБ и МПБ с пенициллином.

#### **Исследование кожсырья в реакции Асколи**

- Подготовка материала для реакции Асколи:
- Измельчение обеззараженного кожевенного сырья, добавление 0,9% раствора хлористого натрия 1:10, настаивание на холоде при 4 °С в течение 18-48 ч.

### **Занятие 7**

#### **Идентификация культур, выделенных из карбункула больного и почвы**

- Регистрация протеолитической активности и характера роста в желатине.
- Учет пенициллиназной, лецитиназной, фосфатазной активности на чашках МПА с пенициллином, МПА с желтком (жидкой желточной среде) и на МПА с 0,01% ФФФ.
- Учет пробы с сибирезвевным бактериофагом.
- Учет результатов изучения чувствительности куль-



- туры от больного к антибиотикам (табл. 20).
- Приготовление мазков для определения капсулы у культур, выращенных в CO<sub>2</sub>-инкубаторе на среде Леффлера.
  - Заполнение паспорта на выделенные культуры.
  - Передача всех посевов выделенных культур для обеззараживания.

### **Постановка реакции Асколи**

- Фильтрование полученного экстракта до полной прозрачности через асбестовую вату или бумагу.
- Постановка реакции Асколи.

## **Занятие 8.**

### **Исследование материала от больного для выявления ДНК возбудителя сибирской язвы при помощи метода ПЦР**

Материал от больного - содержимое карбункула - отбирают (с соблюдением правил забора клинического материала) стерильной платиновой петлей или пастеровской пипеткой в количестве 0,1-1,3 мл. Кожные элементы предварительно очищают ватным тампоном, смоченным спиртом или эфиром. Материалом для исследования могут быть также пробы из внешней среды - почва, смывы с поверхностей, а также суспензии органов павших животных и клеточные взвеси (10<sup>6</sup>-10<sup>8</sup> м.к./ мл) при идентификации выделенных культур.

Для обеззараживания материала, содержащего спорообразующие микроорганизмы, в том числе *B. anthracis*, применяют методический подход, заключающийся в герминации спор и последующей обработке пенициллином, прогреванием и воздействии лизирующего буфера с гуанидинтиоционатом. Принцип метода состоит в проращении спор в вегетативные клетки при культивировании их в благоприятных условиях.

Далее под действием температуры и пенициллина происходит разрушение клеточной мембраны бацилл с высвобождением ДНК. Последовательность выполнения операций следующая:

1. Для герминации спор исследуемый материал засевают в количестве 0,1 мл в пробирки с 0,9 мл бульона Хоттингера рН 7,6 и инкубируют с встряхиванием при температуре 37°C в течение 2,5 ч.

2. В пробирки с материалом добавляют пенициллин в расчете 1000 ЕД/мл, инкубируют при 37°C в течение 15 мин, затем прогревают на водяной бане при температуре 100°C в течение 10 мин.

3. Из проб отбирают по 100 мкл материала в микроцентрифужные пробирки типа Эппендорф, добавляют по 300 мкл лизирующего буфера с гуанидинтиоцианатом и прогревают при температуре 65°C в течение 15 мин.

После выполнения процедур 1-3 этапов материал для исследования считается обеззараженным, при этом не повреждается ДНК и в последующем не ингибируется ПЦР.

Для выделения ДНК из материала, обеззараженного как описано выше, используют набор реагентов, производимый РосНИПЧИ «Микроб», или аналогичный (НПФ «Биоком», «ДНК-технология» или ЗАО «ВекторБест»).

Для постановки ПЦР используется тест-система для выявления ДНК *B. anthracis* рХО1, выпускаемая РосНИПЧИ «Микроб». Видоспецифичные праймеры выбраны на основе нуклеотидной последовательности гена *pag*, кодирующего протективный антиген токсинного комплекса и локализованного на плазмиде рХО1.

Тест-систему извлекают из морозильной камеры, размораживают содержимое пробирок (для этого лучше использовать ледяную баню или охладитель проб). После транспортировки или длительного хранения пробирки

центрифугируют 20 сек (для осаждения капель со стенок) и тщательно перемешивают на вортексе.

Готовят реакционную смесь в специально предназначенной для этого пробирке из расчета на одну пробу: 10х ПЦР-буфер - 2,5 мкл, раствор дНТФ - 2,5 мкл, праймеры ВА1 и ВА2 - по 1 мкл, Taq-полимераза - 0,2 мкл, вода деионизованная - 7,8 мкл.

Фермент в реакционную смесь вносят в последнюю очередь и оставляют его вместе с наконечником в пробирке. Затем в наконечник вставляют дозатор, настроенный на 15 мкл, реакционную смесь тщательно перемешивают не только круговыми движениями наконечника, но и поступательными движениями поршня дозатора (пипетированием). По окончании перемешивания в каждую пробирку, включая контроли, добавляют по 15 мкл реакционной смеси, после чего вносят по одной капле вазелинового масла (для предотвращения испарения реакционной смеси при термоциклировании.). В пробирку, обозначенную как отрицательный контроль (-), вносят 10 мкл деионизованной воды, а в пробирку, обозначенную как положительный контроль (+), - 10 мкл контрольной ДНК (специально предназначенным для этого дозатором!). Пробы в объеме 10 мкл вносят (также предназначенным для этого дозатором) под минеральное масло. По мере заполнения пробирки закрывают, нумеруют, помещают в амплификатор и термоциклируют по программе: предварительная денатурация при 94°C (1 цикл) - 3 мин, затем 35 40-секундных циклов при 94, 49 и 72°C. В заключение проводят 1 цикл при 72°C в течение 10 мин.

После первого этапа амплификации для повышения чувствительности и специфичности реакции проводят вторую стадию. Реакционную смесь готовят из расчета на одну пробу: 10х буфер - 2,5 мкл, раствор дНТФ

- 2,5 мкл, праймеры ВА3 и ВА4 - по 1 мкл каждого, фермент Taq-полимераза - 0,2 мкл, вода деионизованная - 16,8 мкл. Далее реакционную смесь разливают по 24 мкл в каждую пробирку, наслаивают на нее по одной капле вазелинового масла и под масло вносят по 1 мкл амплификата, полученного после первого этапа реакции. Термоциклирование на втором этапе проводят по следующей программе: 1 цикл - 1 мин при 94°C, 25 40-секундных циклов при 94, 49 и 72°C и 1 цикл при 72°C в течение 10 мин.

Наиболее простой метод выявления продукта ферментативной амплификации ДНК в ПЦР - электрофорез в агарозном геле. По окончании программы амплификации анализируемые образцы смешивают с 2,0-2,5 мкл раствора для нанесения проб и вносят в лунки горизонтального агарозного геля. Для более четкого разделения амплифицированных фрагментов целесообразно использование агарозного геля плотностью 1,3%. Электрофорез проводят в 1xTBE-буфере в присутствии бромистого этидия в концентрации 0,5 мкг/мл при напряженности 6 В/см в течение 1 ч, не допуская выхода бромфенолового синего из геля. Затем гель просматривают в ультрафиолетовом свете на транс-иллюминаторе и результат фоторегистрируют.

Амплифицированные фрагменты ДНК идентифицируют по размеру, сравнивая флуоресцирующие в геле полосы анализируемых образцов с полосами положительного контроля или в соответствии с маркерами молекулярного веса.

Оценка результатов ПЦР:

- положительный контроль - выявляется полоса фрагмента 154 п.н.;
- отрицательный контроль - полоса на уровне положительного контроля отсутствует

- анализируемые пробы: наличие полосы на уровне положительного контроля (154 п.н.) указывает на присутствие ДНК возбудителя в исследуемом материале,
- наличие полос выше или ниже положительного контроля является неспецифичным ответом и во внимание не принимается.

### 9.3. Приложение

#### **Режим работы с бактериями, образующими споры**

Вся работа с культурами возбудителя сибирской язвы и зараженными животными должна проводиться в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)».

При работе с возбудителем сибирской язвы для дезинфекции применяют 3-6% растворы  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Для снижения высокого поверхностного натяжения  $\text{H}_2\text{O}_2$  в ее растворы добавляют моющие средства до 0,5% концентрации. Повышение температуры смеси до 50-60 °С значительно усиливает бактерицидную активность  $\text{H}_2\text{O}_2$  в отношении микроорганизмов и позволяет снизить экспозицию 6% раствора с 6 ч до одного часа. Приготовление рабочих растворов и активацию производят в резиновых перчатках, предохранительных очках, 4-слойной марлевой маске.

Кроме вышеперечисленных веществ, для дезинфекции применяют растворы велтолена, формалина, едкого натра, септодора-форте и др.

В лаборатории основным методом обеззараживания объектов, инфицированных возбудителем сибирской язвы, является автоклавирование при температуре  $132 \pm 2$  °С под давлением 2,0 кгс/см<sup>2</sup> в течение 90 мин. Эффективность автоклавирования контролируется

физическим, бактериологическим, химическим методами. Физический метод контроля - непосредственное наблюдение за процессом стерилизации по показаниям термометра, манометра. Бактериологический контроль осуществляется с помощью тест-объектов. В качестве тест-объектов используется отмытый стерильный песок, пропитанный термофильными бактериями «С». Пробирки с тест-объектами (не менее 6 штук) помещают на разных уровнях в автоклав. Одна пробирка остается контрольной. После прохождения цикла автоклавирования все пробирки стерильно заливают 1% пептонной водой (не менее 5 мл в каждую пробирку), в том числе и в контрольную. Пробирки помещают в термостат при 60 °С и выдерживают не менее 5 сут. В автоклавированных пробирках среда должна оставаться прозрачной, в контроле - мутной.

Химический контроль проводят с помощью веществ, имеющих строго определенную точку плавления: бензамид или сукцинимид ( $126\pm 2$  °С), мочеви́на ( $132\pm 2$  °С). К последним добавляют анилиновые краски: фуксин, сафранин и др., которые при плавлении индикатора окрашивают его в тот или иной цвет.

### **Дезинфекция**

При работе за лабораторным столом пипетки, отработанные предметные и покровные стекла погружают в сосуд с 4% раствором активированного хлорамина или 6% раствором перекиси водорода с 0,5% моющего средства не менее чем на 60 мин., после чего дезинфицирующий раствор сливают в канализацию, а пипетки кипятят в мыльном растворе или 2% растворе пищевой соды.

Приготовленные мазки из споровой культуры фиксируют 30 мин 96 ° спиртом, содержащим 3%  $H_2O_2$ . После отмывания мазков вода подлежит обеззара-

живанию автоклавированием или добавлением хлорамина до 4% концентрации с последующим его активированием. Высушивание мазков у вентилятора не допускается.

Лабораторные столы после работы протирают двукратно с интервалом 30 мин 6% раствором перекиси водорода с 0,5% моющего средства. Бумагу, вату, картонные коробки и другие материалы, подлежащие уничтожению, сжигают в кремационной печи или автоклавируют, металлические предметы обжигают.

Трупы лабораторных животных сжигают в кремационной печи или автоклавируют.

Металлические ящики, садки, банки из-под животных с подстилочным материалом и экскрементами, сетчатые крышки автоклавируют или заливают на 48 ч 4% активированным раствором хлорамина либо 6% раствором перекиси водорода с 0,5% моющего средства.

Противочумные костюмы (халаты, косынки, ватно-марлевые маски) автоклавируют или замачивают в 1% активированном растворе хлорамина на 2 часа либо в 3% растворе перекиси водорода при температуре 50°C на 1 ч. Перчатки замачивают в 6% растворе перекиси водорода на 1 ч либо кипятят в 2% растворе соды 60 мин. Сапоги протирают 6% раствором перекиси водорода двукратно с интервалом в 15 мин. Помещение обрабатывают УФ при текущей дезинфекции и парами формалина при заключительной.

После проведения текущей и заключительной дезинфекции споры возбудителя сибирской язвы должны отсутствовать.

Не ранее, чем через час, но не позднее двух часов

после обработки, производят контроль эффективности дезинфекции. Для этого с поверхности 100 см<sup>2</sup> 5-10 объектов, подвергшихся обработке (лабораторные столы, стены, оконные рамы, двери), делают смывы ватным тампоном, смоченным стерильным 0,9% раствором. Тампоны помещают в стерильные пробирки с 4-5 мл МПБ. Посевы инкубируют в термостате при 37°С 18-24 ч. Из пробирок, в которых обнаружено помутнение бульона, производят высев на МПА и посевы выдерживают 18-20 ч при 37°С.

Удовлетворительная оценка качества дезинфекции дается при отсутствии роста во всех исследованных смывах.

### **Методики изучения биологических свойств возбудителя сибирской язвы**

#### **Тест «жемчужного ожерелья» на плотных питательных средах с пенициллином**

Перед постановкой пробы 2% питательный агар разливают по 10 мл в 3 пробирки. В первую после расплавления и охлаждения добавляют пенициллин из расчета 0,5 ЕД/мл, во вторую - 0,05 ЕД/мл, третья пробирка - контрольная (без антибиотика). Содержимое каждой пробирки выливают в заготовленные чашки. Дно каждой чашки после застывания среды расчерчивают на квадраты или кружки, на которых подписывают номер анализа. На площадь квадрата или кружка наносят одну каплю 3-часовой бульонной культуры исследуемого штамма. На одной чашке может быть поставлено до 10 проб. Чашки инкубируют при 37 °С, через 3 ч просматривают рост под микроскопом, предварительно накрыв каждый квадрат или кружок покровным стеклом. На среде,



содержащей пенициллин, наблюдаются сферопласты *B. anthracis*, отдельные шары - «жемчужины», расположенные в виде цепочек. Другие аэробы имеют обычную форму клеток. В контрольной чашке *B. anthracis* и *B. cereus* образуют длинные цепи клеток.

Модификация теста «жемчужного ожерелья» по Груз

К бульону Хоттингера рН 7,2 добавляют стерильно 20% инактивированной лошадиной сыворотки и 0,5 ЕД/мл пенициллина. Соблюдая стерильность, среду разливают в пробирки по 2-3 мл и засевают 2 каплями бульонной или петлей агаровой культуры. Пробирки с посевами инкубируют в течение 3 ч при 37 °С. Затем делают мазки, которые фиксируют, окрашивают метиленовым синим 20 сек и микроскопируют. Для *B. anthracis* характерны шарообразные клетки в виде цепочек, напоминающих ожерелье из жемчуга. *B. cereus* и другие сапрофиты бацилл на среде с пенициллином растут, не меняя морфологии. Контролем служат мазки, приготовленные из бульона без пенициллина.

## ЛАБОРАТОРНЫЙ ДИАГНОЗ ЧУМЫ

### 10.1. Биологические свойства возбудителя чумы

Возбудитель чумы относится к семейству Enterobacteriaceae, роду *Yersinia*, виду *pestis*. В качестве внутривидовой классификации самой признанной за рубежом считается классификация Р. Девинья, которая, учитывая принципы формирования разновидностей в исторические эпохи и некоторые биохимические свойства штаммов, делит вид на 3 биовара: *antiqua* (древний), *mediaevalis* (средневековый) и *orientalis* (восточный) (табл.21).

Таблица 21

Внутривидовая классификация *Yersinia pestis* (R. Devignat)

Номенклатура и краткая характеристика разновидностей по R. Devignat	Отличительные признаки		
	Ферментация глицерина	Нитрификация	Денитрификация
<i>Y. pestis</i> var. <i>orientalis</i> (восточная разновидность, причина пандемии 1894 г.)	–	±	+
<i>Y. pestis</i> var. <i>antiqua</i> (древняя разновидность, причина пандемии «юстинианова чума»)	+	±	+
<i>Y. pestis</i> var. <i>mediaevalis</i> (средневековая разновидность, причина пандемии «черная смерть»)	+	–	–

В нашей стране принята единая систематическая схема подвидовых категорий, наименование которых отражает конкретные географические территории. В основу схемы положены результаты изучения штаммов, выделенных на данных территориях, методами геносистематики и нумерической таксономии. Она учитывает степень фенотипического сходства, а также различия по содержанию ГЦ-пар в ДНК и др. Согласно этой схеме вид *Y. pestis* делится на 5 подвидов: *Y. pestis* ssp. *pestis* (основной), *Y. pestis* ssp. *caucasica* (кавказский), *Y. Pestis* ssp. *altaica* (алтайский), *Y. Pestis* ssp. *hissarica* (гиссарский) и *Y. Pestis* ssp. *ulegeica* (улэгейский) (табл.22).

Таблица 22

Таксономические признаки, характеризующие различные подвиды *Y. Pestis*

Подвиды <i>Yersinia pestis</i> subsp.	Ферментация				денитрификация	Продукция пестицина I	Чувствительность к пестицину I	Фибринолитическая активность	Коагулазная активность	Зависимость от источников питания				Вирулентность для морских свинок	Район циркуляции (природные очаги чумы)	Носители/вобудителя чумы								
	рамноза	мелибиоза	арабиноза 3 а	глицерин						лейцин	метионин	аргинин	тиамин											
	pestis	-	-	+						±	±	+	-				+	+	±	+	-	+	Азия, Африка, Америка	Marmota, Citellus, Meriones, Rattus
	altaica	+	+	-						+	-	+	+				+	+	+	-	+	-	Горный Алтай	Ochotona pricei
caucasica	+	+	+	+	+	-	+	-	-	±	+	+	+	-	Закавказское нагорье, Горный Дагестан	Microtus arvalis								
hissarica	+	+	-	+	-	+	±	+	+	+	+	-	-	Гиссарский хребет	Microtus carruthersi									
ulegeica	+	+	+	+	-	+	+/-	+	+	-	-	-	-	Северо-Восточная Монголия, пустыня Гоби	Ochotona pricei									

*Примечание:*

«+» -наличие признака;

«-» -отсутствие признака;

«±» - наличие признака не у всех штаммов; «+/-» -чувствительны к пестицину штаммов основного и алтайского подвидов и нечувствительны к пестицину штаммов собственного подвида.

*Y. pestis*-полиморфная овоидная грамтрицательная палочка, длиной 1-2 мкм, толщиной 0,3-0,7 мкм, с закругленными концами и утолщенной серединой.

В мазках с плотной питательной среды палочки могут быть удлинёнными, нитевидными; описаны также фильтрующиеся формы. При затяжном заболевании в мазках из бубона и органов больного возбудитель чумы может принимать форму шаров различной величины и теней. В мазках-отпечатках из тканей и органов, а также в мазках из бульонных культур окрашивается биполярно (более интенсивно на концах клетки). Биполярность ярче выявляется при окраске метиленовой синькой Леффлера.

Возбудитель чумы не имеет жгутиков и спор. Капсулу образует в организме теплокровных животных и людей, кровяном и сывороточном агаре при температуре 37°C.

Чумной микроб – облигатный паразит с факультативным анаэробным типом дыхания, относится к природным ауксотрофам. Помимо источника энергии нуждается в дополнительных факторах роста – аминокислотах и витаминах. Для роста при 28°C необходимы фенилаланин, валин, метионин, изолейцин и глицин или треонин; при 37°C - биотин, тиамин, глютаминовая кислота и пантотенат. Штаммы из разных очагов чумы, как правило, имеют неодинаковые потребности в факторах роста, что находит отражение в схеме внутривидовой таксономии чумного микроба.

Для культивирования возбудителя требуются питательные среды с глубоким расщеплением белка. Лучшими по качеству являются среды, приготовленные из ферментативных гидролизатов кровяных сгустков (не требуют добавления стимуляторов и рост наблюдается при посеве 10-100 микробных клеток) и казеина, перевара Хоттинге-

ра, кислотного гидролизата рыбкостной муки.

Самые распространенные среды для изучения чумного микроба: бульон и агар Хоттингера, Мартена, казеиново-дрожжевой агар (питательный агар для выращивания чумного микроба, сухой), дезоксихолатно-цитратный агар.

Оптимальные условия выращивания: температура 28-30°C и рН 7,0-7,2, но возбудитель способен расти на питательных средах в температурном диапазоне от 2 до 45°C и показателях рН среды от 5,8 до 8,0.

Чумной микроб на плотных питательных средах имеет характерную морфологию роста. При посеве бактериологической петлей через 24-48 часов инкубации представляет собой бурый «тяж» в начале штриха и отдельные шероховатые колонии в конце. Морфология колоний под микроскопом является одним из основных диагностических признаков возбудителя чумы. Через 12 ч инкубации появляются микроколонии в виде нежных прозрачных образований чаще треугольной или прямоугольной формы, напоминающих битое стекло (рис.23).



Рис.23. «битое стекло» (12-24 ч)

Через 18-24ч микроколонии сливаются в плоские прозрачные образования с фестончатыми краями - «кружевные платочки» (рис.24).



Рис.24. «кружевные платочки» (18-24 ч)

В дальнейшем (24-48ч) «кружевные платочки» пре-

вращаются в зрелые колонии. Типичные зрелые колонии имеют бурый зернистый центр с постепенно уплощающейся прозрачной периферической зоной с фестончатыми краями.

На скошенном агаре возбудитель чумы растет в виде сочного, серовато-белого налета, хорошо фиксированного на среде. На жидкой питательной среде (МПБ, бульон Хоттингера и др.) образует хлопьевидный или порошковидный, легко распадающийся при встряхивании осадок, в совершенно прозрачном бульоне и нежную пленку на поверхности.

Бактерии чумы растут в R-форме, которая является вирулентной. Однако они относительно легко могут диссоциировать под влиянием ряда факторов (например, под действием фага) и через O-форму переходить в S-авирулентную форму.

Возбудитель чумы имеет признаки, характерные для представителей семейства *Enterobacteriaceae*. Он оксидазо-отрицателен и каталазо-положителен; проявляет выраженную ферментативную активность по отношению к различным моно-, ди-, трисахаридам и спиртам; расщепляет на 1-3 сутки глюкозу, маннозу, маннит, мальтозу, эскулин, до кислоты без газа; не ферментирует лактозу, сахарозу, сорбит, инозит, дульцит, мочевины. Отношение к глицерину, салицину, арабинозе, рамнозе и мелибиозе - вариабельное. Не образует индол, сероводород, ацетилметилкарбинол. Дает положительную реакцию с метиловым красным. Протеолитические свойства выражены слабо: не разжижает желатин и не свертывает молоко (табл. 23).

Таблица 23

## Основные ферментативные свойства возбудителей чумы

Тест										
Глюкоза	Глицерин	Мочевина	Рамноза	Сахароза	Маннит	Мальтоза	Арабиноза	H <sub>2</sub> S	Реакция Фогеса-Проскауэра	Желатина
+	±	-	±	-	+	+	±	-	-	-

*Примечание:*

«+» - *расщепление;*

«-» - *отсутствие расщепления;*

«±» - *возможны варианты расщепления.*

Важным свойством чумного микроба является его способность к денитрификации, т.е. восстановлению нитратов в нитриты. Эта окислительно-восстановительная реакция служит стойкой генетической меткой, используемой во всех схемах внутривидовой классификации штаммов чумного микроба.

Чумной микроб (кроме штаммов, выделенных от полевых на Закавказском нагорье), в отличие от псевдотуберкулезного микроба, синтезирует ферменты патогенности - фибринолизин и плазмокоагулазу. Фибринолизин обладает способностью локально растворять сгустки фибрина и фибриногена крови в очагах воспаления. Плазмокоагулаза обуславливает свертываемость плазмы крови кролика, морской свинки и человека. Фибринолизин-коагулазная система обеспечивает возбудителю чумы высокую инвазивную способность и генерализацию чумной инфекции.

Большинство штаммов чумного микроба продуцируют в окружающую среду антибиотикоподобное вещество (бактериоцин), который получил название

пестицин 1 (P1). Он представляет собой видоспецифический термолабильный мономерный белок. P1 участвует в гидролизе муреинлипопротеина клеточной стенки чувствительных к нему клеток, превращая их в нежизнеспособные сферопласты. Он подавляет рост штаммов *Y. Pseudotuberculosis* I серовара (по Талю) и некоторых штаммов *Y. pestis*, циркулирующих в природных очагах чумы Закавказского нагорья, Горного Алтая, на Гиссарском хребте, в Таджикистане, и т.д., что связано с наличием в их составе 3,6-ди-деоксид-В-рибогексозы, которая выполняет роль рецептора для P1. Способность к продукции пестицина 1, фибринолизина и плазмокоагулазы является видовым признаком штаммов *Y. pestis* и играет важную роль в таксономии и дифференциальной диагностике чумы. Исключение составляют штаммы кавказского подвида, которые выделяются от полевок в Закавказском нагорье и Горном Дагестане. Они не только не продуцируют P1, но и проявляют к нему чувствительность. Пестицин-фибринолизин-плазмокоагулаза кодируются одной низкомолекулярной плазмидой - pPst. Эти признаки сцеплены друг с другом и потеря одного из них сопровождается потерей двух других.

В настоящее время методами иммунохимического анализа в чумном микробе обнаружено до 90 иммунохимически активных компонентов, среди которых многие являются общими с *Y. pseudotuberculosis*, *E. coli*, *Schigella* и эритроцитами человека O-группы. И только некоторые из них, как капсульный антиген (фракция I, FI), являются специфическими для возбудителя чумы.

FI-основой компонент, связанный с капсулой, представляет собой чистый белок. Наиболее интенсивно синтез FI происходит при 37°C выращивания *in vitro* и организме животных (*in vivo*). При более низких



температурах культивирования капсульный антиген у микроорганизма не обнаруживается. В организме членистоногих (блох) FI не выявляется. Фракция I является основным иммуногеном и обладает строгой специфичностью, хотя в природе описаны штаммы, не синтезирующие этот белок.

Геном возбудителя чумы состоит из хромосомы размером 4,65 т.п.н. и трех плазмид-пестиногенности (pPst), кальцийзависимости (pCad), фракции I и «мышинного токсина» (pFra), имеющих молекулярные массы соответственно 6, 47 и 61-65 мегадальтон.

pPst кодирует продукцию пестицина I, устойчивость к нему, синтез фибринолизина и плазмокоагулазы. Наличие этой плазмиды повышает вирулентность возбудителя чумы в опытах при подкожном заражении морских свинок и белых мышей.

pCad определяет характер роста клеток при 37°C в зависимости от наличия в среде ионов кальция, а также отвечает за синтез антигенов V, W и других поверхностных белков.

pFra ответственна за продукцию фракции I и синтез «мышинного» токсина.

Возбудитель чумы относится к группе полипатогенных бактерий с высокой инвазивностью, но с относительно невысокой токсичностью. К ферментам патогенности относятся гиалуронидаза, фибринолизин, коагулаза, нейраминидаза, каталаза и др. Характерными признаками вирулентных штаммов возбудителя чумы являются: наличие капсулы, V- W- и pH6-антигенов, способность синтезировать пурины, образование пигментированных колоний на среде с геминном, пестициногенность, неспособность расти на средах при 37°C в отсутствие ионов кальция.

Дифференциальная диагностика культуры чумного

микроба от большинства видов патогенных бактерий и банальной микрофлоры, как правило, особого труда не составляет. Если культуру чумного микроба невозможно дифференцировать от палочки Фридендера, кишечной палочки, сальмонелл и других представителей кишечной группы бактерий при микроскопии мазков, так как они практически ничем не отличаются, то по морфологии колоний на агаре и характеру роста на жидких питательных средах это сделать, возможно. Исключением является возбудитель псевдотуберкулеза в R- и OR- формах, который по морфологии микроба в мазках, а так же культуральным свойствам часто просто невозможно отличить от возбудителя чумы. В таблице 24 представлена дифференциальная диагностика.

Таблица 24

Дифференциация возбудителей чумы и псевдотуберкулеза

Признаки	Возбудитель чумы*	Возбудитель псевдотуберкулеза
Подвижность в полужидком агаре при 20-22°C	Неподвижен	Подвижен
Лизабельность чумным фагом Покровской	Лизируется	Не лизируется (+**)
Лизабельность фагом Лариной Л-413С	Лизируется	Не лизируется
Лизабельность псевдотуберкулезным фагом	Лизируется	Лизируется
Ферментация мочевины	- (+***)	+
Способность синтезировать специфический капсульный антиген F1	+ (-****)	-
Наличие пестицин-фибринолизин-плазмокоагулирующей активности	+	-
Полимеразная цепная реакция (ПЦР) с тест-системой для детекции плазмид pFga и pPst	+	-

*Примечание:*

\* - типичные вирулентные штаммы.

\*\* - 17-25% штаммов *Y. Pseudotuberculosis* лизируются чумным фагом Покровской.

\*\*\* - свежесвыделенные штаммы чумного микроба могут ферментировать мочевины.

\*\*\*\* - способность синтезировать капсульный антиген (F1) отсутствует у штаммов возбудителя чумы, выделяемых во Вьетнаме (в том числе и от людей), а также – от грызунов в некоторых Среднеазиатских природных очагах чумы.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ

### Занятие 1.

#### **Биологические свойства *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis***

- Изучение характера роста культуры на скошенном агаре.
- Изучение морфологии микробов в мазках, приготовленных из агаровой культуры, и в мазках-отпечатках органов грызунов, павших от чумы. Окрасивание мазков по Граму и синькой Леффлера. Постановка пробы с 3% КОН.
- Посев каждой культуры на 3 чашки питательного агара (ПА), 2 чашки агара с генцианвиолетом, в пробирки с 0,3% питательным агаром, средами Гисса с глюкозой, лактозой, сахарозой, глицерином, рамнозой, арабинозой, маннитом, мальтозой, со средой Кристенсена, цветной дифференциальной средой (ЦДС), в питательный бульон (ПБ), ПБ с  $KNO_3$ , в пробирки со скошенным питательным агаром.
- Определение пестициногенной активности (приложение).

- Посев культуры возбудителя чумы и возбудителя псевдотуберкулеза на чашку 1,5% питательного агар с генцианвиолетом бляшками диаметром 0,5-1,0.

*Примечания:*

- посев на ПА поместить при 28°C, 37°C и при комнатной температуре;
- посевы на агаре с генцианвиолетом - при 28°C и при комнатной температуре;
- посев на 0,3% ПА - в шкаф при комнатной температуре;

## **Занятие 2.**

### **Биологические свойства *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis***

- Изучение морфологию формирующихся колоний на ПА, ПА с генцианвиолетом.
- Изучение морфологии роста культур в бульоне.
- Приготовление мазков из агаровой и бульонной культур, окрашивание по Граму и синькой Леффлера.
- Определение подвижности на 0,3% ПА.
- Изучение ферментации углеводов и спиртов на средах Гисса, уреазной активности на среде Кристенсена и ЦДС (приложение).
- Изучение фаголизательности.
- Постановка пробы на чувствительность к бактериофагам Л-413С, Покровской, псевдотуберкулезному методом «стерильного пятна».
- Постановка пробы на чувствительность к бактериофагам Л-413С, Покровской, псевдотуберкулезному двухслойным методом (приложение).
- Постановка пробы на чувствительность к бактериофагу Покровской методом дифференциального рабочего титра (приложение).
- Постановка пробы на чувствительность к бактериофагу Л-413С ускоренным методом.

- Посев культуры в пробирки со скошенным питательным агаром.

### Занятие 3.

#### **Биологические свойства *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis***

- Изучение морфологии 2-х суточного роста возбудителей чумы и псевдотуберкулеза на ПА, ПА с генцианвиолетом.
- Изучение морфологии роста культур в бульоне через 48 ч.
- Регистрация ферментации углеводов и спиртов на средах Гисса.
- Определение фибринолитической и коагулазной активности (приложение).
- Посев культуры возбудителя чумы на пластинчатый и скошенный ПА с кровью.
- Посев культуры на скошенный ПА.
- Изучение фаголизабельности.
- Учет пробы с фагами.
- Определение пестициногенной активности (приложение).

*Примечание: инкубирование посевов с кровью на ПА при 37°C.*

### Занятие 4.

#### **Биологические свойства *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis***

- Учет пробы на фибринолизин и коагулазу.
- Постановка пробы на нитриты с реактивом Грисса.
- Определение пестициногенной активности.
- Регистрация зоны задержки роста индикаторного штамма возбудителем чумы.
- Изучение вирулентности чумного микроба на специальных питательных средах.

### *Рост на среде Джексона-Берроуза*

На поверхность среды с гемином или ДАС нанести 0,1 мл взвеси односуточной агаровой культуры, содержащей  $5 \times 10^3$  м.к./мл, и распределить шпателем по поверхности агара. Посевы инкубировать 4-5 сут. при  $28^\circ\text{C}$ . Вирулентные бактерии чумы вырастают в виде бурых колоний на среде с гемином, темно-красных или темно-синих на ДАС (Psb)<sup>+</sup>. Бактерии, утратившие вирулентность, образуют бесцветные колонии (Psb)<sup>-</sup>.

*Рост на среде Хигучи-Смита и питательной среде для определения потребности чумного микроба в ионах кальция сухой (ВМ)*

Для исследования на среде Хигучи-Смита и ВМ из односуточной агаровой культуры готовят взвеси, содержащие  $10^3$  или  $2 \times 10^3$  м.к./мл. Из каждого разведения по 0,1 мл высевают на чашки со средой. Посевы инкубируют при  $37^\circ\text{C}$ . Через 48 ч отмечают колонии I порядка (бактерии, независимые от ионов кальция, авирулентные). Через 24 ч дополнительной инкубации при той же температуре регистрируют колонии II порядка, состоящие из авирулентных иммуногенных клеток. Затем посевы помещают при  $28^\circ\text{C}$  и подсчитывают вновь появившиеся колонии, состоящие из вирулентных клеток. В качестве контроля 100 или 200 м.к. высевают на агаровые пластины с 1% дефибринированной крови барана или кролика при использовании среды Хигучи-Смита или питательный агар для выращивания чумного микроба-при работе со средой ВМ.

- Посев суточной культуры возбудителя чумы на среду ВМ с контролем и Джексона-Берроуза или ДАС для выявления вирулентных и авирулентных клеток.
- Изучение антигенной структуры возбудителя чумы. Определение фракции I чумного микроба.

- Определение 2 сывороточных единиц (СЕ) противочумной сыворотки.
- Приготовление микробной взвеси  $10^9$  м.к./мл на 2% растворе формалина из культуры возбудителя чумы, выращенной на ПА с кровью при 37°C.
- Контрольный высеv через 1 ч из обработанной формалином взвеси на чашку ПА.

*Примечание: инкубация посевов на среде ВМ и контроля - при 37°C, на среде Джексона-Берроуза - при 28°C.*

### Занятие 5.

#### **Биологические свойства *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis***

- Изучение антигенной структуры. Определение F1 чумного микроба.
- Люминесцентно-серологический метод.
- Серологические реакции с применением эритроцитарных диагностикумов (РПГА, РНАт).

### Занятие 6.

#### **Биологические свойства *Y. pestis***

- Изучение вирулентности возбудителя чумы на специальных средах.
- Регистрация всех колоний (I - II порядка), выросших на среде ВМ при 37°C в течение 42-48 ч, сравнение с ростом на контрольной чашке. Инкубация посевов при 28°C.
- Выявление ДНК (pFra и pPst) *Y. pestis* методом полимеразной цепной реакции.
- Подготовка пробы - микробной взвеси  $10^4$  м.к./мл.
- Постановка ПЦР:

ГенПест тест-система предназначена для выявления ДНК возбудителя чумы в исследуемом материале методом ПЦР.

Для детекции *Y. pestis* подобрана система, состоящая из двух пар праймеров, выбранных на основе двух собственных плазмид чумного микроба pFra и pPst. Первая пара праймеров, соответствующих нуклеотидной последовательности гена *pla* (плазида pPst), обеспечивает амплификацию фрагмента 478 п.н., вторая пара праймеров F21-F22, комплементарных участку гена *caf* (плазида pFra), амплифицирует фрагмент - 295 п.н.

В состав тест - системы входят следующие компоненты: деионизованная вода, 10 х буфер, дНТФ, *plaY* 1 – праймер, *plaY* 2 – праймер, F 21 - праймер, F 22 – праймер, фермент Taq - полимеразы, контрольная ДНК, масло вазелиновое.

Набор хранится при температуре -20°C. Срок хранения не более 6 месяцев.

Объектом для исследования может быть клинический материал, объекты внешней среды, органы животных, а также клеточные взвеси при идентификации выделенных культур. При работе с клиническим материалом и загрязненными объектами внешней среды необходим предварительный этап подготовки проб (выделение ДНК). Подготовку проб осуществляют с помощью поставляемого отдельно набора и прилагаемой к нему инструкции.

При работе с микробными взвесями ( $10^9$  м.к./мл) возможна их обработка мертиолатом натрия (0,01%) с последующим прогреванием при 56°C в течение 30 мин для обеззараживания. Разведения чистых культур из  $10^9$  м.к./мл до  $10^4 \sim 10^6$  м.к./мл следует готовить на бидистиллированной воде, поскольку хлорид натрия, входящий в состав физиологического раствора, является ингибитором ПЦР.

Для проведения ПЦР готовят необходимое количество 0,6 мл микропробирок, соответствующее числу



исследуемых проб, а также еще три пробирки - для приготовления реакционной смеси, положительного и отрицательного контролей. Затем извлекают тест-систему из морозильной камеры, размораживают содержимое пробирок (для этого лучше использовать ледяную баню). После транспортировки или длительного хранения пробирки центрифугируют на микроцентрифуге 20 сек (для осаждения капель со стенок) и тщательно перемешивают на вортексе. После этого готовят реакционную смесь в специально предназначенной для этого микропробирке из расчета на одну пробу: деионизованной воды - 5,8 мкл, 10х буфера – 2,5 мкл, дНТФ - 2,5 мкл праймеров - по 1 мкл каждого и фермента Taq - полимеразы - 0,2 мкл. Фермент в реакционную смесь вносят в последнюю очередь и оставляют его вместе с наконечником в микропробирке. Затем в этот наконечник вставляют дозатор, настроенный на 15 мкл, тщательно перемешивают реакционную смесь не только круговыми движениями наконечника, но и поступательными движениями поршня дозатора (пипетированием). По окончании перемешивания добавляют по 15 мкл реакционной смеси в каждую микропробирку, включая контроли, после чего раскапывают минеральное масло. Минеральное масло вносят по одной капле из 1 мл наконечника микродозатора для предотвращения испарения реакционной смеси при термоциклировании. После этого в пробирку, обозначенную как отрицательный контроль, вносят 10 мкл деионизованной воды, а в пробирку, обозначенную как положительный контроль, - 10 мкл контрольной ДНК (контрольную ДНК необходимо вносить специально предназначенным для этого микродозатором!). Пробы в объеме 10 мкл вносят (также предназначенным для этого микродозатором) под минеральное масло.

По мере заполнения пробирки закрывают, нумеруют, помещают в амплификатор и проводят термоциклирование по следующей матричной программе:

94°-----3 мин x 1 цикл  
94°-----40 сек !  
58°-----40 сек ! 35 циклов  
72°-----40 сек !  
72°-----3 мин x 1 цикл  
10°-----хранение

*Учет результатов.* Продукты, полученные в ПЦР, анализируют методом электрофореза в 1,5–2% агарозе с добавлением бромистого этидия. Агарозу готовят на 1х ТАЕ буфере, который готовят из 50-кратного, путем разведения в 50 раз (состав 1 литра 50- кратного ТАЕ буфера: 242 г триса, ледяная уксусная кислота - 57 мл, 0,5 М раствор ЭДТА - 100 мл, бромистый этидий - 0,5 мкг/мл, рН 8,0). Доведенную до кипения и охлажденную до 50°С агарозу заливают в специальную ванночку, устанавливают гребенку и оставляют застывать при комнатной температуре. После полимеризации осторожно извлекают гребенку и переносят гель в камеру для проведения электрофореза. Затем к амплификату добавляют 4-5 мкл смеси, состоящей из 0,25% бромфенолового синего и 25% фиколла-400, приготовленной на дистиллированной воде, перемешивают при помощи того же наконечника и вносят в карманы геля. По окончании камеры подключают к источнику тока и задают напряжение 10-15 в/см. Электрофоретическое разделение продолжают в течение 25-35 мин до прохождения лидирующего красителя около 2/3 длины трека (рекомендуемая длина трека - 4 см), после чего извлекают гель из камеры и помещают на стекло трансиллюминатора с УФ излучением 310 нм.

Внимание! С гелем агарозы следует работать в перчатках,

поскольку бромистый этидий является мутагеном.

*Оценка результатов ПЦР:*

1. Положительный контроль - выявляются две специфических полосы размером 478 п.н. и 295 п.н.

2. Отрицательный контроль: полосы на уровне положительного контроля должны отсутствовать, наличие полос свидетельствует о контаминации тест-системы.

3. Анализируемые пробы: наличие одной или двух полос строго на уровне положительного контроля указывает на присутствие ДНК данного возбудителя.

4. Наличие полос, располагающихся выше или ниже контрольных, является неспецифическим ответом и во внимание не принимается.

5. Полученные результаты можно документировать с помощью видеосистемы или фотографированием геля с использованием оранжевого или интерференциального (594 нм) светофильтра.

Чувствительность метода – не менее 1000 геномов *Y. pestis* в 1 мл.

## Занятие 7.

### **Биологические свойства *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis***

- Изучение многосуточного роста возбудителей чумы и псевдотуберкулеза на плотных и жидких питательных средах.
- Подготовка и просмотр окрашенных по Граму мазков с агаровой и бульонной культур.
- Регистрация ферментации углеводов и спиртов на средах Гисса.
- Изучение потребности штаммов чумного микроба в аминокислотах.
- Изучение вирулентности возбудителя чумы на специальных средах.
- Подсчет вновь появившихся колоний (III порядка) на

- среде ВМ, сравнение с ростом на контрольной чашке.
- Обеззараживание посевов.
  - Окончательный учет РПГА и РНАт.

### **Занятие 8.**

#### **Биологические свойства *Y. pestis***

- Подсчет количества вирулентных и авирулентных клеток на среде Джексона-Берроуза или ДАС.
- Обеззараживание посевов.

### **Занятие 9.**

#### **Биологические свойства *Y. pestis***

- Изучение потребности чумного микроба в аминокислотах.
- Учет результатов. Обеззараживание посевов.

## **10.2. Контроль диагностических питательных сред**

Для выделения культуры возбудителя чумы и ее изучения используют питательные среды лабораторного изготовления, а также коммерческие сухие среды, имеющие номер госрегистрации и лицензию на изготовление. Каждая серия агара должна быть проверена на ростовые свойства и обеспечение формирования типичных по морфологии и характеру роста колоний. Нормативно-методические требования, предъявляемые к качеству сред, изложены в методических указаниях «Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза» 2007 г. (МУ 3.3.2.2124-06).

Качество сред оценивают по следующим биологическим показателям:

- чувствительность (определяют по максимальному разведению культуры, при котором на всех засеянных чашках или пробирках наблюдается рост);
- прорастание (процент выросших колоний микроорганизмов от числа засеянных клеток);
- эффективность (выход микробных клеток с 1 мл питательной среды);
- стабильность (отношение числа атипичных по морфологии, биохимическим, серологическим, фаголизабельным и другим свойствам колоний к числу колоний тест-штаммов);
- ингибция (степень подавляющего воздействия на постороннюю микрофлору);
- скорость роста (минимальное время вырастания культуры).

Для проверки диагностических питательных сред используют тест - штаммы:

*Y. pestis* EV, *Y. pestis* P-1680 - Закавказского горного очага и *Y. pestis* И- 2377 - Горно-Алтайского очага.

Методика проведения контроля питательных сред, схема и оценка качества представлены в приложении.

Проверенные питательные среды должны храниться в темном месте при постоянной температуре (от 4 до 20°C). Срок хранения агара не более 2 месяцев, после чего он должен проходить переконтроль для продления срока годности еще на 1 месяц.

Контроль ингибирующих свойств питательных сред.

При выделении возбудителя чумы из биологического материала или объектов внешней среды для подавления сопутствующей микрофлоры применяют среды с генцианвиолетом (генциановый фиолетовый), кристаллвиолетом или питательную среду

для выделения и культивирования чумного микроба. Ингибирующие свойства среды определяют как по отношению к чумному микробу, так и по отношению к микробам - ассоциантам, для этой цели используют тест-штаммы *P. Vulgaris* НХ 19 №222, *B. cereus* 8, *E. coli* 18.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ

### Занятие 10.

#### Бактериологический контроль диагностических питательных сред на чуму

- Приготовление взвеси суточной культуры *Y. pestis EV* концентрацией  $10^9$  м.к./мл по стандартному образцу мутности ГИСК им. Л.А.Тарасевича ОСО 42-28-85П 10 единиц и последовательных десятикратных разведений до  $10^2$  м.к./мл.
- Посев из взвесей, содержащих  $10^4$  и  $10^3$  м.к./мл, по 0,1 мл каждой дозы в 3 пробирки с 10 мл ПБ.
- Посев из взвесей, содержащих  $10^3$  и  $10^2$  м.к./мл, по 0,1 мл каждой дозы на 3 чашки проверяемого агара.
- Приготовление смеси из 1 мл взвеси культуры *Y. pestis EV*, содержащей  $10^3$  м.к./мл, и 1 мл взвеси протея, содержащей  $10^6$  м.к./мл.
- Посев смеси 0,1 мл на ПА с генцианвиолетом (1:500000 и 1:200000) по 3 чашки на каждую дозу ингибитора.
- Посев 0,1 мл из взвеси культуры *EV* концентрацией  $10^3$  м.к./мл на чашку с генцианвиолетом (1:500000 и 1:200000), по 3 чашки на каждую дозу.

## **Занятие 11.**

### **Контроль питательных сред на чуму**

- Просмотр посевов на пластинчатом агаре, регистрация величины и количества колоний.
- Регистрация появления видимого роста в бульоне.
- Оценка качества сред с генцианвиолетом. Подбор для работы ингибирующего разведения генцианвиолета.

## **Занятие 12.**

### **Бактериологический контроль питательных сред на чуму**

- Подсчет колоний па пластинчатом агаре.
- Регистрация наличия роста в бульоне.
- Заключение о пригодности сред.
- Обеззараживание посевов.

### **Лабораторная диагностика чумы у человека**

Лабораторные исследования на чуму проводят специализированные лаборатории, имеющие лицензию на данный вид деятельности.

Объектами для исследования от людей (больных, контактных) и трупов являются:

- отделяемое язвы или пунктат из карбункула, везикулы (кожная форма);
- содержимое бубона (бубонная форма);
- мокрота, слизь из зева и мазок с миндалин (легочная форма);
- испражнения (кишечная форма);
- кровь (все формы);
- в зависимости от поражений отдельных органов и систем - моча при наличии в ней крови, спинно-мозговая жидкость - при менингеальных явлениях (табл. 25).

Таблица 25

## Способы забора материала

Материал	Способы забора
Пунктат из бубона	Забирают стерильно шприцем емкостью не менее 5 мл. Пораженный участок и окружающую его ткань обрабатывают 70°-ным этиловым спиртом, затем 5%-ным раствором йода и вновь спиртом. Иглу осторожно вводят с таким расчетом, чтобы ее острое достигло центральной части бубона. Затем, оттянув до отказа поршень, медленно вытягивают иглу. После извлечения иглы из бубона через нее набирают в шприц 0,5 мл стерильного питательного бульона, содержимое выливают в стерильную пробирку и закрывают резиновой пробкой.
Содержимое везикулы (пустулы)	Иглу вводят у края образования и медленно продвигают в центр.
Пунктат из язвы и карбункула	Пунктируют плотный край.
Вскрывшийся бубон	Забирают материал отдельно из периферической плотной части и отделяемое свища.
Слизь из зева	Забирают стерильным ватным тампоном.
Мокрота	Забирают в стерильную широкогорлую стеклянную банку с притертой пробкой или крышкой.
Испражнения	То же.
Моча	То же.
Кровь	10 мл крови берут стерильным шприцем и 5 мл засевают у постели больного во флакон с 50 мл бульона и на чашки с плотной питательной средой.
От трупа кусочки пораженных органов	Забирают в стерильные широкогорлые стеклянные банки с притертыми пробками или крышками.

Посевы взятого материала желательно проводить у постели больного. Время от момента взятия материала и до начала его исследования не должно превышать 5-6 ч, если нет условий для хранения его на холоде. С целью сохранения материала можно использовать транспортную среду Кери-Блэра, консерванты Берлина и Башевой, жидкость Брокэ.

Лабораторное исследование на чуму начинается одновременно бактериоскопическим, бактериологи-



ческим, биологическим, иммуносерологическим и генетическим методами. Наряду с классической схемой лабораторного исследования выполняются экспресс-методы, позволяющие дать предварительный положительный ответ в течение 2-5 ч от начала исследования материала. К методам экспресс-диагностики относятся: иммунофлуоресцентный анализ, ПЦР, иммуно-суспензионные методы: система 2-3-компонентных реакций с эритроцитарными диагностикумами, иммуноферментный анализ, дот-иммуноферментный анализ, радиоиммунный анализ. Все экспресс-методы выполняются только после обеззараживания материала. Экспресс-методы используют на всех этапах исследования материала (нативный материал, после подрашивания, материал от «биопробных» животных, при идентификации культуры).

Из доставленного материала готовят мазки с окраской по Граму и метиленовым синим. При обнаружении первых случаев заболеваний подозрительных на чуму или трупа человека готовят не менее 6-8 мазков (один окрашивают метиленовым синим, второй – по Граму, третий – чумной люминесцирующей сывороткой, остальные оставляют неокрашенными для повторных исследований). Наличие типичных для заболевания чумой клинических проявлений и обнаружение в мазках биполярных грамотрицательных палочек овоидной формы дает право поставить предварительный диагноз - подозрение на чуму. Выявление специфически светящихся микробов, окрашенных чумной люминесцирующей сывороткой, подтверждает предварительный ответ.

Для посева необходимо использовать среды, имеющие регистрационное удостоверение Росздравнадзора и разрешенные к применению в РФ. Из отечественных

сред – питательная среда для выделения и культивирования чумного микроба сухая, выпускаемая ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора», и среды зарубежного производства, разрешенные к применению согласно методическим рекомендациям (МР 02.0-06) РосНИПЧИ «Микроб» производства компании HiMediaLaboratoriesPvtLtd.

Незагрязненный посторонней микрофлорой материал (пунктат из бубона, карбункула, содержимое пустулы, везикулы, кровь и т.д.) засевают на плотные и жидкие питательные среды. Материал, содержащий постороннюю микрофлору (мокрота, слизь из зева, вскрывшийся бубон, содержимое язвы), засевают на плотные среды с ингибитором посторонней микрофлоры. Пунктат из бубона, везикулы наносят бактериологической петлей или пастеровской пипеткой на чашку агара и распределяют его шпателем или петлей частыми штрихами, оставшийся материал вносят в пробирку с бульоном.

Жидкую мокроту (особое внимание уделяют участкам с прожилками крови) петлей (2-3 петли) или пастеровской пипеткой с широким капилляром наносят на поверхность агара, растирают шпателем или частыми штрихами петлей. Затем без обжигания переносят на вторую и третью чашки плотного агара. Если мокрота вязкая, то ее комочек захватывают стерильным пинцетом, переносят на поверхность агара и тщательно растирают шпателем или частым штрихом бактериологической петлей сначала в первой, затем во второй чашке.

Слизь из зева засевают ватным тампоном, остатки материала промывают в 1мл жидкой питательной среды и используют для заражения биопробных животных. Сгусток крови (если посев не сделан у постели

больного) из пробирки осторожно переносят в чашку Петри, разрушают его целостность стерильными препаративными иглами, затем жидкую часть крови набирают в пипетку, засевают во флаконы с бульоном и 0,1 мл - на агаровую пластину, рассеивая частым штрихом. Посевы инкубируют в термостате при 28°C, а для обнаружения фракции FI - при 37°C.

В первый день исследования с нативным материалом целесообразно ставить пробы с чумным бактериофагом ускоренным методом (приложение) и на чувствительность к антибактериальным препаратам диско-диффузионным методом (прямым посевом нативного материала сплошным газоном на чашку Петри). Это позволит при значительном числе клеток возбудителя чумы в материале получить результат чувствительности к антибиотикам через 20-24 ч с момента исследования, а не через 36-40 ч, как при постановке пробы на чувствительность к антибиотикам стандартизированным методом. Для выбора антибиотиков необходимо обратиться к схемам применения антибактериальных препаратов при экстренной профилактике чумы.

Биологическая проба является обязательной, так как не только повышает вероятность выделения культуры, но и необходима для ее идентификации. Ставят на морских свинках и/или белых мышах. Метод введения исследуемого материала зависит от характера материала. Незагрязненный материал вводят животным подкожно (0,5 мл морским свинкам и 0,2 мл белым мышам) или для ускорения гибели биопробного животного - внутрибрюшинно (0,5-1,0 мл морским свинкам и 0,3-0,5 мл белым мышам). Мокротой, слизью из зева, гноем из открытого абсцесса заражают кожным методом. В зависимости от метода введения, животное погибает на 3-9-й день. Ускорить постановку диагно-

за позволяет введение части биопробных животных (1 морской свинке и 1 белой мыши) гидрокортизона за 2 ч до заражения в дозе 5 мг (в 0,5 мл 0,85%-ного хлористого натрия) под кожу области бедра. Животных с пониженной резистентностью вскрывают на первые сутки - одну белую мышь, на третьи сутки – морскую свинку. Остальных вскрывают на шестые сутки. Чувствительность биопробных животных также можно повысить, если исследуемый материал ввести с желтком куриного яйца. У животных, погибших от чумы в результате подкожного или накожного заражения, в месте введения наблюдают полнокровие, серозно-геморрагическое пропитывание тканей, нагноение, некроз. Лимфатические узлы увеличены, гиперемизированы, часто инфильтрированы геморрагическим экссудатом, могут быть плотными или размягченными, окружающие ткани пропитаны студневидной серозно-геморрагической или гнойно-геморрагической жидкостью. В тканях узла могут быть очаги некроза или нагноения. В селезенке, печени, легких наблюдаются единичные или множественные узелки сероватого цвета. Узелки могут быть точечными или достигать величины булавочной головки. Вокруг некоторых из них наблюдаются венчики гиперемии. В легких могут быть очаги кровоизлияния и участки уплотнения темно-красного или серовато-красного цвета. Селезенка, печень, надпочечники увеличены, дряблой консистенции, полнокровны, с участками некроза. Иногда в брюшной полости имеется вязкий экссудат. При накожном заражении на месте введения часто наблюдаются мелкие везикулы, окруженные зоной гиперемии, или язвочки. При внутрибрюшинном заражении развивается экссудативный перитонит с образованием фибринозно-гнойных пленок на капсуле селезенки и

печени.

От погибшего животного (паренхиматозных органов, лимфатических узлов и крови) делают мазки-отпечатки, производят посевы на среды, готовят суспензию для заражения второго биопробного животного и исследования на наличие фракции I чумного микроба.

Выживших животных умерщвляют на 7 сутки и производят патологоанатомическое, бактериологическое и серологическое исследования.

Для обнаружения в нативном материале фракции I возбудителя чумы ставят реакцию пассивной гемагглютинации (РПГА) с иммуноглобулиновым и реакцию нейтрализации антител (РНАт) с антигенным эритроцитарными диагностикумами или иммунофлуоресцентный анализ с использованием чумной люминесцирующей сыворотки.

Ускоренный метод генодиагностики выполняется в течение 5-6 ч. Высокая разрешающая способность метода (1000 м.к./мл) позволяет использовать его, прежде всего, при исследовании нативного материала. Реакция выполняется на тест-системах «Ген Пест» для выявления ДНК *Y. pestis* методом полимеразной цепной реакции производства РосНИПЧИ «Микроб». Для постановки мультиплексной ПЦР используют праймеры, обеспечивающие специфичную амплификацию фрагментов ДНК двух генов *cafI* и *pla*, локализованных на собственных плаزمиде чумного микроба *pFra* и *pPst*, соответственно. На основании выделения в пробе ДНК возбудителя чумы (одной или двух плазмид) дается устный предварительный положительный ответ.

Через 18-24 ч. Изучают рост на плотной и жидкой питательных средах. При наличии типичного роста в бульоне делают мазки: окрашивают по Граму и метиленовым синим. С плотной питательной среды отбирают

типичные колонии с целью выделения чистой культуры и ее идентификации. Учитывают результаты постановки пробы с чумным бактериофагом ускоренным методом. При сомнительном результате на 2-3 подозрительные колонии наносят чумной бактериофаг. После инкубации в термостате в течение 10-12 ч проводят учет результатов пробы с чумным бактериофагом. Лизис колоний под действием чумного бактериофага подтверждает положительный ответ.

Учитывают результаты чувствительности к антибиотикам диско-диффузионным методом.

Через 36-48 ч. Выделенную культуру идентифицируют на основании следующих признаков:

- 1) характерная морфология микроба (микропрепараты из нативного материала и чистых культур);
- 2) характерная морфология роста на плотной и жидкой питательных средах;
- 3) чувствительность к чумному бактериофагу;
- 4) специфическое свечение при люминесцентной микроскопии чистой культуры;
- 5) наличие специфического для возбудителя чумы антигена фракции FI, выявленного в РПГА или РНАт;
- 6) ферментативная активность (глицерин, мочевины, рамноза, сахароза, глюкоза и др.);
- 7) одновременно с идентификацией проводят определение чувствительности к антибиотикам стандартизованным дискодиффузионным методом и методом серийных разведений в агаре или бульоне.

Через 60-72 ч производят учет результатов идентификации по следующим тестам:

- чувствительность к чумному бактериофагу и антибиотикам;
- наличие FI, выявленной методом флуоресцирующих антител и в РПГА-РНАт.

Для дальнейшей дифференциации выделенной культуры ставят тест на наличие пестицин-фибринолизин-плазмокоагулазной активности и ПЦР для детекции плазмид pFra и pPst.

Диагноз чумы у человека ставится на основании выделения у него культуры возбудителя чумы и ее идентификации, а так же при обнаружении специфического для чумного микроба антигена FI и специфических антител к антигену FI в сыворотках больных и переболевших.

### **Занятие 13.**

#### **Лабораторная диагностика чумы у человека**

*Исследование мокроты больного.*

- Подготовка мазков из мокроты, обработка части из них люминесцирующей сывороткой, смешанной с альбумином, меченым родамином, и части мазков - окрашивание по Граму.
- Посев мокроты на 2 чашки агара с генцианвиолетом переносом.
- Постановка пробы на чувствительность к антибиотикам ускоренным диско-диффузионным методом.
- Постановка ориентировочной пробы с бактериофагом Л-413С ускоренным методом.
- Постановка биопробы на морской свинке накожным методом (н/к) и белой мыши подкожно (п/к).
- Исследование крови больного.
- Приготовление мазков, окрашивание по Граму, синькой Леффлера и обработка люминесцирующей сывороткой, смешанной с альбумином, меченым родамином.
- Посев крови больного в ПБ.
- Посев крови на 2 чашки с ПА, на одну из чашек нанести бактериофаг Л-413С (методом «стерильного

пятна»).

- Постановка пробы на чувствительность к антибиотикам ускоренным дискодиффузионным методом.
- Постановка биопробы на морской свинке и белой мыши подкожным или внутрибрюшинным методами.

*Примечание: биопробных животных вскрывают тотчас после гибели. Выживших животных вскрывают через 6-7 суток.*

### **Лабораторная диагностика чумы у носителей**

Материал для исследования: грызуны, зайцеобразные, насекомоядные и наземные хищники, трупы мелких млекопитающих, остатки пищи из гнезд хищных птиц, материал от больных и павших верблюдов. В отдельных случаях исследуют материал от сайгаков, погадки хищных птиц, экскременты грызунов и хищников.

Животных, добытых живыми, умерщвляют прямо у капкана с помощью корнцанга. Трупы помещают в бязевые мешочки, которые плотно завязывают, снабжают этикетками, складывают в металлические отсадники, ящики или клеенчатые мешки. Кратковременное хранение материала осуществляют в прохладном месте. Живых грызунов помещают в отсадники, металлические ящики или ящики, обитые изнутри жестью, и дустируют. Ящики должны быть снабжены решетчатой крышкой.

Полевой материал доставляют в лабораторию в предельно короткие сроки, желательно в первой половине дня. К работе с полевым материалом приступают сразу после его поступления, однако допускается кратковременное его хранение (не более 20 ч) в помещении с низкой температурой (рефрижератор, ледник и др.).

Трупы животных после очеса погружают в 3%-ный мыльный раствор или другое моющее средство, за-



тем помещают на сетку, после того как раствор стечет, укладывают на вскрывочные доски, группируя по точкам добычи и видам.

При эпидемиологическом обследовании природного очага чумы тактика лабораторного подхода зависит от эпидемиологической ситуации в данном очаге:

- ситуация до обнаружения эпизоотии на данной территории;
- ситуация после выделения первой культуры возбудителя чумы.

До обнаружения эпизоотии у всех зверьков исследуют только печень и селезенку. Вскрытие проводят без отсепарирования кожи, откидывая кожно-мышечный лоскут на мордочку животного. Суспензии готовят из органов зверьков одного вида, добытых в одной точке обследования.

Для одной суспензии объединяют органы не более чем от 10 мелких зверьков, от 5 сравнительно крупных (сурки, хори и т.д.). Кусочки органов тщательно растирают в ступке со стерильным песком, затем добавляют небольшое количество 0,9%-ного раствора хлористого натрия рН 7,2 (не более 2 мл). Полученную суспензию используют для посева на плотные питательные среды, нанося каплю суспензии у края чашки и рассеивая ее по всей поверхности петлей частыми штрихами. Этой же суспензией заражают биопробное животное. После обеззараживания суспензия используется для поиска антигена.

При выделении первой культуры от животных на исследование целесообразно забирать кроме печени и селезенки еще кровь и проводить дублирование посевов –отпечатками органов и посевами суспензий. При посеве отпечатками на одну чашку агара может быть посеян материал от 2 животных.

При обнаружении характерных для чумы патологоанатомических изменений у животных, кроме печени, селезенки, крови, обязательно исследуют легкие, лимфоузлы (паховые, аксиллярные, глоточные, паратрахеальные, забрюшинные) и участки измененных органов и тканей. Из всех органов делают мазки-отпечатки и исследуют их. Органы от каждого животного сеют отпечатками на пластинки агара, затем собирают в ступку со стерильным песком и готовят суспензию, которую засевают на агар. Этой же суспензией заражают индивидуальную биопробу. Остальной материал после обеззараживания используют для серологического исследования, направленного на поиск специфических для чумы антигенов (РПГА-РНАт), а также для выявления ДНК возбудителя чумы в полимеразной цепной реакции (ПЦР). Суспензии сгустков крови сердца и крупных сосудов после инактивации исследуют серологически на наличие специфических антител (РПГА-РНАг).

Трупы животных, найденных в поле, исследуют так же, как зверьков с патологоанатомическими изменениями, но, кроме этого, у них обязательно исследуют костный или головной мозг (посевом на отдельную чашку и постановкой индивидуальной биопробы). Для посевов используют селективные питательные среды с ингибиторами роста посторонней флоры.

При исследовании полевого материала в качестве биопробных животных могут быть использованы белые мыши и морские свинки. Заражают биопробных животных подкожно в паховую область. В случае работы с сильно загрязненным материалом (загнившие трупы, субстраты нор, помет) применяют накожный метод заражения.

Павших биопробных животных исследуют, проводя вскрытие по полной схеме (отсепаровка кожи, ос-

мотр и посев лимфоузлов, посев всех органов, крови, серологическое исследование на наличие антигена). От павшей биопробы обязательно ставят пассажи до выяснения причины гибели. После обеззараживания суспензия органов павшей биопробы может быть исследована в ПЦР.

Биопробных животных, выживших после заражения, забивают через 6 суток также с полным бактериологическим исследованием без пассажа. При исследовании материала из сочетанных природных очагов чумы и туляремии биопробных животных забивают на 8-9-е сутки.

Чашки с посевами инкубируют при 28°C. Просмотр осуществляют через 24-48 ч и далее ежедневно до 5 суток от момента посева.

Выделенную культуру идентифицируют по следующим признакам:

- морфология роста на питательном агаре и бульоне;
- морфология клетки, характер окраски по Граму;
- лизис диагностическими бактериофагами Л-413С, Покровской;
- ферментация мочевины, рамнозы, глицерина;
- характерный рост на среде ЦДС (отсутствие способности к ферментации мочевины и лактозы);
- чувствительность к антибиотикам дискодиффузионным методом (при выделении первой культуры).

Окончательную идентификацию и изучение культуры чумного микроба проводят в стационарной лаборатории противочумной станции или института, имеющей разрешение на проведение экспериментальной работы с микроорганизмами I группы патогенности по следующим признакам:

- наличие F1;
- биохимическая активность (пестрый ряд), подвижность;
- вирулентность для лабораторных животных;

- плазмидный состав (pCad, pPst, pFra);
- способность к нитрификации и денитрификации;
- пестицин-фибринолизин-плазмокоагулазная активность;
- чувствительность к пестицину 1;
- питательная потребность (при необходимости).

Серологический метод исследования полевого материала. Все серологические исследования ведутся только с обеззараженным материалом и оттитрованными (не реже 1 раза в 2 недели) ингредиентами. Формалин используют нейтральной рН и с проверенной антибактериальной активностью.

Для поиска антител исследуют сыворотки, смывы из сердца и крупных сосудов или высушенные на фильтровальных бумажках образцы крови и сыворотки животных. Поиск антител осуществляют у зверьков, относительно резистентных к чумному микробу (малый, длиннохвостый, горный, даурский суслики, полуденная песчанка с левого берега Волги, даурская пищуха, мелкие куньи и др.). Для обнаружения антител используют РПГА с антигенным диагностикумом, а также РНАг с иммуноглобулиновым диагностикумом. При массовых исследованиях реакции ставят в два этапа: вначале каждая из реакций в двух лунках и только при положительных результатах ставят развернутые реакции для определения их титра. Система однонаправленных реакций весьма информативна, т. к. по соотношению титров двух реакций (превышение титра РНАг) можно судить о давности контакта зверька с микробом, а при достаточно большом количестве исследований – о фазе эпизоотии на данном участке территории.

При сомнительных результатах реакции повторяют после адсорбции исследуемого материала 50%-ной взве-

стью формализированных и несенсибилизированных эритроцитов, параллельно ставят идентичные реакции с гетерологичными диагностикумами (туляремийным, бруцеллезным, холерным и др.).

Для поиска антигена готовят суспензии из исследуемого материала (приложение) и ставят серологические реакции: РПГА и РТПГА с иммуноглобулиновым диагностикумом и РНАт с антигенным диагностикумом.

С целью подтверждения специфичности результатов следует тот же материал использовать в системе серологических реакций (РПГА-РНАт) с гетерологичными диагностикумами (туляремийным, бруцеллезным, холерным и др.).

Тактика применения иммуноферментного анализа для поиска антигена FI и антител к нему такая же, как при использовании иммуносуспензионных методов.

ПЦР используется при углубленном эпизоотологическом обследовании территории (преимущественно в пунктах долговременного наблюдения). Исследованию подлежат суспензии органов носителей чумы с характерными патологоанатомическими изменениями, трупов павших зверьков, трупов верблюдов, а также, при необходимости, суспензии эктопаразитов, субстраты гнезд грызунов, погадки и остатки пищи хищных птиц, пробы почвы и др. Для проведения генодиагностического анализа применяют «Тест-систему для выявления *Y. pestis* методом полимеразной цепной реакции», производства РосНИПЧИ «Микроб» (рекомендована комитетом МИБП МЗ РФ для практического использования).

Метод ДНК-зондов может быть использован как для характеристики плазмидного профиля штаммов при идентификации выделенных культур, так и при исследовании суспензии органов животного. Для повыше-

ния чувствительности метода возможно подращивание образцов путем помещения нейлонового фильтра с нанесенным материалом на поверхность агара Хоттингера на 16-24 ч при 28°C. После нанесения исследуемого материала на фильтр его инактивируют парами хлороформа. Для этого на крышку чашки Петри, в которую помещен фильтр с исследуемым материалом, наносят 0,5 мл хлороформа, выдерживают в таком виде (крышка снизу) в эксикаторе в течение 30 мин, после чего фильтр считается обеззараженным и может пересылаться для дальнейшего исследования в стационарную лабораторию противочумной станции или института.

#### **Лабораторная диагностика чумы у переносчиков**

Материал для исследования: блохи, счесанные с грызунов и собранные из гнездовой камеры норы, из ходов и из устьев нор и других мест обитания, включая жилища человека и надворные постройки. По эпидпоказаниям блох счесывают с домашних животных (кошек, собак); клещи, счесанные с грызунов (присосавшихся снимают пинцетом), собранные из нор, с поверхности земли вокруг нор, а также снятые с верблюдов, других сельскохозяйственных животных и различных объектов в соответствии с конкретными задачами обследования.

Эктопаразиты доставляются в лабораторию в стерильных пробирках под ватно-марлевыми пробками живыми или в консервирующей жидкости: 2%-ный раствор хлористого натрия с генцианвиолетом 1:200 000 и сразу по поступлению подлежат исследованию.

Блох исследуют индивидуально или групповым методом. Индивидуальному исследованию подлежат все эктопаразиты, собранные с трупов животных или животных с патологоанатомическими изменениями, похожими на чуму, а также с целью определения про-

цента зараженности блох.

Групповым методом исследуют блох, собранных с каждого грызуна или одной норы. В один посев, как правило, можно объединять не более 20-50 насекомых. Допускается объединять в одну пробу блох с грызунов из одного участка или из близлежащих гнезд.

Блох перед исследованием усыпляют эфиром и без предварительного промывания ссыпают в стерильную ступку, куда вносят 0,5 мл 0,9%-ного раствора хлористого натрия рН 7,2 или чумной антифаговой сыворотки. После растирания делают посев на агаровые пластинки.

Иксодовых клещей в один посев берут не более:  
пивших самок - 3, голодных – до 30,  
пивших нимф - до 15, голодных – до 50,  
пивших личинок - до 30 экземпляров.

Перед исследованием клещей промывают в 50-70°-ном спирте, затем в 2-3 порциях 0,9%-ного раствора хлористого натрия рН 7,2. При растирании напившихся клещей ступку прикрывают крышкой от чашки Петри, пивших самок перед растиранием разрезают ножницами. Полученную суспензию высевают на питательный агар. В отдельных случаях эту суспензию используют для заражения биопробных животных.

#### **Занятие 14.**

##### **Исследование мокроты и крови больного.**

- Просмотр посевов мокроты и крови больного на пластинчатом агаре под малым увеличением микроскопа, изучение начального роста колоний.
- Пересев крови с ПБ на чашку ПА.
- Учет ориентировочной пробы с бактериофагом.
- Учет чувствительности к антибиотикам ускоренным дискодиффузионным методом.

### **Исследование блох.**

- Приготовление суспензии из блох.
- Посев суспензии на ПА с генцианвиолетом.
- Извлечение желудка из хлороформированной блохи с помощью препаровальных игл на предметном стекле с лункой под малым увеличением микроскопа.
- Посев извлеченного желудка на чашку ПА с генцианвиолетом.
- Постановка биопробы на белых мышах с желтком.

### **Занятие 15.**

#### **Исследование мокроты больного. Выделение чистой культуры.**

- Просмотр роста на среде с генцианвиолетом, отбор похожих на рост возбудителя чумы колоний, приготовление мазков, окрашивание по Граму.
- Пересев отобранных колоний на сектора чашки ПА и ПА с генцианвиолетом, в ПБ.
- Исследование крови больного. Выделение и идентификация культуры.
- Просмотр посевов на чашках ПА, приготовление мазков, окрашивание по Граму.
- Пересев культуры на скошенный ПА и в бульон.
- Постановка пробы с бактериофагом Л-413С (приложение).
- Посев на среды Гисса с глюкозой, лактозой, рамнозой, арабинозой, глицерином.
- Посев на ЦДС (приложение).
- Посев в 0,3% ПА.
- Определение чувствительности к антибиотикам стандартизированным дискодиффузионным методом.



## **Занятие 16.**

### **Исследование мокроты больного. Идентификация выделенной культуры.**

- Просмотр роста культуры на секторах чашки ПА и в ПБ.
- Отбор одного из секторов, проверка культуры на чистоту роста мазком с окраской по Граму.
- Посев отобранной культуры на среды Гисса с глюкозой, лактозой, арабинозой, рамнозой, глицерином, ЦДС, в бульон для определения нитритов, в 0,3% ПА.
- Постановка пробы на фибринолитическую и коагулазную активность.
- Посев культуры бляшкой на 1,5% питательный агар с генцианвиолетом для определения пестициногенной активности.
- Определение чувствительности выделенной культуры к антибиотикам стандартизированным диско-диффузионным методом.
- Постановка пробы с диагностическими чумными бактериофагами (Л-413С, Покровской).
- Окончание исследования крови больного.
- Учет результатов идентификации культуры.
- Регистрация чувствительности к антибиотикам.
- Заключение по анализу, заполнение паспорта, обеззараживание объектов с посевами.

### **Исследование блох на чуму. Выделение культуры.**

- Просмотр посевов на чашках агара с генцианвиолетом.
- Отбор похожих на рост чумного микроба колоний.
- Пересев на сектора чашек ПА, ПА с генцианвиолетом и в бульон.

## Занятие 17.

### Исследование грызунов.

#### *Исследование трупа грызуна.*

- Приготовление мазков-отпечатков из органов грызуна.
- Посев печени, селезенки, крови, легкого, измененных лимфоузлов на сектора чашек ПА и ПА с генцианвиолетом.
- Приготовление суспензии из органов и посев на ПА и ПА с генцианвиолетом. Обработка части суспензии формалином для поиска F1.
- Посев крови из сердца в бульон (если нет признаков загнивания).
- Взятие крови для серологического исследования на антитела против F1, используя фильтровальную бумагу, пропитанную мертиолятом натрия.
- Посев костного или головного мозга на ПА.
- Постановка биопробы на белых мышах из суспензий органов и головного мозга.

#### *Исследование отловленных грызунов с патологоанатомическими изменениями в органах.*

- Посев печени, селезенки, крови, легкого, измененных лимфоузлов на сектора чашки ПА и ПА с генцианвиолетом.
- Приготовление суспензии из органов и посев на ПА и ПА с генцианвиолетом. Обработка части суспензии формалином для поиска F1.
- Посев крови из сердца в бульон.
- Взятие крови для серологического исследования на антитела против F1, используя фильтровальную бумагу, пропитанную мертиолятом натрия.
- Постановка биопробы на белых мышах.

#### *Исследование отловленных грызунов без патологоанатомических изменений в органах групповым методом (до выделения первой культуры).*

- Приготовление суспензии из печени и селезенки (до 10 мышевидных грызунов в пробу).
- Посев 2- 3 капель суспензии на чашку ПА и ПА с генцианвиолетом.
- Постановка РПГА-РНАт на обнаружение F1 чумного микроба с суспензией органов.
- Постановка биопробы на белых мышах.

### **Занятие 18.**

#### **Исследование мокроты больного. Идентификация выделенной культуры.**

- Учет пробы с чумными диагностическими бактериофагами.
- Учет ферментативной активности культур на средах Гисса, ЦДС.
- Учет теста на подвижность.
- Учет чувствительности выделенной культуры к антибиотикам.

#### **Исследование блох на чуму. Идентификация выделенной культуры.**

- Изучение морфологии роста культуры на ПА и в бульоне.
- Приготовление и просмотр мазков, окрашенных по Граму.
- Постановка пробы с диагностическими чумными бактериофагами.

#### **Исследование грызунов. Выделение культуры.**

- Просмотр посевов на пластинчатом агаре под малым увеличением микроскопа.
- Обработка части мазков-отпечатков люминесцирующей чумной сывороткой и части - по Граму.
- Серологические исследования материала.
- Постановка РПГА и РНАг на выявление антител против F1 с высушенными образцами крови.

- Постановка РПГА и РНАт на выявление F1 в обработанных формалином суспензиях.

### **Занятие 19.**

#### **Исследование мокроты больного. Идентификация выделенной культуры.**

- Регистрация ферментации углеводов на средах Гисса.
- Постановка пробы на пестициногенность (приложение).
- Постановка реакции на нитриты с реактивом Грисса (приложение).

#### **Исследование блох. Идентификация выделенной культуры.**

- Учет пробы с чумным фагом.

#### **Исследование грызунов. Выделение чистой культуры.**

- Просмотр посевов от грызунов на пластинчатом агаре.
- Отсев похожих на рост возбудителя чумы колоний на сектора чашки ПА и в бульон.
- Серологическое исследование материала от грызунов.
- Учет серологических реакций.

### **Занятие 20.**

#### **Окончание исследования мокроты больного.**

- Просмотр пробы на пестициногенность.
- Вскрытие биопробных животных.
- Изучени патологоанатомической картины.
- Приготовление мазков-отпечатков из органов и лимфоузлов биопробных животных.
- Обработка мазков-отпечатков люминесцирующей чумной сывороткой, окрашивание по Граму и синькой Леффлера.
- Посев печени, селезенки, лимфоузлов на чашку ПА, кровь - в бульон.

- Заключение по анализу, заполнение паспорта на культуру, выделенную из мокроты.

#### **Окончание исследования блох.**

- Вскрытие биопробных животных.
- Описание патологоанатомической картины.
- Приготовление мазков-отпечатков из органов и лимфоузлов.
- Посев печени, селезенки, лимфоузлов на чашку ПА, кровь - в бульон.
- Заключение по анализу.

#### **Исследование грызунов. Идентификация выделенной культуры.**

- Просмотр роста выделенной культуры на секторах пластинчатого ПА.
- Проверка отобранной культуры на чистоту роста мазком, окрашенным по Граму.
- Постановка пробы с диагностическим чумным бактериофагом Л-413С.
- Посев на среды Гисса с глюкозой, лактозой, арабинозой, рамнозой, глицерином; ЦДС и в 0,3% ПЖА.

### **Занятие 21.**

#### **Окончание исследования грызунов.**

- Изучение морфологии роста выделенной культуры на ПА и ПБ.
- Учет результатов постановки пробы с диагностическим чумным бактериофагом Л- 413С.
- Учет биохимической и уреазной активности, подвижности.
- Заключение по исследованию, обеззараживание посевов.

#### **Выделение культуры из фагированного материала.**

На агаровую пластинку перед посевом наносят 1-2 капли цельной антифаговой сыворотки (0,05-0,1 мл),

тщательно растирают ее стеклянным шпателем по всей поверхности агара и дают постоять 15-30 мин, чтобы сыворотка впиталась. Посевы на такой агар производят общепринятым способом.

Посев органов грызунов на чашку ПА, обработанную и не обработанную антифаговой сывороткой.

### **Занятие 22.**

#### **Выделение культуры из фагированного материала.**

- Просмотр роста культуры на чашках ПА, обработанной и не обработанной антифаговой сывороткой.
- Пересев выросшей культуры с чашки ПА, обработанной антифаговой сывороткой на две новые чашки ПА, обработанные и не обработанные антифаговой сывороткой.

### **Занятие 23.**

#### **Выделение культуры из фагированного материала.**

- Сравнение роста культур на чашках ПА, обработанных и не обработанных антифаговой сывороткой.
- Выделение культуры закончено, если рост на той или другой чашке идентичен.

#### **Экспрессные и ускоренные методы обнаружения чумного микроба в исследуемом материале (исследование смыва с объектов внешней среды)**

*Люминесцентно - серологический метод.*

- Приготовление мазков из исследуемого смыва, фиксация, обработка люминесцирующей чумной сывороткой с альбумином, меченым родамином.
- Просмотр мазков.

*Реакции с эритроцитарным чумным диагностикумом.*

- Постановка РПГА в трех лунках с обеззараженным кипячением в течение 5 мин исследуемым материалом и антительным эритроцитарным чумным диа-

- гностикумом.
- Постановка РТПГА в трех лунках с антительным эритроцитарным чумным диагностикумом.
  - ПЦР-анализ.
  - Исследование материала иммунохроматографическим методом.

### **10.3. Приложение**

#### **Определение пестициногенности**

На поверхность чашки 1,5% агара Хоттингера посеять 1-2 суточные агаровые культуры исследуемых штаммов бляшками диаметром 0,5 см. Для контроля на один из секторов засеять заведомо пестициногенный штамм. Посевы инкубировать при 28°C в течение 48-72 ч. На крышку чашки Петри положить ватный тампон, смоченный хлороформом, для стерилизации колоний. Через 1 ч тампоны удалить, чашку приоткрыть и выдержать до исчезновения запаха хлороформа 20-30 мин. Затем на поверхность агаровой пластины вылить 4,5 мл расплавленного и остуженного до 40-45°C 0,7% агара, содержащего 0,5 мл 3-4-часовой бульонной культуры индикаторного штамма. В качестве индикаторных штаммов могут быть использованы культуры бактерий псевдотуберкулеза (1серовара) и чумы (рамнозоположительные). Посевы инкубировать при 37°C. Учет результатов через 24-48 ч. У пестициногенных культур вокруг бляшек отсутствует рост индикаторного штамма.

#### **Определение чувствительности к бактериофагам двухслойным методом**

В пробирку с 4,5мл 0,7% агара (любая питательная основа) pH 7,2±0,1, предварительно расплавленного и остуженного до температуры 47±1°C, добавить 0,1 мл 1x10<sup>9</sup> м.к./мл (по ОСО в 10 ед) 18-19-часовой агаровой культу-

ры исследуемого штамма и после равномерного перемешивания вылить на пластину с 1,5-2,0%-ным агаром Хоттингера. Чашку подсушить 20 мин с полузакрытой крышкой при комнатной температуре и нанести по одной капле (0,02-0,03 мл) или одной петле диаметром 2 мм бактериофаги: чумной Покровской, чумной Л-413С и псевдотуберкулезный. После подсыхания каплей чашки перевернуть агаром вверх и инкубировать при температуре  $28 \pm 1$  °С. Результаты учитывают через 18 ч, в экстренных случаях - через 12 ч.

Наличие лизиса в виде одного стерильного пятна или четко контурированного «мутного» пятна, или группы мелких пятен на месте нанесения бактериофагов оценивают как положительный результат.

#### **Определение чувствительности к бактериофагу Покровской методом дифференциального рабочего титра**

ДРТ бактериофага чумного - наибольшее разведение бактериофага, одна капля которого способна образовывать «стерильное» пятно на газоне со штаммами чумного микроба и не образовывать в этом разведении «стерильных» пятен со штаммами псевдотуберкулезного микроба.

Дно чашки с 1,5-2% питательным агаром рН  $7,2 \pm 0,1$  расчертить на 8 квадратов. В пробирку с 4,5 мл 0,7%-ного агара расплавленного и остуженного до температуры 46-47 °С добавить 0,2 мл 18-20 часовой бульонной культуры испытуемого штамма, и после перемешивания вылить на подготовленную чашку. На застывший агар с культурой нанести петлей диаметром 2 мм капли цельного и разведения чумного бактериофага  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  и  $10^{-7}$ . После подсыхания каплей чашки перевернуть и инкубировать при температуре  $28 \pm 1$  °С в течение  $19 \pm 1$  ч.

Исследуемая культура является чумным микробом,



если она лизируется в ДРТ и выше бактериофагом чумным Покровской. Если исследуемая культура лизируется бактериофагом в разведении ниже ДРТ, то вопрос о принадлежности ее к чумному и псевдотуберкулезному микробу должен быть решен с помощью дифференциальных тестов.

### **Ускоренный метод пробы с чумным бактериофагом**

Исследуемый материал нанести на 3 чашки со средой Гуманского:

- на 1 чашку – одну каплю исследуемого материала и одну каплю чумного фага, растереть шпателем;
- на 2 чашку засеять материал, а затем у края чашки нанести каплю фага и дать ей стечь в виде «дорожки»;
- на 3 чашку (контрольную) внести только материал и сделать его рассев.

При наличии в исследуемом материале возбудителя чумы отмечают: на 1чашке - стерильные пятна, на 2-стерильную «дорожку» на месте нанесения фага, на 3- типичные колонии возбудителя чумы.

### **Определение фибринолитической активности**

Нативную плазму (человеческую) или цитратную кроличью предварительно оттитровать с культурой штамма *Y. Pestis* EV в разведениях 1:6, 1:8, 1:10. Плазму в рабочем разведении разлить по 0,5 мл в пробирки. Затем приготовить взвесь бактерий из односуточной культуры, содержащую  $10^9$  м.к./мл, и внести 0,25 мл взвеси в пробирку с плазмой, перемешать и добавить 0,1 мл 0,5% стерильного раствора хлористого кальция. В качестве контролей используют:

- 1) 0,5 мл плазмы в рабочем разведении, 0,25 мл 0,9% раствора хлористого натрия рН 7,2 и 0,1 мл 0,5% хлористого кальция (отрицательный);
- 2) 0,5 мл плазмы, 0,25 мл взвеси одно-двух суточной агаровой культуры *Y. pestis* EV и 0,1 мл 0,5% стериль-

ного раствора хлористого кальция (положительный).

Посевы инкубируют при 37°C. Через 40-60 мин проверяют образование сгустка. Если за 60 мин сгусток не образовался, реакцию следует повторить. Учет результатов произвести через 18-20 ч. В положительном случае наблюдается различная степень расплавления сгустка.

### **Определение плазмокоагулазной активности**

Цельную нативную человеческую или цитратную кроличью плазму разлить по 0,5 мл в пробирки и затем в каждую из них засеять полную петлю диаметром 1 мм одно-двух суточной культуры исследуемых штаммов.

В качестве контролей использовать:

- 1) 0,5 мл плазмы и петлю агаровой культуры *Y. pestis* EV (положительный);
- 2) 0,5 мл плазмы без каких-либо добавлений (отрицательный).

Посевы инкубировать при 28°C. Учет производить через каждый час с просмотра контролей. Плазма без культуры должна быть жидкой, а в пробирке с *Y. Pestis* EV через 1-2 ч образуется сгусток. Если через 2-3 ч сгусток не образовался, наблюдение продолжать до 24 ч, после чего, в случае отсутствия сгустка, пробу на плазмокоагулазу надо считать отрицательной.

### **Рост на ЦДС**

Среда предназначена для дифференциации бактерий по их способности ферментировать глюкозу, лактозу и мочевины. Комплексный индикатор Андрее и бромтимоловый синий при кислой реакции окрашивает среду в оранжевый цвет, при щелочной – в синий. Незасеянная среда имеет темно-зеленый цвет.

В среде глюкоза содержится в малой концентрации (0,1%), поэтому в скошенной части агара (аэроб-

ные условия) бактерии утилизируют ее полностью в первые часы роста. К моменту учета реакции (24-48 ч) для своего питания микроорганизмы используют уже пептоны, имеющиеся в среде в качестве белковой питательной основы. При этом происходит образование аммиака и подщелачивание среды (синий цвет). В столбике (анаэробные условия) сохраняются кислые продукты расщепления глюкозы (оранжевый цвет). Таким образом, бактерии, ферментирующие глюкозу без газообразования и не ферментирующие лактозу и мочевины, через 24-48 ч изменяют столбик в оранжевый цвет без разрывов, а скошенную поверхность – в сине-зеленый. Бактерии, сбрасывающие глюкозу и лактозу, вызывают подкисление всей среды (столбик и скошенная часть оранжевые). Лактоза входит в состав среды в концентрации, превышающей в 10 раз концентрацию глюкозы (1%), вследствие чего кислая реакция через 24-48 ч сохраняется не только в столбике, но и в скошенной части среды.

Присутствие в среде мочевины позволяет определять наличие у бактерий фермента уреазы. Расщепление мочевины завершается выделением аммиака ( $\text{NH}_3$ ), под действием которого вся среда приобретает синий цвет. Учет ферментации углеводов при этом невозможен.

Посев проводят вначале по скошенной части в виде прямой линии, затем в толщу агарового столбика и заканчивают по скошенному агару штрихом. Укол в толщу агарового столбика не должен достигать дна с тем, чтобы не нарушить условия для сбрасывания глюкозы в относительно анаэробных условиях. Посевы инкубируют при  $28^\circ\text{C}$ . Результаты учитывают через 24-48 ч.

## 11. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА БРУЦЕЛЛЕЗА

### 11.1. Биологические свойства возбудителя бруцеллеза

Возбудитель бруцеллеза относится к роду *Brucella*, который входит в группу грамотрицательных, аэробных/микроаэрофильных палочек и кокков к альфа 2 подгруппе класса *Proteobacteria*. Бруцеллы являются грамотрицательными, факультативными внутриклеточными патогенами, вызывающими заболевание у большого числа животных и человека. Род *Brucella* состоит из 7 самостоятельных видов, различающихся по биохимическим, метаболическим, антигенным и вирулентным характеристикам: *Brucella melitensis* (преимущественно поражает коз и овец), *Brucella abortus* (преимущественно вызывает заболевание у крупного рогатого скота), *Brucella suis* (преимущественно инфицирует свиней), *Brucella neotomae* (вызывает поражение кустарниковый крыс), *Brucella ovis* (вызывает эпидидимиты у баранов), *Brucella canis* (инфицирует собак) и недавно выделенный вид - *Brucella maris* (поражает морских млекопитающих). Некоторые виды бруцелл подразделяют на биовары. Для *B. melitensis* известны 3 биовара, для *B. suis* - 5 биоваров, и 7 биоваров для *B. abortus*. *B. maris* подразделяют на 2 биовара - *cetaceae* (выделяют от китообразных) и *pinnipediae* (выделяют от ластоногих).

Морфологически все виды и биовары бруцелл не отличаются друг от друга. Они имеют вид мелких нежных палочек, овоидной или слегка удлинённой формы. При сравнительном изучении морфологии бруцелл в электронном микроскопе клетки *B. melitensis* преимущественно имеют кокковидную форму, *B. abortus* и *B. suis* - палочковидную. Размер бруцелл кокковидных форм 0,3-0,6 мкм, палочковидных - 0,6-1,5 мкм.

Расположение бруцелл в мазках чаще всего беспорядочное, отмечается более или менее выраженный полиморфизм. Бруцеллы неподвижны, спор не образуют, при определенных условиях (воздействие специфическим бактериофагом, выращивание на средах с добавлением 10% иммунной сыворотки и др. формируют капсулу. Они грамм-отрицательны, при окраске по методу Козловского - розового цвета. Оптимальной температурой культивирования бруцелл является 37°C, максимальный рост наблюдается при рН 6,8-7,2.

Отдельные биовары *B. abortus* и некоторые представители *B. ovis* в отличие от *B. suis* и *B. melitensis* в первых генерациях требуют для своего роста повышенного (5-10%) содержания CO<sub>2</sub>.

Культуры бруцелл, особенно первые генерации, характеризуются замедленным темпом роста на питательных средах, поэтому посеvy инфицированного материала от человека и животных инкубируют при 37°C в течение 10-30 суток. Лабораторные штаммы при пересевах развиваются быстрее, но и у них фаза в среднем составляет 18-30 часов. Бруцеллы хорошо растут на печеночных средах, агаре Мартена, Альбими, эритрит-агаре, сухом агаре «Д», на мясопептонном агаре с добавлением глюкозы и глицерина.

Молодые колонии бруцелл в S-форме на агаре выпуклые, круглые с ровными краями и гладкой поверхностью, при просмотре в падающем свете - белесоватые, проходящем - янтарно-желтые. Величина колоний может в значительной степени колебаться. На 7-10 сутки выращивания колонии становятся крупными, сохраняют прозрачность, уплощаются. Под микроскопом колонии гомогенные с нежной зернистостью в центре.

Культуры бруцелл при посеве штрихом на скошен-

ный агар образуют нежный, прозрачный, блестящий, влажный, постепенно грубеющий налет маслянистой консистенции. При выращивании бруцелл в бульоне наблюдается равномерное помутнение среды. В старых бульонных культурах отмечается пристеночный кольцевидный рост.

Культуры бруцелл при длительном культивировании на плотных и, особенно, жидких питательных средах и при не-благоприятных условиях роста диссоциируют. Известны R-ше-роховаты, L- и промежуточные формы колоний. При диссоциации у культур изменяются агглютинабельные, биохимические свойства, вирулентность и антигенная структура (табл. 26).

Выделение культуры предварительно проверяют на наличие признаков диссоциации, изучая рост в бульоне, форму колоний, эмульгируемость в физиологическом растворе, прижизненную окраску колоний кристаллическим фиолетовым, термопреципитацию и пробу с трипафлавином.

Таблица 26

Характеристика S- , R-, и L- форм бруцелл

Признаки	S-форма	R-форма	L-форма
Рост на агаре	Нежный, влажный	Более грубый	Голубовато-серый налет
Колонии	Круглые, выпуклые, пра вильно контурированные, - гомогенные или нежно зернистые, поверхность гладкая, блестящая	Круглые, менее выпуклые, иногда с ровными краями, грубозернистые, поверхность неровная, матовая	Мелкие, до 2-3 мм, круглые колонии, часто вырастают в агар, слизистые или крошковидные. Под микроскопом имеют вид яичницы-плотный центр и более светлые края

Рост в бульоне	Гомогенный, без просветления	Зернистый, хлопчатый с осадком и просветлением	Резко выраженный полиморфизм при фазово-контрастном микроскопировании. Клетки увеличенные в виде шаров, грушеподобной формы, колец, запятых, нитей, неправильной формы
Суспендируемость в физиологическом растворе	Взвесь равномерная, стойкая	Взвесь хлопчатая, нестойкая	Плохая, взвесь крошковидная или тяжами
Агглютинабельность с S-сывороткой	До титра сыворотки	Неспецифическая в физиологическом растворе	У стабильных L-форм отсутствует
Вирулентность	Высокая	Часто резко ослабленная	Низкая
Проба на диссацию	Отрицательная	Положительная	Положительная

С диссоциированными культурами проводят дополнительные исследования, подтверждающие их принадлежность к роду *Brucella*. К ним относят ориентировочную реакцию агглютинации с сывороткой анти-R или посев выделенной культуры на глюкозо-глицериновом агаре; с хлористым кальцием, на котором вокруг роста культуры бруцелл, независимо от состояния диссциации, образуется белая зона.

Бруцеллы продуцируют каталазу, уреазу, гиалуронидазу, пероксидазу, амилазу, липазу, фосфатазу, цитохромоксидазу и некоторые другие ферменты.

При росте на питательных средах в процессе метаболизма бруцеллы образуют сероводород, интенсивность выделения которого у отдельных видов и биоваров выражена по-разному.

Бруцеллы чувствительны к бактериостатическому действию некоторых красителей. Установлено, что красители вступают в связь с питательным субстратом среды, изменяют ее и среда становится неблагоприятной для роста культуры. Различные виды и биовары бруцелл обладают разной степенью чувствительности к анилиновым краскам.

Известны несколько типов вирулентных бруцеллезных бактериофагов (Tb, Wb, Fi, BK<sub>2</sub>), сходных по морфологии, серологии и спектру литического действия.

Бруцеллы обладают выраженными антигенными свойствами. Установлено, что количество специфических антигенов А и М, присущих S-формам бруцелл, у каждого вида неодинаково. У *B. melitensis* количественное отношение А антигена к М 1:20, а у *B. abortus* - 20:1. Различие в антигенной структуре бруцелл удается выявить с помощью моноспецифических сывороток антимерелитензис и антиабортус (табл. 27). На основании изучения биохимической активности и антигенной структуры бруцелл исследователи предлагают различные тесты как для идентификации рода бруцелл, так и для дифференциации отдельных видов и биоваров (табл. 27).

Бруцеллы обладают устойчивостью к воздействию низких температур и малоустойчивы к высокой температуре. В жидких культурах при 60°C они погибают через 30 минут, при 80-85°C - через 5 минут, при кипячении - моментально. На бруцеллы губительно действует прямой солнечный свет. Различные дезинфицирующие вещества – 2% раствор карболовой кислоты, 3% раствор лизола, 0,2% раствор хлорной извести, 0,01% раствор хлорамина, 0,1% раствор сулемы - убивают их течение нескольких минут.



Таблица 27

Дифференциальные свойства видов и биоваров рода *Brucella*

Вид	Биовар	Потребность в CO <sub>2</sub>	Продукция H <sub>2</sub> S	Рост на средах с красками		Агглютинация с моноспецифич. сыворотками			Лизис фагом "ГБ" RTD	Основной хозяин
				Тионин	Осн. фуксин	А	М	Р		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>B.abortus</i>	1	(+)	+	-	+	+	-	-	Л	крупный рогатый скот
	2	(+)	+	-	+	+	-	-	Л	
	3 <*>	(+)	+	+	+	+	-	-	Л	
	4	(+)	+	-	(+)<***>	-	+	-	Л	
	5	-	-	+	+	-	+	-	Л	
	6<*>	-	(+)	+	+	-	+	-	Л	
	9	-	+	+	+	-	+	-	Л	
<i>B.melitensis</i>	1	-	-	+	+	-	+	-	ОЛ	Овцы, козы
	2	-	-	+	+	-	+	-	ОЛ	
	3	-	-	+	+	+	+	-	ОЛ	
<i>B.suis</i>	1	-	+	+	(-)<***>	+	-	-	ОЛ	свиньи
	2	-	-	+	-	+	-	-	ОЛ	свиньи, зайцы
	3	-	-	+	+	+	-	-	ОЛ	свиньи
	4	-	-	+	(-)	+	+	-	ОЛ	Олени
	5	-	-	+	-	-	+	-	ОЛ	мышевидные грызуны
<i>B.neotomae</i>		-	+	-	-	+	-	-	ОЛ или ЧЛ	Пустынные кустарниковые крысы
<i>B.ovis</i>		+	-	+	(-)	-	-	+	ОЛ	овцы
<i>B.canis</i>		-	-	+	-	-	-	+	ОЛ	собаки

Л - полный лизис, ЧЛ - частичный лизис, ОЛ - отсутствие лизиса.  
+ (+) большинство штаммов положительные, (-) большинство штаммов отрицательные.

<\*> Для более точной дифференциации *B. abortus* биовар 3 и 6 используется тионин 1:25000 (биовар 3+, биовар 6-). <\*\*\*> Некоторые штаммы этого биовара (биовар 4) ингибируются основным фуксином. <\*\*\*> Некоторые штаммы могут быть резистентны к основному фуксину, пиронину и сафронину О.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ

Работа со штаммами бруцелл является одной из наиболее опасных. С культурами этих микроорганизмов и материалом, содержащим их, следует обращаться с тщательной предосторожностью. Рекомендуется все манипуляции с живыми культурами бруцелл проводить только в боксах максимальной защиты или в помещениях с вытяжной защитной вентиляцией в полном противочумном костюме. Обеззараживание объектов, инфицированных возбудителем бруцеллеза, осуществлять автоклавированием. Петли, шпатели обеззараживать на огне. Защитные боксы дезинфицировать парами формальдегида или орошением 3% раствором перекиси водорода.

Работу с вирулентными культурами, особенно с *B. melitensis*, следует свести до минимума, там, где возможно заменить авирулентными.

### Занятие 1.

#### Изучение культурально-морфологических и агглютинабельных свойств *B. abortus* 19 ВА

- Изучение характера роста культуры на скошенном агаре.
- Изучение морфологии колоний на пластинчатом агаре.
- Изучение характера роста культуры бруцелл в бу-

льоне Хоттингера.

- Изучение морфологии микробов в мазках.
- Приготовление 2 мазков из бульонной культуры, фиксация; окрашивание одного мазков по Граму, второго - люминесцирующей бруцеллезной сывороткой.
- Постановка ориентировочной реакции агглютинации с бруцеллезной агглютинирующей сывороткой.

### **Дифференциация видов бруцелл (демонстрация)**

- Бактериостатический метод (приложение).
- Образование сероводорода (приложение).
- Лизис фагом «Тв» (приложение).
- Реакция агглютинации с моноспецифическими сыворотками.
- Уреазная активность.

## **Занятие 2.**

### **Изучение культурально-морфологических и агглютинабельных свойств *B. abortus* 19 ВА**

- Изучение характера роста S- и R-форм бруцелл на пластинчатом агаре и в бульоне.
- Изучение культуры в ориентировочной реакции агглютинации с бруцеллезной агглютинирующей сывороткой в разведении 1:25.

- Постановка реакции с трипафлавином (приложение).
- Постановка реакции термореципитации (приложение).

Предварительный учет результатов через 2 часа, окончательный - через 24 часа.

- Изучение диссоциации штаммов бруцелл методом Уайта-Вильсона.

## **11.2. Лабораторная диагностика бруцеллеза**

Разнообразные клинические проявления бруцеллеза приводят к необходимости широкого использования

лабораторных методов исследования: бактериологического, биологического, серологического и аллергического. Комплекс лабораторных исследований с обязательным учетом клинических, эпидемиологических и эпизоотологических данных обеспечивает правильную диагностику заболевания.

Работа по выделению и дифференциации бруцелл из любого исследуемого материала должна проводиться в строгом соответствии с санитарными правилами СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)».

**Бактериологический метод.** Для исследования на бруцеллез в лабораторию поступает патологический материал от больных людей (кровь, мокрота, гной, суставная жидкость, пунктат из селезенки, моча), сельскохозяйственных животных (абортированный плод, лимфатические узлы, паренхиматозные органы, кровь, моча, молоко, молочные продукты) и различные объекты окружающей среды (вода, навоз). Материал для исследования забирают в стерильную посуду.

Для выделения культур бруцелл всех видов используют печеночные и мясопептонные агары в различных модификациях, агар Альбими, сухие питательные среды - агар «Д» и эритрит агар. Посев материала производят на качественные, предварительно проверенные питательные среды, выращивают при 37°C в аэробных условиях и с повышенным (5-10%) содержанием углекислого газа.

Исследование крови необходимо проводить во время лихорадочного состояния больного до лечения антибиотиками, так как в этот период наблюдается наибольший процент выделения культур. Кровь в количестве не менее 10 мл стерильно берут из локтевой вены и засевают по 5 мл в два флакона среды Кастанеда. На-

чиная с четвертого дня, посевы ежедневно просматривают и, при отсутствии роста культуры, поверхность агара орошают бульоном путем осторожного покачивания флакона. При положительном результате на поверхности агара появляются колонии бруцелл. Если в течение месяца роста бруцелл не обнаруживают, то делают контрольный высев из бульона среды Кастанеда на твердую питательную среду.

При обследовании людей на бруцеллез для удобства доставки флаконов с кровью можно пользоваться транспортной жидкой средой, которую готовят заранее и хранят в лаборатории в течение полугода. Кровь доставляют в лабораторию в транспортной среде, засевают на среду Кастанеда и исследуют по общепринятой схеме.

Бруцеллы можно выделить из костного мозга, мочи, спинномозговой жидкости, грудного молока, желчи, мокроты, трупного материала и т. д. Исследуемый материал по 0,1 мл засевают на пластинки питательного агара и по 5-10 мл на жидкие питательные среды. Для задержки роста посторонней микрофлоры при исследовании загрязненного материала к среде добавляют генцианвиолет (1:200 000) или антибиотики (пенициллин 0,25 ед/мл и стрептомицин 0,05 ед/мл).

Особого внимания заслуживает получение культуры из молока сельскохозяйственных животных. Забор молока у овец, коров, верблюдов и коз рекомендуется проводить путем сдаивания его последних порций из каждого соска вымени по 10 мл в стерильную посуду. Если исследовать молоко в течение первых суток не удается, то его консервируют добавлением сухой борной кислоты 1%, генцианвиолета 1:25 000. Для исследования молока из больших емкостей забирают 100 мл верхнего слоя, затем перемешивают и набирают еще

100 мл.

Лучшие результаты дает посев сливок, полученных центрифугированием молока при 2,5-3 тыс. об/мин в течение 3-5 мин или путем отстаивания в течение одних суток в холодильнике. Сливки в количестве 0,1-0,2 мл засевают на твердую питательную среду с подавителем посторонней микрофлоры (4-6 пробирок на 1 пробу).

Бактериологический метод считается самым достоверным, т. к. выделение бруцелл является неопровержимым доказательством бруцеллезной инфекции. Отрицательные результаты бактериологического исследования не дают права для заключения об отсутствии заболевания.

**Биологический метод.** Для выделения бруцелл из материала, загрязненного посторонней микрофлорой или содержащего малые концентрации возбудителя, в качестве биологической пробы используют морских свинок (весом 250-300 г) или белых мышей (весом 17-18 г). Исследуемый материал в объеме не более 0,5 мл вводят подкожно в паховую область белой мыши и 1 мл морской свинке.

Вскрытие белых мышей производят через 20-25 дней, а морских свинок - через 30-35 дней после введения материала. Перед вскрытием у свинок кровь из сердца исследуют в реакции агглютинации. Для посевов у морских свинок берут лимфатические узлы (паховый, подчелюстной, шейный, парааортальный), кусочки селезенки, печени, костный мозг, кровь, мочу; у белых мышей - лимфатические узлы (паховый, аксиллярный, парааортальный, подчелюстной), кусочки селезенки и печени. Лимфатические узлы, кусочки печени и селезенки помещают в стерильную чашку. Костный мозг извлекают пипеткой из рассеченной бедренной ко-

сти. Посевы крови из сердца, мочи и костного мозга производят стерильной пипеткой непосредственно на питательную среду (агар и бульон). Лимфатические узлы и органы перед посевом надсекают ножницами, берут стерильной деревянной палочкой, вносят первоначально в пробирку с агаром, раздавливают и тщательно втирают материал в поверхность питательной среды. Затем остатки посевного материала переносят в пробирку с бульоном. Палочка должна быть длиной 25-30 см, диаметром 4-5 мм, хорошо отструганная, с несколько заостренным концом. После использования ее погружают на 1 час в дезраствор.

Все посевы дублируют (часть помещают в условия повышенного содержания углекислоты), выдерживают при 37°C до 30 дней. Для предотвращения высыхания питательных сред пробирки заливают парафином или закрывают резиновыми колпачками.

Посевы просматривают каждые 3-4 дня. Из помутневших бульонов делают высев в пробирки со скошенным агаром. Колонии бруцелл на пластинчатом агаре становятся видимыми на 5-7 сутки, иногда позднее. По истечении 30 дней наблюдение прекращают. Если за это время рост не появился, посевы уничтожают, а результаты бактериологического исследования считают отрицательными.

Результат оценивают положительно при выделении хотя бы одной колонии бруцелл. Идентификацию возбудителя бруцеллеза проводят по: по характеру роста культуры на плотных питательных средах; морфологии микроба в мазках, окрашенных по Граму, Козловскому; агглютинации со специфической бруцеллезной сывороткой на стекле и объемным методом; свечению на 3-4+ культур, обработанных бруцеллезной люминесцирующей сывороткой.

Культуры предварительно проверяют на наличие признаков диссоциации, одним из перечисленных выше методов.

Дифференциации (определение видов и биоваров) подлежат культуры в S-форме после идентификации.

Подкомитетом по таксономии бруцелл Международного комитета номенклатуры бактерий и Объединенным комитетом экспертов ФАО/ВОЗ по бруцеллезу в 1972 г. были определены единые тесты для проведения идентификации и дифференциации бруцелл для всех стран мира.

О видовой принадлежности культуры бруцелл и биоварах судят на основании результатов комплексного изучения отношения выделенных культур к условиям выращивания (при повышенном содержании углекислоты или в обычных аэробных условиях), чувствительности к анилиновым краскам (бактериостатическим методом), способности образовывать сероводород, чувствительности к бруцеллезному фагу «Гв», окислительно-метаболических тестов, агглютинабельных свойств культур с использованием монорецепторных сывороток (антиабортус и антимеритензис) и дополнительного исследования уреазной активности, вирулентности и других признаков. Дифференциацию бруцелл на виды и биовары проводят в параллельных опытах испытуемых штаммов с референтными всех трех видов бруцелл.

**Серологические и аллергические методы исследования на бруцеллез.** Серологические реакции и аллергическая проба являются общедоступными методами и применяются для диагностики бруцеллеза наряду с бактериологическим и биологическим методами.

В случае малой обсемененности пробы и отрицательных результатов, полученных при посеве исследуемо-



го материала на питательные среды и заражении лабораторных животных, серологический метод может быть единственным, позволяющим диагностировать бруцеллез. В зависимости от целей исследования используют те или иные серологические методы.

При проведении эпидемиологического исследования в очагах применяют реакцию агглютинации пластинчатую (Хеддльсона) и объемную (Райта), реакцию Кумбса, РСК, РДСК, РПГА, кожную аллергическую пробу, иммуноферментный анализ (ИФА). Перед профилактической вакцинацией населения можно ограничиться постановкой пластинчатой реакции агглютинации (Хеддльсона) и кожной аллергической пробы.

Для диагностики острого и подострого бруцеллеза ставят реакцию Хеддльсона, Райта и РПГА. В случаях отрицательного результата используют реакцию Кумбса.

При диагностике хронического бруцеллеза и проведении диспансерного наблюдения за переболевшими рекомендуют наряду с реакциями Хеддльсона, Райта, РПГА, использовать реакцию Кумбса и аллергическую пробу (Бюрне).

Серологические реакции и аллергическая кожная проба по своему диагностическому значению в различные периоды заболевания не равноценны, вследствие чего не могут заменить друг друга. Это обуславливает необходимость применения комплексного серологического метода, являющегося наиболее надежным способом диагностики бруцеллеза.

В ранние сроки от начала заболевания (первые 6 месяцев) диагностическая ценность серологического метода выше, чем аллергического. Серологические реакции в этот период оказываются положительными почти в 95% случаев. По мере удлинения срока заболевания процент положительных серологических

реакций начинает снижаться. При проведении обследования необходимо учитывать, что высокие титры антител всегда указывают на наличие инфекции, антитела в низких титрах или их полное отсутствие не исключает возможности заболевания. В связи с этим рекомендуется проводить повторные исследования с интервалом 1-2 недели, особенно при подозрении на острую форму бруцеллеза.

Для постановки диагноза бруцеллеза у крупного рогатого скота применяют серологические и аллергические методы. Обследование начинают с постановки роз-бенгал пробы (РБП). Сыворотки, с которыми получена положительная РПБ, исследуют в РА Райта, РСК (РДСК), РПГА для установления титра агглютининов и наличия комплементсвязывающих антител. Исследование проводят двукратно с промежутком в 30 дней.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ**

### **Занятие 3.**

#### **Лабораторный диагноз бруцеллеза у человека**

*Бактериологическое исследование крови больного человека*

- Посев крови больного по 4 мл в 2 флакона накопительной среды Кастанеда (1 флакон - в CO<sub>2</sub>-инкубатор).
- Посев крови больного по 0,1 мл на 4 пробирки скошенного питательного агара (2 пробирки - в CO<sub>2</sub>-инкубатор). Инкубирование всех посевов при 37°C.

*Биологическое исследование крови больного человека*

- Введение морской свинке подкожно 1,0 мл крови больного человека.

#### **Лабораторный диагноз бруцеллеза у крупного рогатого скота**

### *Бактериологическое исследование молока*

- Центрифугирование молока при 3 тыс. об/мин. в течение 3-5 мин.
- Соединение сливок и осадка.
- Посев по 0,1 мл смеси сливок и осадка на 4 пробирки агара с генцианвиолетом или 4 пробирки агара с антибиотиками (2 засеянные пробирки - в CO<sub>2</sub>-инкубатор).

### *Биологическое исследование молока*

- Введение смеси сливок и осадка подкожно морской свинке в объеме 1,0 мл.

*Примечание: центрифугирование молока проводится в боксе повышенной защиты.*

## **Занятие 4.**

### **Серологический диагноз бруцеллеза у человека**

- Постановка с исследуемыми сыворотками пластинчатой реакции агглютинации Хеддльсона (приложение).
- Исследование сыворотки больного в реакции Райта, давшей положительный результат в реакции Хеддльсона. Учет результатов через 24 часа.
- Постановка РПГА с исследуемыми сыворотками, учет результатов через 2 и 24 часа.

## **Занятие 5.**

### **Серологический диагноз бруцеллеза у крупного рогатого скота**

#### *Исследование сыворотки крови животных*

- Постановка с исследуемыми сыворотками пластинчатой реакции агглютинации с роз-бенгал антигеном (приложение).
- Исследование сыворотки крови животного с

положительной реакцией роз-бенгал в объемной реакции Райта. Учет реакцию агглютинации через 24 часа.

#### *Исследование молока на бруцеллез*

- Постановка с цельным молоком кольцевой реакции с цветным антигеном Триленко (приложение).
- Исследование снятого молока в пластинчатой реакциях агглютинации.
- Получение молочной сыворотки добавлением 2-3 капель сычужного фермента. Постановка с молочной сывороткой пластинчатой реакции агглютинации.

### **Занятие 6.**

#### **Лабораторный диагноз бруцеллеза у человека**

- Исследование посевов крови на накопительной среде Кастанеда и на скошенном агаре.
- Отбор подозрительных на рост бруцелл колоний, приготовление мазков, окрашивание по Грамму, просмотр.
- Постановка ОРА на стекле подозрительных на рост бруцелл колоний с бруцеллезной агглютинирующей сывороткой 1:25.
- Пересев 3-4 колонии, агглютинирующихся бруцеллезной сывороткой, на пробирки скошенного питательного агара, инкубирование в термостате 48 часов при 37°C.

*Примечание: при отсутствии роста на среде Кастанеда, легким покачиванием флакона смочить поверхность агара бульоном и продолжать выращивание при тех же условиях.*

#### **Лабораторный диагноз бруцеллеза крупного рогатого скота**

*Бактериологическое исследование молока*

- Просмотр посевов на средах с подавителями постороннего роста, выращиваемых в аэробных условиях и в CO<sub>2</sub>-инкубаторе.
- Постановка ОРА с колониями, подозрительными на рост бруцелл, и бруцеллезной агглютинирующей сывороткой 1:25.
- Отсев колоний, агглютинирующихся бруцеллезной сывороткой, на 4 пробирки скошенного питательного агара, инкубирование посевов при 37°C в течение 48 часов.

*Примечание: при отсутствии подозрительного роста все посева помещают при тех же условиях для подращивания.*

## **Занятие 7.**

### **Лабораторный диагноз бруцеллеза у людей**

*Идентификация культуры, выделенной из крови больного человека*

- Проверка культуры на чистоту роста и изучение морфологии микроба в мазках с окраской по Граму и люминесцентно-серологическим методом.
- Определение наличия признаков диссоциации в пробе с трипафлавином.
- Постановка ОРА с бруцеллезной агглютинирующей сывороткой 1:25.
- Постановка реакции агглютинации объемным методом с бруцеллезной агглютинирующей сывороткой до титра сыворотки, учет результата через 24 часа.
- Проведение дополнительного исследования культуры; изучение чувствительности выделенной культуры к антибиотикам: распределение на поверхности агара («Унимикон - ч» или Мюллера-Хинтона, или АГВ) 3 мл расплавленного и остуженного до

45°C полужидкого агара, содержащего 0,3 мл  $5 \cdot 10^7$  микроорганизмов в 1 мл и, после подсушивания, помещение на поверхность агара дисков с тетрациклином, стрептомицином, пенициллином, гентамицином. Учет результатов через 48 часов инкубации при 37°C.

- Пересев выделенной культуры на 2 пробирки питательного агара.

### **Лабораторный диагноз бруцеллеза у крупного рогатого скота**

*Идентификация культуры, выделенной из молока*

- Проверка культуры на чистоту роста и изучение морфологии микроба в мазках с окраской по Граму и люминесцентно-серологическим методом.
- Определение наличия признаков диссоциации в пробе с трипафлавином.
- Постановка ОРА с бруцеллезной агглютинирующей сывороткой 1:25.
- Постановка реакции агглютинации объемным методом с бруцеллезной агглютинирующей сывороткой до титра сыворотки, учет результата через 24 часа.
- Проведение дополнительного исследования культуры; изучение чувствительности выделенной культуры к антибиотикам: распределение на поверхности агара (Мюллера-Хинтона, или АГВ) 3 мл расплавленного и остуженного до 45°C полужидкого агара, содержащего 0,3 мл  $5 \cdot 10^7$  микроорганизмов в 1 мл и, после подсушивания, помещение на поверхность агара дисков с тетрациклином, стрептомицином, пенициллином, гентамицином. Учет результатов через 48 часов инкубации при 37°C.
- Пересев выделенной культуры на 2 пробирки питательного агара.

## Занятие 8.

### Лабораторный диагноз бруцеллеза у человека

Идентификация культуры, выделенной из крови больного

- Учет результатов определения чувствительности культуры к антибиотикам по зонам задержки роста вокруг дисков антибиотиков и оценочной таблице.
- Проведение дифференциации культуры, выделенной из крови больного человека по полной схеме:
  - бактериостатический метод;
  - сероводородообразование;
  - чувствительность к фагу «Тв» (приложение);
  - реакция агглютинации с моноспецифическими сыворотками. Постановка развернутой реакции агглютинации с выделенной культурой и с сыворотками антиабортус и антимиелитензис;
  - уреазная активность.

*Примечания:*

- дифференцирование 2-суточной агаровой культуры, выделенной из крови, с 48 часовыми культурами эталонных штаммов *B. abortus* 544, *B. melitensis* 164, *B. suis* 1330 первых биоваров;
- регистрация в течение дня результатов расщепления мочевины на среде Кристенсена;
- учет тестов дифференциации проводится трижды в течение 6 дней.

**Лабораторный диагноз бруцеллеза у крупного рогатого скота**

- Идентификация и дифференциация культуры, выделенной из молока.
- Проведение дифференциации культуры по полной схеме (см. выше).

## Занятие 9.

### Лабораторный диагноз бруцеллеза у человека

Дифференциация культуры, выделенной из крови человека

- Учет развернутых реакций агглютинации с моноспецифическими сыворотками антиабортус и антимиелитензис.
- Регистрация результатов пробы с фагом «Тв».
- Проведение окончательного учета уреазной активности культуры на среде Кристенсена.

*Примечания:*

- *учет тестов дифференциации в сравнении с эталонными штаммами;*
- *при слабом росте культуры в пробе с фагом «Тв» дальнейшее инкубирование посевов при 37°C еще 24 часа;*
- *обеззараживание пробирок с реакциями агглютинации и посевами на среде Кристенсена.*

### Лабораторный диагноз бруцеллеза у крупного рогатого скота

- Продолжение дифференциации культуры, выделенной из молока
- Проведение дифференциации культуры по полной схеме см. выше.

## Занятие 10.

### Лабораторный диагноз бруцеллеза у человека

Продолжение изучения культуры, выделенной из крови больного (1-я отметка тестов дифференциации):

*Бактериостатический метод* - регистрация наличия роста культуры на средах с фуксином, тионином.

*Сероводородообразование* - измерение почерневшей части индикаторной бумаги, замена полоски на новую.

### Лабораторный диагноз бруцеллеза у крупного рогатого скота



### **того скота**

Продолжение дифференциации культуры, выделенной из молока. (1-я отметка тестов дифференциации):

*Бактериостатический метод* - регистрация наличия роста культуры на средах с фуксином, тионином.

*Сероводородообразование* - измерение почерневшей части индикаторной бумаги, замена полоски на новую.

Примечание: учет результатов дифференциации в сравнении с эталонными штаммами.

## **Занятие 11.**

### **Лабораторный диагноз бруцеллеза у человека**

Продолжение изучения культуры, выделенной из крови больного (2-я отметка тестов дифференциации).

### **Лабораторный диагноз бруцеллеза у крупного рогатого скота**

Продолжение дифференциации культуры, выделенной из молока (2-я отметка тестов дифференциации).

**Биологическое исследование материала от больного человека. Исследование биопробных животных, зараженных кровью больного.**

Взятие крови у биопробных животных, получение сыворотки отстаиванием на холоду, определение титра антител в реакциях Райта и РПГА.

*Примечание: учет результатов - в сравнении с эталонными штаммами.*

## **Занятие 12.**

### **Лабораторный диагноз бруцеллеза у человека**

Окончание дифференциации культуры, выделенной из крови больного. (3-я отметка тестов дифференциации)

- *Бактериостатический метод.*
- *Сероводородообразование:* Измерение почернев-

шей части индикаторной бумаги на  $H_2S$ , суммирование результатов 3-х измерений.

### **Лабораторный диагноз бруцеллеза у крупного рогатого скота**

Окончание дифференциации культуры, выделенной из молока больного животного (3-я отметка тестов дифференциации):

- *Бактериостатический метод.*
- *Сероводородообразование:* Измерение почерневшей части индикаторной бумаги на  $H_2S$ , суммирование результатов 3-х измерений.

*Примечание: учет результатов в сравнении с эталонными штаммами; составление таблицы результатов идентификации и дифференциации выделенных культур, анализ данных, выдача заключения.*

## **Занятие 13.**

### **Биологическое исследование крови больного бруцеллезом**

- Вскрытие биопробного животного, зараженного кровью, взятие крови из сердца шприцем в пробирку, помещение пробирки на 2 часа в термостат, затем на 2 часа в холодильник, отделение сыворотки от сгустка.
- Посев лимфатических узлов (парааортального, пахового), печени, селезенки, крови на 2 пробирки с твердой питательной средой (например, эритрит агар) и крови на 2 пробирки бульона Хоттингера.

### **Биологическое исследование материала от крупного рогатого скота**

- Вскрытие биопробного животного, зараженного кровью, взятие крови из сердца шприцем в пробирку, помещение пробирки на 2 часа в термостат, затем на 2 часа в холодильник, отделение сыворотки от сгустка.

- Посев лимфатических узлов (парааортального, пахового), печени, селезенки, крови на 2 пробирки с твердой питательной средой (например, эритроцит агар) и крови на 2 пробирки бульона Хоттингера.

*Примечание: работа в лаборатории экспериментальных животных; посев органов и крови - с помощью стерильных деревянных палочек или петли; по 1 пробирке с посевами органов на плотной питательной среде и по 1 пробирке с посевами в бульоне помещается в CO<sub>2</sub>-инкубатор. Инкубирование всех посевов при температуре 37°C.*

#### **Занятие 14.**

##### **Биологическое исследование крови больного бруцеллезом**

- Продолжение исследования сыворотки биопробного животного, зараженного кровью больного.
- Исследование сыворотки, взятой накануне от больного животного, в реакции Хеддльсона, Райта и РПГА микрометодом.

##### **Биологическое исследование материала от крупного рогатого скота**

- Исследование сыворотки биопробного животного, зараженного молоком.
- Исследование сыворотки в реакции Хеддльсона, Райта и РПГА микрометодом.

##### **Лабораторный диагноз бруцеллеза у человека**

*Биологическое исследование крови больного бруцеллезом.*

- Просмотр посевов лимфатических узлов, органов, крови биопробных животных, зараженных кровью больного на плотных питательных средах. Отбор колоний, подозрительных на рост бруцелл. Приго-

- товление мазков, окрашивание по Граму, просмотр. Постановка реакции агглютинации с трипафлавином.
- Постановка ОРА с бруцеллезной агглютинирующей сывороткой в разведении 1:25.

### **Лабораторный диагноз бруцеллеза у животного**

*Биологическое исследование материала от крупного рогатого скота. Окончание исследования молока.*

- Просмотр посевов лимфатических узлов, органов, крови биопробных животных, зараженных кровью больного на плотных питательных средах. Отбор колоний, подозрительных на рост бруцелл. Приготовление мазков, окрашивание по Граму, просмотр. Постановка реакции агглютинации с трипафлавином.
- Постановка ОРА с бруцеллезной агглютинирующей сывороткой в разведении 1:25.

*Примечания:*

- выдача окончательного ответа; уничтожение всех посевов от животных;
- заполнение паспорта на выделенные из крови больного и молока животного культуры бруцелл; если из анализов крови больного человека и молока крупного рогатого скота бактериологическим методом выделить культуру бруцелл не удалось, то при наличии роста возбудителя от биопробных животных - выделение культуры, идентификация и дифференциация согласно планам занятий 7, 8, 9, 10, 11, 12.

### **Экспрессные и ускоренные методы**

Учитывая, что бруцеллы относятся к медленно растущим микроорганизмам и окончательный ответ бактериологического и биологического методов исследования можно ожидать только через 3 - 5 недель, были разработаны тесты, основанные на иммунологическом

взаимодействии специфического антигена и антител (реакция иммунофлуоресценции - прямой вариант, реакция нейтрализации антител, иммуноферментный анализ, а также молекулярно-биологический метод – ПЦР).

Положительный результат экспрессного исследования позволяет заподозрить наличие *Brucella*. Отрицательный результат не является основанием для отрицательного ответа по анализу.

Сигнальное исследование на бруцеллез всегда проводится в комплексе с развернутым классическим бактериологическим анализом. После выделения и идентификации культуры, в случае необходимости, производят дифференциацию видов бруцелл.

*Примечание: учет реакции Райта - через 24 часа; сравнение титра реакции Райта с титром предыдущего исследования.*

## **Занятие 16.**

### **Экспресс-методы (МФА и РНАт) для обнаружения возбудителя бруцеллеза**

- Приготовление из нативного материала мазка, обработка его люминесцирующей бруцеллезной сывороткой, просмотр. Выдача предварительного ответа не позднее 2 ч от начала исследования.
- Прогревание исследуемого материала в течение 10 мин при 100°C. Постановка РНАт с антигенным эритроцитарным диагностикумом. Выдача предварительного ответа через 2 часа, окончательного - через 24 часа.
- Посев исследуемого материала на 4 чашки с питательной средой на бруцеллез (например, эритрит агар). Через 24-36 час инкубирования при 37°C - приготовление мазков с чашек (смыв культуры физиологическим раствором). Обработка люми-

несцирующей сывороткой, просмотр. Постановка РНАт со смывом, после его обеззараживания.

- Введение нативного материала в объеме 0,5 мл двум белым мышам в/бр. Хлороформирование животных через 24-40 ч, вскрытие, приготовление мазков-отпечатков из органов, обработка люминесцирующей сывороткой, просмотр. Одновременно, приготовление взвеси из органов на физиологическом растворе. После обеззараживания взвеси постановка РНАт. Через 2 часа выдача предварительного ответа, окончательного - через 24 часа. При наличии четких положительных результатов выдача положительного ответа о наличии возбудителя бруцеллеза.

### 11.3. Приложение

#### **Методы определения признаков диссоциации бруцелл Проба с раствором трипафлавина**

На предметное стекло наносят каплю раствора трипафлавина 1:500 на физиологическом растворе, в которой эмульгируют испытуемую культуру. У диссоциированных культур быстро, в течение 1-2 мин наступает агглютинация с образованием хорошо выраженных хлопьев. Взвесь культуры в S-форме остается гомогенной.

#### **Реакция термоагглютинации (термопреципитации)**

Смыв двухсуточной культуры бруцелл в физиологическом растворе, густотой не менее чем  $2 \times 10^9$  м.к. прогревают на водяной бане при  $90^\circ\text{C}$  в течение 45 мин. Результат учитывают тотчас, после прогревания и окончательный через 24 часа - при комнатной температуре. В эти сроки наступает, при наличии диссоциации, ясно выраженная агглютинация клеток бруцелл,

тогда как суспензия бруцелл недиссоциированных (S) штаммов остается гомогенной.

### **Витальная окраска диссоциированных форм бруцелл**

Уайт и Вильсон применили этот метод для дифференциации S- и R-форм колоний бруцелл. Метод окраски колоний кристаллическим фиолетовым основан на том, что колонии, находящиеся на разных стадиях диссоциации, окрашиваются по-разному. С этой целью Альбими агар разливают в чашки Петри и подсушивают в течение суток, испытываемую культуру засевают, выращивают в термостате при 37°C. Через четверо суток, когда сформируются колонии, на поверхность агара наливают водный раствор кристаллического фиолетового 1:2000. Спустя 3-5 мин краску сливают в дезинфицирующий раствор. Колонии культур просматривают с помощью лупы или стереоскопического микроскопа.

Колонии, находящиеся в S-форме, имеют светло-желтый или светло-зеленый цвет, а колонии шероховатые в R-форме - темно-фиолетовый или светло-синий.

### **Дифференциация видов и биоваров бруцелл**

**Отношение первых генераций бруцелл к углекислому газу.**

Первые генерации овечьих, свиных штаммов хорошо растут в обычных аэробных условиях. Отдельные биовары *B. abortus*, *B. ovis* для своего первичного роста из патологического материала требуют повышенного (5-10%) содержания углекислого газа. Этот метод может быть использован для дифференциации *B. abortus* и *B. ovis* от других видов бруцелл и справедлив только в отношении первых генераций *B. abortus*, так как с последующим пересевом это свойство коровьих культур утрачивается.

### **Бактериостатический метод**

Питательный агар Альбими с фуксином 1:50000 и тионином 1:50000 разливают в чашки Петри, подсушивают. Перед посевом культур каждую чашку Петри делят на сектора по количеству изучаемых культур и эталонных штаммов. Посевы эталонных штаммов трех видов первого биовара бруцелл и испытуемых культур производят стандартной петлей (диаметр 2 мм) из взвеси 2-суточной агаровой культуры на физиологическом растворе по стандарту мутности 10 МЕ. Одну петлю взвеси засевают штрихом или «бляшками» на сектора агар. Учет полученных результатов производят по наличию или отсутствию роста бруцелл через каждые 48 час инкубации в термостате при 37°C в течение 6 суток.

Для приготовления сред с красками питательный агар Альбими расплавляют, охлаждают до 45-50°C и к нему стерильно добавляют основной раствор стандартной краски. Приготовление красок: 0,1 г краски растворяют при растирании в ступке в 20 мл 96° этилового спирта, затем постепенно добавляют 80 мл дистиллированной воды. Основные растворы (1:1000) красок могут храниться в темном месте в баночке с притертой пробкой до 6-10 месяцев.

Для получения в среде концентрации краски 1:50000 к 100 мл среды добавляют 2 мл основного раствора краски.

При дифференциации видов бруцелл и их биотипов применяют тионин в концентрации 1:50 000 и фуксин - 1:50000 (20 mg/ml).

Краски подтитровывают по эталонным штаммам бруцелл (*B. melitensis* 16M, *B. abortus* 544, *B. suis* 1330).

Для этого испытуемую краску добавляют в различных количествах: тионин в концентрации от 1:15000 до 1:100000, фуксин от 1:20000 до 1:100000. Концен-



трация красок в среде, с которыми получается четкая дифференциация эталонных штаммов бруцелл и является рабочей дозой. Среды с красками можно хранить в холодильнике 10-15 дней: для того, чтобы среды не высохли, их помещают в целлофановые мешки. Обесцвеченные среды применять нельзя.

### **Изучение сероводородообразования**

На скошенную поверхность сывороточно-декстрозного агара (рН 6,8-7,2) засевают одну стандартную петлю 2 млрд./мл взвеси испытуемой культуры. Взвесь готовят на физиологическом растворе по оптическому стандарту мутности 10 МЕ из двухсуточной агаровой культуры.

Реактивом на сероводород служат полоски фильтровальной бумаги (1x8 см), пропитанные насыщенным водным раствором углекислого свинца. Полоски подсушивают на воздухе и хранят в банке из темного стекла с притертой пробкой. После засева культуры индикаторную бумагу укрепляют между пробкой и стенкой пробирки так, чтобы конец ее находился на уровне верхнего края среды, но не касался ее.

Для предотвращения скопления в пробирке углекислого газа, задерживающего образование сероводорода, в пробку вставляют П-образный патрубок. Пробирки с посевом ставят в термостат при 37°C.

Показателем образования сероводорода является почернение нижнего края индикаторной полоски. Интенсивность сероводородообразования определяют измерением (в мм) потемневшей части. Результаты учитывают через каждые двое суток в течение 6-и дней. При каждом учете потемневшую бумагу заменяют новой. Для окончательной оценки результатов показатели трех измерений суммируют.

Для *B. suis* (биовар 1) суммарный показатель образо-

вания сероводорода составляет примерно от 19-20 мм, для *B. abortus* (биовар 1) - около 5-7 мм. Штаммы *B. melitensis* (биовар 1), как правило, не выделяют сероводород или же вызывают легкое побурение края свинцовой бумажки. У штаммов *B. neotomae* показатель в среднем равен 5-8 мм. Культуры *B. ovis* и *B. canis* сероводорода не образуют.

### **Проба с фагом «Тб»**

На подсушенный 1,5% агар Мартена или агар Альбими в чашке Петри наносят 0,1 мл суспензии бруцелл в физиологическом растворе, приготовленной из 48-часовой агаровой культуры и содержащей 10 МЕ микробов в мл, и распределяют шпателем по поверхности. На подсушенный бактериальный газон наносят бактериофаг, на одну чашку минимальную дозу РТД, на вторую максимальную -  $10^4$  X РТД. Легким наклоном чашки капле бактериофага дают стечь в виде «дорожки». После подсыхания, чашки переворачивают. Результаты учитывают через 24 ч *B. abortus* лизируется фагом «Тб» в дозе РТД и  $10^4$  X РТД, *B. melitensis* не лизируется ни одной из этих доз. *B. suis* может частично лизироваться фагом в концентрации  $10^4$  X РТД.

### **Серологический диагноз бруцеллеза**

#### **Реакция Хеддльсона (пластинчатый метод)**

Преимущество этого метода заключается в простоте постановки реакции, быстром получении результатов и чувствительности реакции. В качестве антигена для постановки реакции Хеддльсона и Райта применяют единый бруцеллезный диагностикум. Реакцию ставят на обычном оконном, тщательно вымытом, обезжиренном стекле, расчерченном на квадраты величиной 4 x 4 см каждый, по горизонтали должно быть 5 квадратов. На первом квадрате с левой стороны записы-

вается номер испытуемой сыворотки, в последующие квадраты слева направо разливают (микропипеткой или 1 мл градуированной пипеткой) испытуемую сыворотку в следующих дозах: 0,04, 0,02, 0,01 и 0,03 (контроль сыворотки). К первым трем дозам сыворотки добавляют по 0,03 мл антигена. К последней дозе сыворотки (0,03) добавляют 0,03 мл физиологического раствора. Сыворотку осторожно смешивают с антигеном палочкой, начиная с минимальной дозы сыворотки. Контроль антигена ставят, добавляя 0,03 мл физиологического раствора к 0,03 мл антигена. Затем стекло слегка подогревают над пламенем спиртовки так, чтобы происходило равномерное нагревание всей поверхности стекла.

В случае положительной реакции в первые же минуты в каплях сыворотки с антигеном появляются хлопья (агглютинат). Максимальный срок наблюдения 8 минут. Контроль сыворотки ставят с каждой испытуемой сывороткой для исключения спонтанной агглютинации; контроль антигена ставят один (при любом числе испытуемых сывороток) для исключения спонтанной агглютинации применяемого антигена. Учет реакции проводят невооруженным глазом по следующей схеме: а) полное просветление жидкости с крупными и мелкими хлопьями, т.е. 100% агглютинации (4+); б) почти полное просветление жидкости с ясно заметными хлопьями, т.е. 75% агглютинации (3+); в) незначительное просветление жидкости с заметными хлопьями, т.е. 50% агглютинации (2+); г) мутная жидкость с едва заметной зернистостью (+); д) равномерная мутная жидкость (-).

Для оценки результатов рекомендуется следующая схема: а) агглютинация на 4+ во всех дозах сыворотки - результат “резко положительный”; б) агглютинация

не менее 2+ во всех дозах сыворотки - результат “положительный”; в) агглютинация только в первой или в первой и второй дозах сыворотки - результат “сомнительный”; г) отсутствие агглютинации во всех дозах сыворотки - реакция “отрицательная”.

Для диагностики бруцеллеза имеет значение только положительный результат реакции. При сомнительном или отрицательном результатах реакции и наличии эпидемических и эпизоотических показаний, а также в стационаре и при обследовании доноров, где необходимо определение титра агглютининов и их динамики, следует применять реакции Райта и Кумбса, РПГА и ИФА.

### **Роз-Бенгал проба (РБП)**

Роз-Бенгал проба, по сравнению с другими методами серологической диагностики бруцеллеза, обладает следующими преимуществами: большой чувствительностью, способностью в короткие сроки после заражения выявлять специфические бруцеллезные антитела и, благодаря кислой реакции антигена, ингибировать проявления неспецифических антител, а также стабильностью показаний, технической простотой постановки, требующей небольшой затраты труда и времени, четкостью и быстротой получаемых результатов.

Сыворотки крови, подлежащие исследованию, должны быть прозрачные, без примеси эритроцитов. Их исследуют не позднее, чем через 4 дня хранения при температуре плюс 4-8°C.

Допускается исследовать сыворотки, консервированные сухой борной кислотой (2% борной кислоты к объему сыворотки). Консервированные сыворотки пригодны для исследования в течение 14 дней.

Антиген представляет собой суспензию инактивированных нагреванием и фенолом бруцелл в буферном растворе, окрашенных бенгальским розовым в розо-

вый цвет. Расфасован во флаконы из темного стекла, подлежит хранению в темном сухом месте при температуре плюс 4-12°C. Срок годности антигена при соблюдении условий хранения 18 месяцев со дня его изготовления.

Антиген во флаконах без этикетки (надписи) или с трещинами, содержащий постороннюю примесь, неразвивающиеся хлопья, плесень, с истекшим сроком годности или подвергавшиеся замораживанию, для применения не годен.

Перед употреблением антиген выдерживают 30-40 мин. при комнатной температуре и затем тщательно встряхивают.

Техника постановки Роз-Бенгал пробы: реакцию проводят на чистых сухих металлических эмалированных пластинках или изразцовых плитках с лунками при комнатной температуре (плюс 18-30°C).

Исследуемые сыворотки крови в дозе 0,03 мл вносят на дно лунки шприцем-полуавтоматом или микропипеткой, которые трижды промывают фенолизированным (карболизированным) физиологическим раствором и подсушивают фильтровальной бумагой.

В каждую лунку рядом с сывороткой пипеткой-капельницей вносят равное количество (0,03 мл антигена) и тщательно смешивают активным движением ручного полисмесителя на 5 или 25 проб для получения однородной смеси, распределяя ее при этом по всей поверхности лунки.

Пластину с внесенными на нее сыворотками и антигеном покачивают в течение 4 мин осторожными вращательными движениями вручную или при помощи автоматического прибора, предназначенного для этой цели. При положительной реакции появляются хлопья агглютината розового цвета.

В начале работы ставят контроль антигена с нормальной (отрицательной) и положительной агглютинирующей сыворотками в тех же дозах, а также контроль антигена на спонтанную агглютинацию (к 0,03 мл антигена добавляют 0,03 мл физиологического раствора).

Учет реакции проводят невооруженным глазом в течение 4 мин. после смешивания сыворотки с антигеном при слегка наклонном положении пластинки.

Агглютинацию, которая наступает позже, чем через 4 мин - не учитывают.

Реакцию считают положительной при наличии выраженной агглютинации в виде мелких или крупных хлопьев розового цвета.

При отсутствии агглютинации (смесь гомогенна, равномерно окрашена) реакцию считают отрицательной.

После учета реакции пластинки дезинфицируют погружением на 5 мин в 3% раствор фенола или 1%-ный раствор хлорамина, затем тщательно промывают водопроводной водой, высушивают и используют повторно. Для этих целей можно применять кассеты и штативы сушилки.

При нечетко выраженной агглютинации проводят повторное исследование.

По результатам повторного исследования дают окончательную оценку реакции (положительная или отрицательная).

Сыворотки, с которыми получена положительная РБП, исследуют в РА и РСК (РДСК) для установления титра агглютининов и наличия комплементсвязывающих антител. Сыворотки, с которыми получена отрицательная РБП, дополнительно в РА и РСК (РДСК) не исследуют.

### **Кольцевая реакция с молоком**

Кольцевая реакция применяется с целью ориентиро-

вочной проверки благополучных по бруцеллезу молочных стад и для проверки молока на рынках.

Сущность кольцевой реакции заключается в том, что в молоке бруцеллезных животных при добавлении антигена образуется комплекс антитела с антигеном, который адсорбируется жировыми частицами молока. Жировые частицы вследствие своего малого удельного веса поднимаются вверх, увлекая адсорбированный агглютинат, который в зависимости от цвета антигена образует на поверхности жидкости окрашенное кольцо.

Для кольцевой реакции применяют цветной антиген Триленко, представляющий взвесь убитых, окрашенных бруцеллезных микробов.

Для исследования необходимо брать цельное, лучше свежее, молоко или консервированное формалином (из расчета 0,1 мл 10% раствора формалина на 10 мл молока).

В пробирку берут 2 мл молока и добавляют 0,1 мл (2 капли) концентрированного антигена, тщательно встряхивают и помещают в водяную баню или термостат на 45-50 мин при температуре 37-39°C.

Учет реакции: а) если в верхней части столбика молока (в слое сливок) четко выражено синее кольцо, а остальная часть молока белая, реакция оценивается положительной - 100 или 75% агглютинации (+ + + + и + + +); б) при наличии достаточно выраженного синего кольца в слое сливок, а остальная часть молока синеватого цвета, реакция оценивается положительной - 50% агглютинации (+ +); в) если синее кольцо в слое сливок слабо выражено и весь столбик молока имеет синий цвет, реакция считается сомнительной - 25% агглютинации (+ и ±); г) если столбик молока равномерно окрашен в синий цвет, а слой сливок остается белым или слегка желтоватым, реакция отрицательная (-).

Молоко от коров с сомнительной реакцией исследуют повторно через 10-15 суток. При получении отрицательного или снова сомнительного результата животных считают благополучными по бруцеллезу.

Пластинчатая реакция агглютинации (исследование молока)

Данная реакция применяется для исследования только свежего молока и молочной сыворотки. Не подлежит исследованию пастеризованное, кипяченое и замороженное молоко (в таком молоке антибруцеллезные агглютинины разрушаются), а также молоко, имеющее кислотность выше 30°С по Тернеру (во избежание получения неспецифических результатов).

Реакцией агглютинации можно исследовать молоко жирное (цельное), обезжиренное (снятое) и молозиво. Жирное молоко предварительно обезжиривают отстаиванием или центрифугированием, затем из-под слоя сливок забирают молоко для исследования. Обезжиренное молоко и молозиво исследуют без предварительной подготовки, но так, чтобы сливок попало минимальное количество.

Обезжиренное молоко наносят на стекло (чашку Петри) в количестве 0,1 мл (или двух капель) и 0,05 мл (или одной капли). К каждой дозе испытуемого молока добавляют по одной капле бруцеллезного диагностикума. Реакция сопровождается двумя контролями: к 0,05 мл диагностикума добавляют 0,1 мл физиологического раствора и 0,1 мл испытуемого молока смешивают с 0,05 мл 12% раствора хлористого натрия. Путем покачивания стекла смешивают ингредиенты. Учет реакции производят в первые 3-5 мин.

Положительная реакция агглютинации характеризуется выпадением хлопьев с большим или меньшим обесцвечиванием молока. При отрицательном резуль-



тате молоко остается равномерно окрашенным в голубой цвет (цвет антигена).

#### *Исследование молочной сыворотки*

Перед получением молочной сыворотки жирное молоко обезжиривают путем центрифугирования или отстаивания. Молочную сыворотку получают при створаживании молока сычужным ферментом. Для этого к 5 мл молока добавляют 1-2 капли 10% сычужного фермента на физиологическом растворе хлористого натрия. Пробирки помещают при температуре 37°C на 20-30 мин (до свертывания молока). Молочную сыворотку можно получить также путем помещения молока при 37°C на сутки. Молочную сыворотку сразу отделяют путем фильтрования через бумажный фильтр. Дальнейшие манипуляции: постановка реакции и учет результатов аналогично постановке и учету реакции агглютинации с цельным молоком.

При оценке результатов исследования молока на бруцеллез при помощи пластинчатой реакции агглютинации необходимо учесть возможность образования мелкохлопчатого агглютината, который из-за мутности молока может быть не отмечен и результаты реакции могут быть приняты за отрицательные. В отрицательных реакциях рекомендуется молоко исследовать в реакции агглютинации с молочной сывороткой.

#### **ПЦР, направленная на выявление ДНК *Brucella spp.***

ГенБру тест-система предназначена для выявления *Brucella spp.* в клиническом материале, органах животных и объектах внешней среды.

Для детекции *Brucella spp.* подобрана система, состоящая из двух пар праймеров. Праймеры Bru31 и Bru32 обеспечивают специфическую амплификацию фрагмента ДНК размером 299 п.н., праймеры Bru3 и Bru4

- специфическую амплификацию фрагмента ДНК размером 175 п.н. Тест-система выявляет в ПЦР  $1 \times 10^3$  м.к./мл *Bruceella spp.*

В состав тест-системы входят следующие компоненты:

1-2. Праймеры *Bru31* и *Bru32* - водные растворы двух олигонуклеотидных праймеров, синтезированных в автоматическом ген-синтезаторе ДНК.

3-4. Праймеры *Bru3* и *Bru4* - водные растворы двух олигонуклеотидных праймеров, синтезированных в автоматическом ген-синтезаторе ДНК.

5. Таq-полимераза - термостабильная ДНК-полимераза в буферном растворе, рекомбинантная.

6. дНТФ - водный раствор дезоксирибонуклеозидтрифосфатов.

7. ДНК (положительный контроль) - водный раствор ДНК *B. abortus* 19 ВА.

8. 10хБ - 10-кратный буферный раствор.

9.  $MgCl_2$  - 1% раствор магния хлорида.

10.  $H_2O$  - вода бидистиллированная.

11. Масло - масло вазелиновое стерильное.

Объектом для исследования может быть клинический материал, объекты внешней среды, органы животных, а также микробные взвеси при идентификации выделенных культур. При работе с клиническим материалом и загрязненными объектами внешней среды необходим предварительный этап подготовки проб (выделение ДНК). Подготовку проб осуществляют с помощью поставляемого отдельно набора и прилагаемой к нему инструкции.

*Подготовка проб из клинического материала и объектов внешней среды*

При анализе крови к образцу объемом 1 мл после забора добавляют 1/10 объема 4% раствора цитрата натрия и осторожно перемешивают.

Молоко в количестве 10 мл центрифугируют при 8 000 g в течение 10 мин. Надосадочную жидкость удаляют. Осадок суспендируют в 1 мл 0,9% раствора хлорида натрия

Смывы с поверхностей берут с помощью стерильного ватного тампона во флакон с 50 мл 0,9% раствора хлорида натрия.

Кусочки органов в количестве 1 г растирают в ступке с 0,5-1,0 г стеклянного порошка, добавляют 1-2 мл 0,9% раствора хлорида натрия. Надосадочную жидкость отбирают через ватный тампон в отдельные пробирки.

Почву в количестве 10 г тщательно перемешивают с 50 мл 0,9% раствора хлорида натрия, отстаивают в течение 10 мин для оседания крупных частиц. Надосадочную жидкость центрифугируют при 8 000 g в течение 10 мин. Осадок ресуспендируют в 1 мл 0,9% раствора хлорида натрия.

Обеззараживание проводят прогреванием проб, в которые добавлен мертиолят натрия до конечной концентрации 0,01%, при температуре 56°С в течение 30 мин.

Выделение ДНК из объектов внешней среды осуществляют с помощью набора для выделения ДНК в соответствии с прилагаемой к нему инструкцией. Выделенную ДНК в объеме 10 мкл используют в ПЦР.

Для исследования чистых культур микроорганизмов готовят бактериальную взвесь клеток, выросших на плотной питательной среде, в 2 мл 0,9% раствора хлорида натрия по стандартному образцу мутности 10 единиц ФГБУ ГИСК им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора (ОСО 42-28-8511), что эквивалентно  $1,0 \times 10^9$  м.к. возбудителя бруцеллеза в 1 мл. Затем взвесь разводят 0,9% раствором хлорида натрия до концентрации  $1 \times 10$  м.к./мл и обеззараживают добавлением мертиолята натрия до конечной концентрации 1:10000

(0,01%) и прогреванием при 56 °С в течение 30 мин. После этого 1 мл обеззараженной взвеси переносят в микропробирку типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл и центрифугируют при 8000 g в течение 15 мин. Осадок ресуспендируют в 50 мкл стерильной бидистиллированной воды, прогревают на кипящей водяной бане в течение 10 мин и центрифугируют при 8000 g в течение 1-2 мин. Супернатант в объеме 10 мкл используют для ПЦР.

Реактивы для проведения ПЦР извлекают из холодильника и полностью размораживают при комнатной температуре. Для проведения амплификации ДНК готовят микропробирки объемом 0,6 мл в соответствии с количеством образцов. Все реакционные компоненты добавляют отдельными наконечниками с помощью дозаторов переменного объема: 0,5-10, 5-40 и 40-200 мкл. В отдельной микропробирке объемом 0,6 мл готовят смесь компонентов из расчета на одну пробу в следующей последовательности: H<sub>2</sub>O - 6,8 мкл; 10xБ - 2,5 мкл; дНТФ - 2,5 мкл; MgCl<sub>2</sub> - 1 мкл, праймер Bgu31 - 1 мкл, праймер Bgu32 - 1 мкл; Taq-полимеразы - 0,2 мкл.

Смесь перемешивают пипетированием и вносят по 15 мкл в заранее маркированные микропробирки. Затем наслаивают по 30 мкл масла и вносят: 10 мкл бидистиллированной воды (в отрицательный контроль), 10 мкл ДНК (положительный контроль), а в остальные - по 10 мкл проб.

Общий (конечный) объем во всех пробирках должен составлять 25 мкл. Микропробирки помещают в амплификатор и проводят полимеразную цепную реакцию по следующей матричной схеме: предварительная денатурация ДНК при (94±0,1)°С в течение 3 мин. Затем проводят 25 циклов. Каждый цикл амплификации включает в себя: денатурацию ДНК при температуре

(94±0,1)°С в течение 40 сек, отжиг праймеров при температуре (60±0,1)°С в течение 40 сек, синтез комплементарной цепи при температуре (72±0,1)°С в течение 40 сек. После последнего цикла пробы прогревают в течение 3 мин при температуре (72±0,1)°С. При необходимости оставить пробы после реакции на ночь, их помещают в холодильник при температуре (4±0,1)°С или вводят дополнительный цикл на амплификаторе (4±0,1)°С 12 ч и более.

После первого этапа амплификации для повышения чувствительности и специфичности реакции проводят вторую стадию. Для этого готовят реакционную смесь из расчета на одну пробу: Н<sub>2</sub>О - 15,8 мкл, 10хБ - 2,5 мкл, дНТФ - 2,5 мкл, MgCl<sub>2</sub>, праймеров Вгу3 и Вгу4 - по 1 мкл каждого и фермента Таq-полимеразы - 0,2 мкл. При постановке второго этапа ПЦР реакционную смесь разливают по 24 мкл в каждую пробирку, наслаивают на нее по капле вазелинового масла и вносят под масло по 1 мкл амплификата, полученного после первого этапа реакции.

Термоциклирование проводят по следующей схеме: 25 циклов включающих в себя денатурацию при 94°С - 30 сек, отжиг праймеров при 60°С - 30 сек и синтез при 72°С - 30 сек. Заключительный цикл 72°С - 3 минуты.

К продуктам амплификации (после второго этапа), находящимся в микропробирках после термоциклирования, с помощью микропипетки добавляют по 4 мкл буферного раствора для нанесения проб, перемешивают пипетированием и по 15 мкл переносят в лунки геля. Затем закрывают крышку аппарата, подсоединяют блок питания, включают его и проводят электрофорез. Электрофорез проводят в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора в течение 30 - 40 мин. при градиенте напряжения 10 В/см до про-

хождения лидирующего красителя 2/3 длины трека.

*Оценка результатов:*

По окончании электрофореза агарозный гель извлекают из камеры и помещают на 10 мин в ванночку с раствором бромистого этидия в концентрации 0,5 мкг/мл для окрашивания ПЦР-продуктов. Результат проведения ПЦР регистрируют и документируют в проходящем ультрафиолете с использованием документирующей видеосистемы или зеркального фотоаппарата с пленкой типа “Микрат” 300. Результаты оценивают по наличию фрагментов ДНК, полосы которых располагаются на том же уровне в геле, что и полосы в положительном контроле с препаратом ДНК. Фрагмент ДНК *Brucella spp.* после второго этапа ПЦР имеет размер 175 н.п.

Отрицательный контроль: полоса на уровне положительного контроля должна отсутствовать; наличие полосы свидетельствует о контаминации компонентов тест-системы.

Наличие полос, располагающихся выше или ниже контрольной, является неспецифичным ответом и во внимание не принимается.

### **Список использованной литературы:**

1. Адамов А.К., Наумшина М.С. Холерные вибрионы /Саратов: изд-во ун-та, 1984. – 328 с.
2. Антракс (вопросы иммунологии, клиники и лабораторной диагностики) / под ред. Э.Н. Шляхова. – Кишинев: Изд-во «Картя Молдовеняскэ», 1964. – 164 с.
3. Апарин Г.П., Голубинский Е.П. Микробиология чумы (руководство) // Иркутск, Изд-во иркут. ун-та, 1989. - 92 с.
4. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии // Под ред. А.А. Воробьева, А.С. Быкова - М.: МИА, 2003. – 233 с.
5. Балахонов С.В. Использование полимеразной цепной реакции в лабораторной диагностике инфекционных заболеваний // Журн. инфекционной патол. – Т. 3, № 2. – Иркутск, 1996. – С. 8–11.
6. Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности): Санитарно-эпидемиологические правила: СП 1.3.1285-03//Бюллетень нормативных и методических документов Госсанэпиднадзора - Москва, 2003, - Вып.3 (13).– С. 67-132.
7. Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней: Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.2322-08 и дополнения к ним СП 1.3.2518-09. – М., 2009.
8. Белозеров Е.С. Бруцеллез. Медицина, 1985 г.— 183 с.
9. Борисов Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология / Л.Б. Борисов. – М.: Медицинское информационное агентство, 2002. – 734 с.
10. Бруцеллез / Под ред. П. А. Вершиловой — М., 1972 г.— 439 с.
11. Бургасов П.Н., Рожков Г.И. Сибирязвенная инфекция. – М.: Медицина, 1984. – 212 с.
12. Галактионов В.Г. Иммунология: Учебник. – М.: «РИЦ МДК», 2005.

13. ГОСТ 12.4, 064-84 «Костюмы изолирующие. Общие технические требования и методы испытания».
14. Дроздов С.Г., Гарин Н.С., Джинджоян Л.С., Тарасенко В.М. Основы техники безопасности в микробиологических и вирусологических лабораториях. – М.: Изд-во Медицина, 1987. – 256 с.
15. Забор, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики: метод. рекомендации. – М.: ООО Интерлабсервис, 2005. – 16 с.
16. Иммунология. Методы исследования // Под ред. И. Лефковитса, Б. Пернуса. - Москва, Мир, 1983. – 339 с.
17. Иванова С.М. Возбудитель сибирской язвы // Возбудители зоонозных инфекций. Частная медицинская микробиология с техникой микробиологических исследований / под ред. А.С. Лабинской, Л.П. Блинковой, А.С. Ещиной. – М.: Медицина, 2005. – С. 211–223.
18. Иммунология в 3-х томах // под ред. У. Пола. – Москва Мир, 1987.
19. Инструкция и методические указания по лабораторной, клинической диагностике, профилактике и лечению сибирской язвы у людей. – М.: Минздрав СССР, Главное управление карантинных инфекций, 1980. – 63 с.
20. Использование ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздуха в помещениях. Руководство. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2005. – 46 с.
21. Кирдей Е.Г. Иммунология. Иркутск, 2000. – Изд. ИГМУ. – 231 с.
22. Кетти Д. Антитела. Методы. – М.: Мир, 1991.- 300 с.
23. Коллинз Ц.П. Новые методы иммуноанализа. – М.: Мир, 1991. – 485 с.
24. Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза:



- Методические указания: МУ 3.3.2.2124-06. - М., 2007. - 35 с.
25. Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология. – Санкт-Петербург: Специальная литература, 2002.-591с.
  26. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство под ред. академика РАМН, профессора Г.Г. Онищенко, чл.-корр. РАМН, профессора В.В. Кутырева // М.: Медицина, 2009. - 472 с.
  27. Лабораторная диагностика холеры: МУК 4.2.2218-07.
  28. Лимфоциты. Методы // Под ред. Дж. Клауса. – Москва, Мир, 1990. -395 с.
  29. Медицинская микробиология / Главные редакторы В.И. Покровский, О.К. Поздеев. – М.: ГЭОТАР Медицина, 1998. – 1183 с.
  30. Медицинская микробиология / Под ред. А.М. Королюка, В.Б. Сбойчакова. – СПб., 1999. – 267 с.
  31. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология / Под ред. А.И. Коротяева. – СПб.: «Специальная литература». – 1998. – 580 с.
  32. Методические рекомендации по детекции детерминант вирулентности холерного вибриона с использованием мультиплексной ПЦР /Балахонов С.В., Миронова Л.В., Погорелов В.И., Урбанович Л.Я. – Иркутск, 2002. – 11 с.
  33. Методические указания МУ 3.1.2007-05. 3.1. Профилактика инфекционных болезней. Эпидемиологический надзор за туляремией. – М., 2005. – 34 с.
  34. Методические указания по профилактике и лабораторной диагностике бруцеллеза людей. Москва, 1980 г. - 54 с.
  35. Методические указания по микробиологической диагностике заболеваний, вызванных энтеробактериями / М.: МЗ СССР, 1984. – 36 с.
  36. Методические указания по применению бактерицидных ламп для обеззараживания воздуха и поверхностей в по-

- мещениях МУ 11-16 / 03-06 от 28.02.95. – М.: Минздрав-Медпром России, 1995.
37. Методы выделения и идентификации энтерогеморрагической кишечной палочки *E. coli* O157:H7: Методические указания. МУК 4.2.992-00 / Минздрав России – М., 2001. – 29 с.
  38. Механизмы и диапазон изменчивости холерных вибрионов / Под ред. В.Н. Милютин. – Ростов-на-Дону, 1981. – 175 с.
  39. Микробиологическая диагностика сибирской язвы / Л.И. Маринин [и др.]. – М. : ВУНМЦ МЗ РФ, 1999. – 222 с.
  40. Никитин В.М. Справочник методов иммунологии // Кишечев, «Штиинца», 1982. -303 с.
  41. Обеззараживание исследуемого материала, инфицированного бактериями I-IV групп патогенности при работе методом ПЦР: Методические указания. МУ 3.5.5.1034-01 / М.: Минздрав России, 2001.
  42. Олсуфьев Н.Г. Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии. М., 1975. – 194 с.
  43. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания МУК 4.2.1890-04. – М., 2004. – 92 с.
  44. Определитель бактерий Берджи / Девятое издание. I том. Перевод с английского под ред. Г.А. Заварзина. – М.: «Мир». – 1997. – 180-294 с.
  45. Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами I-II групп патогенности: МУ 1.3.1794-03. – Федеральный центр ГСЭН Минздрава России. – М., 2003.
  46. Организация и проведение эпидемиологического надзора в природных очагах чумы на территории Российской Федерации: Методические указания: МУ 3.1.1098-02. – М., 2009. – 103 с.
  47. Особенности методических приемов при работе с возбу-

- дителями инфекционных болезней человека I и II группы патогенности бактериальной этиологии: Руководство / Сост. В.С. Уралева, М.М. Гулида, С.А. Лебедева и др. – Ростов-н/Д, 1989. – 208 с.
48. Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений : СанПиН 2.1.7.728-99. – М.: Минздрав России. – 1999.
  49. Поздеев О.К. Медицинская микробиология под ред. В.И.Покровского // - 4-е изд., испр. – М., ГЭОТАР-Медиа, 2008. -768 с.
  50. Поздеев О.К. Энтеробактерии: руководство для врачей // М., ГЭОТАР-Медиа, 2007. - 720 с.
  51. Порядок организации и проведения лабораторной диагностики холеры для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней: МУК 4.2.2870-11.
  52. Порядок выдачи санитарно - эпидемиологического заключения о возможности проведения работ с возбудителями инфекционных заболеваний человека I-IV групп патогенности (опасности), генно-инженерно-модифицированными микроорганизмами, ядами биологического происхождения и гельминтами: Санитарные правила. СП 1.2.1318-03. – М.: Минздрав России, 2003.
  53. Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности: СП 1.2.036-95.
  54. Практикум по иммунологии /Под ред. И.А Кондратьева и А.А. Ярилин. Москва: ЕСАДЕМА, 2004. – 272 с.
  55. Практикум по микробиологии // Под ред. Нетрусова. – Москва, 2005 . – 603 с.
  56. Профилактика и лабораторная диагностика бруцеллеза людей: Методические указания: МУ 3.1.7.1189-03. – М., 2003.-47с.
  57. Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации: СП 3.1.1.2521-09.

58. Профилактика холеры. Организационные мероприятия. Оценка противоэпидемической готовности медицинских учреждений к проведению мероприятий на случай возникновения очага холеры: МУ 3.1.1.2232-07.
59. Руководство по медицинской микробиологии. В 2-х томах под ред. А.С. Лабинской, Е.Г. Володиной // М., Изд-во БИНОМ, 2008. (2010).
60. Руководство по профилактике чумы под ред. проф. А.В. Наумова, проф. Л.В. Самойловой. – Саратов, 1992. – 278 с.
61. Сибирская язва / Н.П. Буравцева [и др.] // Лабораторная диагностика возбудителей опасных инфекционных болезней. – Саратов, 1998. – Т. 7. – С. 50–89.
62. Тучков И.В. Конструирование и внедрение в практику генодиагностической тест-системы для выявления ДНК возбудителя сибирской язвы // Автореф. дис. ... канд. мед. наук : 03.00.07, 03.00.15 / Рос. противочум. ин-т «Микроб». – Саратов, 2005. – 19 с.
63. Частная медицинская микробиология с техникой микробиологических исследований под ред. А.С. Лабинской, Л.П. Блинковой, А.С. Ещиной. – М., Медицина, 2005. – 600 с.
64. Чернышева М. И. и др. Использование кислого антигена роз-бенгал в пластинчатой реакции агглютинации при бруцеллезе у людей // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии — 1980 — № 6 — С. 84—88.
65. Энтеробактерии / Руководство для врачей под ред. В.И. Покровского. – М.: «Медицина», 1985. – 319 с.
66. Яковлев А.Т., Зыкин Л.Ф., Рыбкин В.С. Иммуноферментный анализ в микробиологии. – Изд. Саратовского университета. – 1990. – 92 с.