

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ**  
**Харківський національний медичний університет**

**СПЕЦІАЛЬНА МІКРОБІОЛОГІЯ.  
ПАТОГЕННІ СПІРОХЕТИ.  
ПАТОГЕННІ ГРИБИ. РИКЕТСІЇ. ХЛАМІДІЇ.  
МІКОПЛАЗМИ. ВІРУСИ**

**Частина 1**  
**Патогенні спірохети**

*Методичні вказівки  
з дисципліни «Мікробіологія, вірусологія та імунологія  
з мікробіологічною діагностикою»  
для студентів-бакалаврів III–IV курсу  
за спеціальністю «Лабораторна діагностика»*

Затверджено вченою радою ХНМУ.  
Протокол № 4 від 16.04.2015.

**Харків**  
**ХНМУ**  
**2015**

Спеціальна мікробіологія. Патогенні спірохети. Патогенні гриби. Рикетсії. Хламідії. Мікоплазми. Віруси. Ч. 1. Патогенні спірохети : метод. вказ. з дисципліни «Мікробіологія, вірусологія та імунологія з мікробіологічною діагностикою» для студентів-бакалаврів III–IV курсу за спеціальністю «Лабораторна діагностика» / упор. В. В. Мінухін, Н. І. Коваленко, Т. М. Замазій, О. В. Кочнєва. – Харків : ХНМУ, 2015. – 52 с.

Упорядники      В. В. Мінухін  
                            Н. І. Коваленко  
                            Т. М. Замазій  
                            О. В. Кочнєва

## Тема: Лабораторна діагностика сифілісу

**Кількість годин:** 2

**Обґрунтування теми.** Захворюваність на венеричні хвороби, у тому числі на сифіліс, зростає в усьому світі й досягла критичного рівня. За приблизними оцінками ВООЗ, сифіліс є однією з найпоширеніших інфекцій, що передаються статевим шляхом. У світі щорічно заражаються сифілісом 15 млн людей. Особливо швидкими темпами вона зростає у країнах Східної Європи, СНД і в Україні зокрема. Причин росту сифілітичної інфекції багато. Це зміна сексуальної поведінки, акселерація підлітків, урбанізація і міграція населення, а також моральний стан суспільства і соціальні умови життя. Особливо небезпечним є зростання захворюваності на сифіліс серед вагітних жінок, неповнолітніх, а також сифіліс новонароджених. Поряд із сифілітичною моноінфекцією часто виявляється мікст-інфекція (змішана інфекція). Тому у хворих виявляють не тільки бліді трепонеми, а й гриби роду *Candida*, трихомонади, гонококи, умовно-патогенні бактерії (гاردнерели, лістерії, стафілококи) та ін.

### **Мета:**

- *Загальна:* оволодіти мікробіологічною діагностикою хвороб, спричинених спірохетами.

- *Конкретна:*

- а) знати: правила безпеки при роботі з біологічним матеріалом (Державні санітарні правила – ДСП 9.9.5.03599);

- б) вміти:

1. Підготувати робоче місце лаборанта.
2. Дотримуватися правил роботи і техніки безпеки з інфікованим матеріалом, культурами мікроорганізмів, апаратурою.
3. Відбирати та транспортувати матеріал для дослідження при підозрі на інфекцію, обумовлену патогенними спірохетами.
4. Готувати матеріал, який надійшов від хворого з підозрою на сифіліс.
5. Досліджувати матеріал за допомогою методів, призначених для виявлення патогенних спірохет.
6. Давати оцінку результатам дослідження та заповнювати відповідну лабораторну документацію.

**Матеріальне та методичне забезпечення теми:** музейні мікропрепарати, сироватка крові хворого, антиген трепонемний ультразвуковий, антиген кардіоліпіновий, ізотонічний розчин натрію хлориду, комплемент, гемолітична система (суміш гемолітичної сироватки й еритроцитів барана), бланки направлень, бікс, барвник Романовського–Гімзи, мікроскоп, імерсійне масло, дезінфікуючий розчин, сірники, маркер, штативи, бак, петлі, спиртівка, хімічні пробірки, піпетки, груші, предметні скельця, таблиці, атлас.

## Зміст заняття

### Загальна характеристика патогенних спірохет

Порядок Spirochaetales (від *грец. speira* – завиток і *chaite* – волосся) об'єднує родини Treponemataceae, Spirochaetaceae і Leptospiraceae. Патогенними для людей серед родини Spirochaetaceae є рід *Borrelia*, Treponemataceae – рід *Treponema*, серед родини Leptospiraceae – рід *Leptospira*.

**Спірохети** – це прокаріоти спіралеподібної форми, завтовшки 0,1–0,3 мкм, завдовжки від 5 до 250 мкм, грамнегативні. Особливістю їх структури є те, що в центрі клітини знаходиться протоплазматичний циліндр, у якому міститься цитоплазма, нуклеоїд, рибосоми 70S, ферменти. Протоплазматичний циліндр покритий цитоплазматичною мембраною і клітинною стінкою. Клітинна стінка містить пептидоглікан. Завдяки певному розташуванню шарів пептидоглікану утворюються первинні завитки. Їх кількість, тип, крок, висота, кут нахилу різні у різних видів спірохет, що має значення для їх систематики. Навколо протоплазматичного циліндра у периплазматичному просторі розміщуються 1–2 або багато (100 і більше) джгутиків (фібрил), які утворюють фібрилярний апарат. Джгутик (джгутики) покритий зверху багат шаровою поверхневою мембраною, тобто він міститься всередині клітини, тому його називають периплазматичним, або ендоджгутиком. Один кінець кожного джгутика прикріплюється до одного з полюсів протоплазматичного циліндра, а другий – приблизно посередині циліндра. При скороченні джгутиків тіло спірохет згинається, внаслідок чого утворюються вторинні завитки. Ендоджгутик зумовлює рухливість спірохет, яка у рідкому середовищі має три основні типи: обертальний, поступальний і згинальний.

За Грамом спірохети забарвлюються негативно. Диференційним методом забарвлення є метод Романовського–Гімзи. Інтенсивність забарвлення за цим методом родоспецифічна. Капсули та спори відсутні. За несприятливих умов спірохети скручуються у клубок, виділяють слиз, який ущільнюється і утворює оболонку. Таку форму існування спірохет називають **спірохетальною цистою**. Циста має декілька мембран, які перешкоджають проникненню антитіл і лікарських засобів, тому вона є формою збереження спірохет в організмі, спричинюючи рецидив інфекції. Розмножуються спірохети шляхом бінарного, множинного (трепонеми) поділу, а також, можливо, через цистоутворення.

**Хемоорганотрофи.** За типом дихання серед спірохет є аероби, анаероби, факультативні анаероби і мікроаерофіли. Форми, що здатні до культивування, потребують присутності в поживному середовищі сироватки, тканинних екстрактів. Ростуть повільно.

**Непатогенні й умовно-патогенні** спірохети значно поширені у природі. Вони є у воді, ґрунті, в організмі тварин, у складі нормальної мікрофлори людини.

## Трепонеми

### **Таксономія**

*Сімейство:* Treponemataceae.

*Рід:* Treponema.

*Види:* *T. pallidum*, представники мікрофлори ротової порожнини (*T. denticola*, *T. macrodenticum*, *T. orale*, *T. vincentii*).

*Підвиди:* *pallidum* (збудник сифілісу), *endemicum* (збудник ендемічного сифілісу), *petenue* (збудник фрамбезії), *carateum* (збудник пінти).

**Сифіліс** – це хронічне венеричне антропонозне захворювання, що характеризується первинним афектом, висипом на шкірі та слизових оболонках з наступним ураженням різних органів і систем.

Збудник сифілісу був виділений у 1905 р. Ф. Шаудіном і Г. Хофманом, експериментально на мавпах це підтвердили І. І. Мечников і Е. Ру.

**Морфологічні та тинкторіальні властивості.** *T. pallidum* (від грец. *trepo* – обертатися, *pema* – нитка) має вигляд штопора, розміром 0,2–0,35×4–20 мкм, 8–12 рівномірних завитків розміщені на однаковій відстані (близько 1 мкм), їх висота у напрямку кінців зменшується. Кількість ендоджгутиків – 2 і більше. Для трепонем характерні обертальні, поступальні, хвилеподібні й згинальні рухи (маятникоподібні). Рухи блідої трепонеми повільні, що є диференційно-діагностичною ознакою.

В організмі тварин і людей трепонеми здатні покриватися мукополісахаридною капсулою, за несприятливих умов *in vitro* та *in vivo* утворюють цисти – форму стійкого виживання і розмноження. Трепонеми також здатні перетворюватися на L- і фільтрувальні форми. Перетворення трепонем на L-форми надто утруднює діагностику сифілісу. Цисти і L-форми більш стійкі до факторів навколишнього середовища, у тому числі до антибіотиків. Цим пояснюється те, що в ранній стадії захворювання, коли в організмі перебувають спіралеподібні трепонеми, сифіліс лікується швидше, ніж у пізній, коли спіралеподібні форми трепонем перетворюються на L-форми і цисти.

Трепонеми погано поглинають анілінові барвники, під час фарбування за Романовським–Гімзою забарвлюються у блідо-рожевий колір, у зв'язку з чим рід був названий блідою трепонемою. За Грамом не забарвлюються. Під час фарбування за Морозовим забарвлюються у коричневий або чорний колір (відновлюють нітрат срібла до металевого срібла). Їх можна виявити під час фазово-контрасної і темнопольної мікроскопії (ніжний сріблястий мікроорганізм з плавними рухами на темному фоні). Також використовують негативне контрастування за Бурі.

**Культуральні властивості.** Анаероби або мікроаерофіли. *T. pallidum* дуже вибаглива до поживних середовищ і майже не росте на штучних середовищах (вірулентні штами не ростуть на поживних середовищах). Для її культивування використовують напівзсілу кінську сироватку, асцитичну рідину, бульйон з печінки з додаванням сироватки крові, мозкової та ниркової тканини під шаром вазелінової олії. Посіви культивують у відносно

*анаеробних умовах* за температури 36,5–37 °С. Трепоними розмножуються повільно, тому колонії на середовищі з'являються на 3–5-у добу. У разі тривалого культивування трепонеми адаптуються до більш простих середовищ (наприклад, Кіта–Тароці). Культивування призводить до втрати вірулентних та зміни антигенних властивостей.

Трепоними, вирощені на поживних середовищах і курячому ембріоні, називають *культуральними*. Кращим способом вирощування патогенних трепонем є зараження кролика у тестикули (експериментальний орхіт). Ці трепонеми називають *тканинними*. Культуральні й тканинні трепонеми використовують для виготовлення антигену, який застосовують у серологічних діагностичних реакціях.

**Ферментативні властивості.** Біохімічні властивості трепонем вивчені недостатньо внаслідок відсутності спроможності до культивування. Деякі штами розщеплюють глюкозу, галактозу, сахарозу, мальтозу і маніт з утворенням кислоти, утворюють індол та сірководень, розріджують желатину. Поодинокі штами лізують еритроцити людини.

**Антигенні властивості.** Мають складну антигенну структуру. Є специфічний термолабільний білковий, полісахаридний антиген та неспецифічний ліпоїдний антиген. Антигенний склад культуральних і тканинних трепонем дуже схожий. Бліді трепонеми мають перехреснореагуючі антигени з бореліями, лептоспірами, а також із ліпідами ссавців (наприклад, із ліпідами серця великої рогатої худоби), тому екстракт м'язів серця – кардіоліпіновий антиген – використовують для постановки серологічних реакцій.

В організмі людей трепонеми стимулюють продукцію специфічних антитіл і реагінів (атопічних антитіл). Специфічні антитіла іммобілізують бактерії і обумовлюють антитілозалежну цитотоксичність. Специфічні антитіла взаємодіють зі специфічним трепонемним антигеном, а реагіни здатні взаємодіяти з неспецифічним кардіоліпіновим антигеном. На цьому базується використання в серологічній діагностиці сифілісу як специфічного, так і неспецифічного антигену.

**Резистентність.** Трепоними нестійкі в навколишньому середовищі. Вони швидко гинуть під час висушування, підвищення температури (за 40 °С гинуть протягом 2 год, за 55 °С – протягом 15 хв), під дією дезінфектантів. Чутливі до солей важких металів (ртуті, миш'яку, вісмуту), кислот. В ураженій тканині (гомогенізовані зразки) тривало зберігаються при знижених температурах. Можуть зберігатися на посуді, вологому рушнику, білизні до їх висихання.

**Фактори патогенності.** Патогенність спірохет пов'язана з деструктивними змінами, які вони спричиняють у тканинах ураженого організму, а також з імунно-патологічними процесами (обумовлені адгезинами, ліпопротеїдами), які призводять до цитотоксичності. Токсиноутворення не виявлене.

**Епідеміологія.** Сифіліс – антропонозна інфекція. Джерелом є хвора людина, особливо у ранні періоди захворювання. Механізм передачі – контактний. У більшості випадків сифіліс передається під час статевого

контакту, але можлива передача під час поцілунків, через посуд, рушник, білизну (побутовий сифіліс), а також через плаценту або під час пологів від матері до дитини (вроджений сифіліс). Вірогідність виникнення вродженого сифілісу найбільш велика у перші 3 роки після зараження сифілісом матері, особливо у вторинному і прихованому ранньому періодах захворювання. Менш вірогідна передача захворювання при первинному і пізніх формах сифілісу у матері, дуже рідкісні випадки інфікування плода при вродженому сифілісі матері. Можливе професійне зараження медичного персоналу під час контакту з кров'ю хворого на ранньому етапі інфекції. При переливанні крові від донора, хворого на сифіліс у будь-якій стадії, включаючи інкубаційний період, можливе зараження сифілісом реципієнта. Найбільш небезпечна кров хворого з вторинним сифілісом.

**Патогенез і клінічна картина.** Інкубаційний період триває від 2 до 10 тиж, частіше 20–28 днів. Вхідними воротами є слизові оболонки статевих органів, інколи – порожнини рота, а також ушкоджена шкіра.

Бліда трепонема – високовірулентний мікроорганізм. Для того, щоб відбулося зараження, досить, щоб до організму людини потрапили 10–100 блідих трепонем. Вірогідність зараження зростає при повторних статевих контактах із джерелом зараження і великій кількості блідих трепонем у виділеннях сифілідів.

У місці проникнення збудник розмножується, формується первинна сифілома – твердий шанкр (від *франц. chancre* – виразка) – безболісна ерозія або виразка зі щільним дном, овальної або круглої форми, з правильними контурами, з чіткими краями і блюдцеподібним поглибленим дном. Дно ерозії чисте, відокремлюване убоге, серозне. У разі приєднання вторинної інфекції відокремлюване може бути більш рясним, серозно-гнійним. Визначальним симптомом є щільний інфільтрат в основі (твердий шанкр), настільки щільний, що нагадує при пальпації хрящ під дном ерозії або виразки. Сифілітичні шанкри, як і інші зовнішні прояви сифілісу, практично безболісні, що пояснюється анестезією нервових закінчень токсинами блідої трепонеми. Шанкри можуть бути одиничними або множинними. Вважають, що множинні шанкри з'являються в результаті неодноразових статевих контактів з джерелом зараження. При статевому шляху передачі первинний афект локалізується переважно в ділянці геніталій.

Крім появи шанкрів, другим неодмінним симптомом набутого сифілісу є збільшення довколишніх лімфатичних вузлів – регіонарний лімфаденіт. Оскільки первинний афект локалізується переважно на геніталіях, то уражаються найчастіше пахові лімфатичні вузли. Лімфаденіт може бути одностороннім або двостороннім, у першому випадку може розташовуватися як на тому ж боці, що і шанкр, так і на протилежному. Збільшення лімфатичних вузлів появляється приблизно через тиждень після виникнення шанкру. Величина лімфатичних вузлів може варіювати від розміру квасолі до курячого яйця. Збільшені лімфатичні вузли безболісні, консистенція їх щільноеластична (склероденіт). При екстрагенітальному шанкрі регіонарні лімфатичні вузли можуть бути підщелепними, шийними, паховими.

Патогенні бліді трепонеми в макроорганізмі можуть перетворюватися на цисти. У деяких лейкоцитах трепонеми знаходяться всередині полімембранних фагосом. Фагоцитовані трепонеми залишаються життєздатними, тобто розвивається незавершений фагоцитоз. Із лімфоїдної тканини збудник потрапляє у кров і дисемінує (поширюється) по всьому організму – відбувається генералізація процесу. У кров'яному руслі збудник прикріплюється до ендотеліальних клітин, що обумовлює розвиток ендартеріїтів, що призводить до розвитку васкулітів і тканинного некрозу. На 5–6-му тижні розвивається полілімфаденіт. На початку захворювання збудник швидко проникає у різні тканини, потім у зв'язку із формуванням імунітету і підвищенням резистентності організму поширення збудника дещо обмежується, але збудник повністю не знищується. В осіб з високою резистентністю розвиваються гумозні (від *лат. gummi* – камідь) ураження шкіри, внутрішніх органів, серцево-судинної системи, кісток. Вони характеризуються розпадом тканин. В осіб із низькою резистентністю бліда трепонема проникає в нервові волокна, де може перебувати як позаклітинно, так і всередині клітин (у цитоплазмі, ядрі). Особливістю сифілісу є відсутність скарг з боку хворого (щодо свербіжу, болю, печіння тощо).

Умовно весь період захворювання на сифіліс поділяють на три стадії, хоча послідовність їх зміни не завжди виражена.

Первинний сифіліс характеризується появою твердого шанкру, він триває 1,5–2 міс. Оскільки антитіла накопичуються в достатній кількості тільки на 4-му тижні, розрізняють первинний серонегативний (1–3-й тиждень) і первинний серопозитивний (4–7-й тиждень) сифіліс. Твердий шанкр поступово загоюється, не залишаючи рубців.

Вторинний сифіліс розвивається у разі відсутності належного лікування. Він проявляється різними висипаннями на шкірі: з'являються рожево-червоні плями 0,5–1 см у діаметрі (розеолі), папули (прищі), у тяжких випадках (у алко- та наркозалежних громадян) розвиваються пустули (гнійні прищі-сифіліди), на місці яких можуть утворюватися виразки (сифілітичні рупії) – розвивається вторинний "свіжий" сифіліс. Розеоли локалізуються на тулубі, переважно на передній і бічних поверхнях, на грудях, животі й згинальних сторонах кінцівок. Дуже характерні для сифілісу папулозні висипання на долонях і підшвах. У зв'язку з розвитком імунних реакцій ці висипання можуть зникати – розвивається латентний період. За будь-яких несприятливих умов (стрес, гостра інфекція, інтоксикація) висипання проявляються знову – вторинний рецидивний сифіліс. В елементах висипу міститься велика кількість живих трепонем, у цей період хворий найбільш заразний. Появі висипань можуть передувати продромальні явища: розбитість, головний біль, помірне підвищення температури тіла, болі в кістках і суглобах, втрата апетиту. Це зазвичай спостерігається в останні 5–7 днів перед появою генералізованого висипу.

Всі серологічні реакції у вторинному періоді різко позитивні.

Вторинний сифіліс триває 3–4 роки. Рецидиви повторюються декілька разів. Паралельно із зовнішніми проявами відбувається ураження внутрішніх



органів (печінки, нирок, кісткової, нервової, серцево-судинної систем). Тривалий в'ялий перебіг, а також наявність прихованих форм сифілісу пояснюють перетворенням спіралеподібних форм трепонем на цисти спокою.

Третинний сифіліс розвивається за відсутності лікування. У шкірі, різних органах, кістках, нервовій тканині утворюються гранульоми (гуми). Гуми є результатом розвитку в організмі імунопатологічного процесу у відповідь на трепонемі, що збереглися в організмі. Тканина в гумах розкладається, що призводить до утворення порожнини. Після загоєння гум утворюються грубі рубці. Третинний період триває роками і характеризується глибоким порушенням функцій внутрішніх органів. У гумах міститься невелика кількість трепонем, тому не можна стверджувати, що третинний сифіліс не заразний.

У разі відсутності лікування або проведення неадекватного лікування через 8–15 років може розвинути *нейросифіліс*. У разі ураження головного мозку розвивається прогресуючий параліч, у разі ураження спинного мозку – спинна сухотка.

Як відхилення від типової картини сифілісу інколи розвивається сифіліс без шанкру і злоякісний сифіліс. Сифіліс без шанкру виникає внаслідок безпосереднього проникнення збудника у кров (під час внутрішньовенних ін'єкцій) і проявляється через 2–3 міс у формі вторинного сифілісу. Злоякісна форма розвивається в ослаблених і виснажених хворих. Вона характеризується висипаннями у формі сифілітичних рупій, значним ураженням кісток, лімфаденопатією і слабкою імунною відповіддю. Ураження нервової і серцево-судинної систем, внутрішніх органів можуть бути спровоковані вживанням алкоголю, наркотиків, неповноцінним харчуванням, екологічною ситуацією, наявністю супутніх захворювань (туберкульоз, ВІЛ-інфекція, гепатит В, генітальний герпес).

Дослідження останніх десятиліть показали, що не завжди послідовно проявляються всі періоди хвороби. У 1/3 хворих на третинний сифіліс розвивається нейросифіліс, у 1/3 – гуми, у решти – серцево-судинна патологія. Вважають, що клінічні прояви сифілісу залежать від формування імунної відповіді пацієнта, а також від співвідношення гуморальних і клітинних реакцій гіперчутливості.

Вроджений сифіліс розвивається внаслідок інфікування плоду від хворої матері (збудник проникає через кровоносні й лімфатичні судини пуповини). У хворих жінок можуть бути викидні у II половині вагітності або мертвонародження. У разі народження дитини клінічні прояви можуть спостерігатися одразу після народження (ранній природжений сифіліс) або у віці від 5 до 15 років (пізній природжений сифіліс).

Ранній природжений сифіліс проявляється папульозно-розеольозним висипом, сифілітичною пухирчаткою, остеохондритами (ураженням кісток і хрящів), ураженням печінки, селезінки, нервової системи (менінгіт, менінгоенцефаліт).

Типовим проявом пізнього природженого сифілісу є триада Хатчинсона: паренхіматозний кератит, бочкоподібні зуби і глухота. Часто виникають зміни у великих гомілкових кістках – шаблеподібні гомілки.

Останнім часом збільшується кількість хворих зі злоякісним перебігом інфекції. Залишається високим рівень вторинного рецидивного і раннього прихованого сифілісу.

**Імунітет.** Проти сифілісу немає природного імунітету і не вдається створити штучний. У хворого формується інфекційний імунітет. Він розвивається через 10–11 днів після появи твердого шанкру (шанкерний імунітет) і захищає від суперінфекції. У разі повторного зараження новий шанкр швидко загоюється. У відповідь на антигени збудника в організмі утворюються антитіла, які є свідками інфекційного процесу, розвивається гіперчутливість уповільненого типу (РГУТ) та аутоімунні процеси. Гуморальна імунна відповідь характеризується первинним утворенням неспецифічних антитіл на ліпоїдний антиген збудника, які називають «реагінами», та представляють собою суміш IgM- і IgG-антитіл. Титр цих антитіл у процесі зменшення в організмі кількості трепонем знижується. Специфічні антитіла на білковий антиген з'являються пізніше. Вони тривало зберігаються незалежно від наявності трепонем в організмі.

**Мікробіологічна діагностика.** Для дослідження відбирають тканинну рідину із виразки, ерозії, папул, роzeол, кров, а також пунктат лімфатичних вузлів, спинномозкову рідину (у разі ураження нервової системи). У жінок беруть мазок із шийки матки, звертають увагу на слизову оболонку ротової порожнини, а також анус. Для дослідження використовують уніфіковані методи: мікроскопічний і серологічний, молекулярно-генетичний. Культуральний метод не має практичного значення.

**Бактеріоскопічне дослідження** проводять при первинному сифілісі й у період висипу при вторинному сифілісі. У разі мікроскопічного методу вивчають зовнішній вигляд трепонем і тип їх руху в нативному препараті. Слід пам'ятати, що на статевих органах, у слині трапляються сапрофіти, схожі на білду трепонеми. Дослідження проводять методом роздавленої (висячої) краплі в темному полі. Білди трепонеми має вигляд ніжної спіралі сріблястого кольору. Рухи плавні, маятникові, згинальні. За цими ознаками її відрізняють від сапрофітних трепонем порожнини рота та статевих органів.

У разі *серологічного методу* застосовують відбіркові неспецифічні тести з кардіоліпіновим антигеном, які використовують для обстеження населення на сифіліс, та діагностичні тести з трепонемальним антигеном – для підтвердження діагнозу.

До відбіркових тестів належать: мікрореакція преципітації (МРП) або її аналоги (VDRL – venereal disease research laboratory, RPR – rapid plasma regain) – флокуляційні тести і РЗК (реакція Вассермана). Реакція мікропреципітації і флокуляційні тести визначають як IgG, так IgM-антитіла та можуть бути позитивними на ранніх етапах захворювання. Відбіркові тести з кардіоліпіновим антигеном в кількісному варіанті використовують для контролю ефективності лікування.

До групи специфічних реакцій належать: ІФА, РПГА, РІФ і реакція іммобілізації трепонем (РІТ). При постановці цих реакцій як антиген

використовують ультразвуковий екстракт трепонем, який виростили в яєчку кролика. Це високочутливі й високоспецифічні реакції на сифіліс. Вони відносяться до діагностично підтверджених тестів. У зв'язку з тривалим збереженням специфічних антитіл в організмі ці реакції не можуть бути використані для оцінки ефективності лікування. Крім того, вони будуть позитивними у хворих на фрамбезію та бeджeль.

МРП ґрунтується на тому, що до плазми або сироватки крові хворого додають кардіоліпіновий антиген. Результат реакції враховують через 7–10 хв. У разі позитивного результату утворюються великі пластівці. Якщо пластівці відсутні, реакція вважається негативною. МРП використовують під час масового обстеження населення.

РЗК (реакція Вассермана – РВ, або RW) проводять із сироваткою крові або спинномозковою рідиною хворого з метою визначення антитіл. Як діагностиком використовують кардіоліпіновий і трепонемний антигени. Реакція позитивна через 2–3 тиж після появи твердого шанкру, при вторинному сифілісі вона позитивна в 100 %, у третинному періоді – 75 %.

РІФ використовується для серодіагностики прихованого сифілісу, її висока чутливість дає змогу діагностувати всі форми сифілісу, у тому числі розпізнавати його ранні форми.

РІТ ґрунтується на феномені втрати рухливості тканинними білими трепонемами за наявності протитрепонемних антитіл, що викликають іммобілізацію трепонем і накопичуються в сироватці крові хворого.

РІПА стає позитивною через 3 тиж після зараження і залишається такою через багато років після одужання.

Для підтвердження діагнозу "сифіліс" найчастіше використовують РЗК і РІФ.

Слід враховувати, що РЗК може бути позитивною в осіб, які не хворіють на сифіліс. Такі результати називають хибнопозитивними, або неспецифічними. Причиною цього є наявність перехресно реагуючих антигенів у різних збудників інфекційних хвороб, а також зміни ліпідного обміну, зміна в глобулінах сироватки крові за певних станів макроорганізму. Хибнопозитивна РЗК можлива на фоні тривалого донорства, під час менструації, безпосередньо до і після пологів, у новонароджених, в осіб, що вживали алкоголь за 24–72 год до взяття крові, у хворих на туберкульоз, грип, кір, пневмонію, дерматози різної етіології, аскаридоз, поворотний тиф, лептоспіроз тощо. Щоб відрізнити хибнопозитивну й істинно позитивну реакції, проводять повторне дослідження сироватки крові через 1–2 тиж. При цьому хибнопозитивні реакції стають негативними або їх вираженість зменшується, у той час як у хворих на сифіліс титр антитіл збільшується. Для диференціації хибнопозитивних реакцій від істинних паралельно з РЗК ставлять РІТ і РІФ, результати яких хибнопозитивними не бувають.

Результати РІФ і ІФА стають позитивними ще в інкубаційному періоді, на 3-му тижні після зараження. РПГА і РІБТ позитивні, як правило, з кінця первинного періоду.

**Профілактика.** Специфічна профілактика не проводиться. Неспецифічна профілактика – це раннє виявлення хворих, своєчасне й ефективне лікування, а також утримання від випадкових статевих стосунків, використання індивідуальних засобів захисту від зараження. Слід пам'ятати про небезпечність зараження не тільки сифілісом, а й іншими хворобами, що передаються під час статевих контактів (гонорея, хламідіоз, трихомоніаз, мікоплазмоз, генітальний герпес, СНІД та ін.).

**Лікування.** Для лікування сифілісу використовують пеніцилін і його похідні (біцилін-5), еритроміцин, ампіцилін, доксициклін, центріаксон, препарати вісмуту, а також імуномодулятори (циклоферон).

### **Інші патогенні трепонеми**

*T. pallidum* підвид *endemicum* є збудником ендемічного сифілісу (беджель). Захворювання розповсюджене на Середньому Сході, в Африці та Південно-Східній Азії. Захворювання характеризується появою висипу на шкірі та слизових оболонках з подальшим ураженням, що нагадує гуми при сифілісі. Шлях передачі – контактно-побутовий.

*T. pallidum* підвид *pertenue* – збудник фрамбезії. Захворювання зустрічається у тропічних районах земної кулі. Передається контактно-статевим шляхом та через предмети побуту. Має характер сімейних спалахів. Характеризується появою в місці вхідних воріт болючої виразки з подальшими шкірними висипами, що перетворюються на дистрофічні процеси на шкірі та в кістках.

*T. pallidum* підвид *carateum* – збудник пінти. Захворювання зустрічається в осіб із темним кольором шкіри в тропічних районах земної півкулі. Передається контактним шляхом та через комах (мошки). На місці вхідних воріт утворюється папула, далі відбувається генералізація процесу, що супроводжується появою різноманітного кольору плям на шкірі, гіперкератозу підшов та долоней, випадіння волосся.

Діагностика проводиться тими ж методами, що і при сифілісі. Лікування препаратами пеніцилінового ряду.

### **Практичні навички з теми.**

1. Проведення мікроскопії мазків-препаратів зі спірохетами.
2. Визначення морфотинкторіальних властивостей патогенних спірохет.
3. Постановка реакції Вассермана (РЗК), основний дослід. Проведення обліку та оцінювання результатів дослідження.
4. Приготування мазку з зубного нальоту, фарбування за Романовським, проведення мікроскопії. Визначення морфотинкторіальних властивостей непатогенних спірохет.

### **Алгоритми лабораторної роботи**

**Алгоритм:** «Правила забору матеріалу за підозри на сифіліс».

*Матеріал для дослідження і способи забору:*

1. Вміст твердого шанкру (первинний період). Виразку почистити ватою або марлею, змоченою ізотонічним розчином хлориду натрію, вміст виразки відбирають стерильною піпеткою. При поганому виділенні тканинної рідини краї виразки треба трохи натиснути пінцетом. Зібрану піпеткою рідину нанести на предметне скло для мікроскопії (працювати треба в гумових рукавичках).

2. Вміст роzeол, папул, везикул, пустул (вторинний період). Сифілітичні ураження очищують тампоном, змоченим ізотонічним розчином натрію хлориду, потім протирають сухим тампоном. Платиновою бактеріологічною петлею подразнюють досліджуване вогнище до появи тканинної рідини.

3. Кров. Беруть в третинному періоді 4–7 мл з ліктьової вени стерильним шприцом.

Патологічний матеріал досліджують до лікування, обов'язково враховуючи період захворювання.

**Алгоритм:** *«Хід мікробіологічного дослідження матеріалу за підозри на сифіліс».*

**Зараження сифілісом лабораторних тварин** (кролів) – найстаріший метод прямого виявлення інфекційних *T. pallidum* у будь-яких клінічних матеріалах за умови, що пацієнтові не була розпочата антибіотикотерапія. Метод зараження кроликів використовують у теперішній час тільки в дослідницькій практиці, зокрема як «золотий стандарт» для оцінки чутливості інших методів, наприклад ПЛР.

**Мікроскопічне дослідження в темному полі.** У хворих із підозрою на сифіліс за наявності уражень на шкірі й слизових оболонках (ерозії, виразки, ерозивні папули) мікроскопічне дослідження препаратів із місць ураження в темному полі розглядається як специфічний і ранній метод прямого виявлення *T. pallidum* за умови виключення інфекції іншими видами патогенних трепонем. Позитивний результат мікроскопії є серйозним підтвердженням діагнозу сифілісу при виключенні інших трепонем, що зустрічаються на статевих органах і в порожнині рота: *T. amylovorum*, *T. denticola*, *T. lecithinolyticum*, *T. maltophilum*, *T. medium*, *T. parvum*, *T. pectinovorum*, *T. socranskii* subs, *buccale* та ін.

Діагноз первинного сифілісу може бути поставлений шляхом мікроскопічного дослідження, перш ніж з'являться позитивні серологічні тести, на що потрібно від декількох днів до декількох тижнів. Вважається, що мікроскопічне дослідження в темному полі найбільш ефективно при первинному і вторинному сифілісі, ранньому вродженому сифілісі за наявності уражень шкіри і слизових оболонок, що містять значну кількість збудників. Чутливість мікроскопічного дослідження в темному полі оцінюється до 80 %.

Позитивний результат мікроскопічного дослідження в темному полі розглядається як підстава для встановлення діагнозу та призначення лікування. При негативному результаті показано повторне (до 3 разів) дослід-

ження після застосування примочок з фізіологічним розчином натрію хлориду; негативний результат не є підставою для виключення діагнозу сифілісу і вимагає подальшого підтвердження методами серологічної діагностики.

**Методи серологічної діагностики** сифілісу переважають у лабораторній діагностиці сифілісу з метою виявлення інфекції серед декретованого контингенту, підтвердження клінічного діагнозу, постановки діагнозу прихованого сифілісу, контролю ефективності лікування і як критерій вилікування. Залежно від виявлених антитіл серологічні реакції підрозділяють на нетрепонемні (реагінові) і трепонемні.

*Серологічні нетрепонемні тести* виявляють антитіла класів IgM і IgG (реагіни) до ліпоїдних і ліпополіпротеїдних компонентів, таких, як кардіоліпін, холестерин, лецитин, що вивільнюються з ушкоджених клітин та мають перехрещення з ліпідними антигенами *T. pallidum*. Ці антигени мають властивості аутоантигенів.

Нетрепонемні тести діляться на флокуляційні: реакція Кана, реакція Закс–Вітебського (цитохолева), MP, VDRL, RPR, USR, TRUST і РЗК (Вассермана) з ліпідними антигенами.

Без додаткового підтвердження у трепонемних тестах позитивні результати нетрепонемних тестів не можуть трактуватися як наявність сифілітичної інфекції. Нетрепонемні тести недорогі, підходять для скринінгу великої кількості зразків, час отримання відповіді незначний, ряд сучасних тестів випускаються стандартизованими. До обмежень нетрепонемних тестів відносять недостатню чутливість у первинному періоді сифілісу і при пізньому сифілісі, можливість феномену прозони (за наявності надлишкової кількості антитіл у досліджуваній сироватці блокується нормальний перебіг реакції антиген–антитіло, приводячи до хибнонегативних або дуже слабопозитивних результатів, що дає різко позитивні відповіді при розведенні вихідної сироватки), а також значну кількість хибнопозитивних реакцій (до 2,5 %), що спостерігаються значно частіше у жінок. Хибнопозитивні реакції зустрічаються при різних інфекціях (вірусних і бактеріальних), при малярії, аутоімунних захворюваннях (системний червоний вовчак, ревматизм, вузликовий периартеріїт, генералізована склеродермія, криоглобулінова пурпура, саркоїдоз та ін.), онкологічній патології, хворобах крові, цирозі печінки, алкоголізмі, наркоманії, ендокринних захворюваннях (діабет, тиреоїдит), при вагітності, отруєннях, на фоні лікарської терапії, в старечому віці та ін. Для дослідження не використовують гемолізовані, хильозні зразки і такі, що проросли.

*Реакція зв'язування комплементу* (реакція Вассермана) з кардіоліпіновим антигеном. У реакції використовують сироватки крові пацієнтів, прогрітих при 56 °С для інактивації комплементу. Механізм реакції полягає у зв'язуванні реагінних антитіл сироваткою, що тестується, з кардіоліпіновим антигеном. Імунний комплекс, що утворився, здатний зв'язувати дозовано доданий у систему комплемент морської свинки. Як індикатор в реакцію вводиться гемолітична система (еритроцити барана і гемолітична

сироватка). У разі зв'язування комплементу утвореним імунним комплексом гемолізу не відбувається (реакція позитивна), а за наявності вільного комплементу в реакційній суміші внаслідок відсутності в досліджуваній сироватці реагів відбувається гемоліз еритроцитів (реакція негативна). Для позначення ступеня позитивності реакції Вассермана використовують систему чотирьох плюсів: повна затримка гемолізу – 4+ (різко позитивна реакція); значна затримка гемолізу – 3+ (позитивна реакція); часткова затримка гемолізу – 2+ (слабопозитивна реакція); незначна затримка гемолізу – 1+; сумнівна реакція –  $\pm$ . Негативний результат реакції характеризується повним гемолізом.

Реакція Вассермана (RW) із кардіоліпіновим антигеном може бути поставлена в якісному і кількісному (з різними розведеннями сироватки) варіантах. Кількісну постановку використовують для контролю за ефективністю терапії (зниження титру реакінових антитіл – серонегативація). Крім сироватки крові, в реакції можуть бути використані зразки цереброспінальної рідини. Для збільшення чутливості реакцію можна ставити на холоді. Реакція Вассермана з кардіоліпіновим антигеном має недостатньо високу чутливість і специфічність:

- позитивна приблизно в 70 % випадків при первинному сифілісі через 1–4 тиж після появи шанкру;
- негативна майже у 30 % пацієнтів із пізнім (третинним) сифілісом;
- високий відсоток хибнопозитивних реакцій.

У більшості зарубіжних країн цю реакцію не використовують у практиці, замінивши її іншими стандартними нетрепонемними тестами.

**Флокуляційні тести:** VDRL, RPR, USR, TRUST, MP. При розробці стандартизованих флокуляційних тестів для серодіагностики сифілісу, що відрізняються за своєю постановкою, застосовуванням антигенів, швидкості отримання результату, рівнями специфічності та чутливості і ряду інших характеристик, використовується кардіоліпін-лецитин-холестериновий антигенний комплекс.

**Мікрофлокуляційний тест VDRL** (Venereal Disease Research Laboratory). Реакцію ставлять на склі (слайді). Утворений у результаті реакції кардіоліпіновий флокулят антиген–антитіло реєструють за допомогою світлового мікроскопа (зазвичай з однаковими об'єктивом і окуляром  $\times 10$ ). Тест VDRL придатний для дослідження прогрітих сироваток крові, а також зразків цереброспінальної рідини. VDRL непридатний для дослідження плазми крові. Результати VDRL-реакції оцінюють як «реактивні», якщо виявлені великі агрегати, як «слабореактивні», якщо флокуляція незначна, і «нереактивні» за відсутності реєстрованої флокуляції. Приблизно в 1–2 % випадків при якісній постановці VDRL у хворих на вторинний сифіліс результати можуть бути негативними (феномен прозони). Такі хибнонегативні сироватки дають атипovu «шорстку» реакцію, яку може пропустити навіть досвідчений серолог. Кількісна постановка реакції з серією дворових розведень сироватки фізіологічним розчином натрію хлориду до-

зволяє отримати дані про справжню реактивність сироватки, а також визначити титр (найвище розведення, що дає реактивність), значення якого служить базовою величиною реактивності. Зміни титру в процесі й після лікування аж до серонегативації використовують як критерій ефективності терапії. Специфічність VDRL у середньому становить 98 %, чутливість залежить від стадії сифілісу і при первинному сифілісі становить 78%, при вторинному – 100 %, при прихованому – 95 %, при пізньому – 75 %.

До факторів, що лімітують використання VDRL у лабораторній практиці, належить необхідність мікроскопічної реєстрації результатів реакції, що збільшує трудовитрати персоналу. Суб'єктивний фактор також значно впливає на прочитання результату реакції.

USR-mecm (Unheated serum reagin) – тест, придатний для визначення реактинових антитіл не тільки в сироватці, але і в плазмі крові, що не вимагає також прогрівання матеріалу. Антиген, що використовується в тесті, має підвищену реактивність. Специфічність USR дорівнює 99 %, а чутливість залежить від стадії сифілісу і становить при первинному сифілісі – 80 %, при вторинному – 100 %, при прихованому – 95 %. Як і в VDRL, результати USR-теста реєструють за допомогою мікроскопа, лупи, аглютиноскопа. Переваги USR-тесту порівняно з VDRL – можливість використання для аналізу непрогрітої плазми крові, більша стабільність готового стандартного кардіоліпінового антигенного комплексу, дещо більша чутливість реакції при первинному сифілісі.

Швидкий плазмареактиновий тест (RPR-тест) відноситься до макроскопічних нетрепонемних флокуляційних тестів. У стабілізований стандартний кардіоліпіновий антиген додані частинки дрібнодисперсного вугілля, яке дозволяє візуалізувати флокулят і врахувати результати реакції незброєним оком.

Постановка реакції вкрай проста. Тест проводиться на спеціальних картонних картках із видавленими круглими плоскими неглибокими лунками діаметром 18 мм. При якісній постановці на кожне окреслене коло картки наносять 50 мкл нерозведеної досліджуваної плазми або сироватки крові. RPR-тест для дослідження цереброспінальної рідини не застосовують. За допомогою доданих одноразових паличок або піпеток-меланжерів зразок рівномірно розподіляють по поверхні лунки. Потім за допомогою доданого диспенсера з дозуємою голкою на поверхню кожного кола наносять по 1 краплі суспензії RPR-антигену (16 мкл) після ретельного збовтування.

Можливий і інший варіант, коли на поверхню картки наносять окремо по краплі досліджуваного зразка і RPR-антигену, а потім за допомогою шпателя або палички їх змішують, рівномірно розподіляючи по всій окресленій поверхні кола діаметром 18 мм. Вважається, що перший варіант постановки у ряді випадків дозволяє уникнути феномену прозони, оскільки попередній розподіл зразка досліджуваної сироватки (плазми) скорочує локальну концентрацію антитіл у місці додавання антигену,



створюючи більш оптимальні локальні умови для початку формування флокуляту. Відповідь отримують через 8 хв.

Облік результатів реакції проводять візуально при гарному освітленні, коли ще не висохла поверхня кола. Перегляд висохлої картки може призводити до помилок. При утворенні середніх і великих агрегатів результат RPR-тесту враховують як «позитивну реакцію», у разі виявлення рідкісних невеликих агрегатів дають висновок про «слабку реакцію», а за відсутності видимих агрегатів (рівна сіра поверхня) – про «негативну реакцію». Зразки, що дали позитивний результат, а також сумнівні («шорсткі») результати рекомендується досліджувати в напівкількісній постановці, готуючи серійні дворазові розведення (1:2–1:1024) досліджуваного зразка плазми або сироватки у фізіологічному розчині 0,85 % натрію хлориду безпосередньо на картці. Титром зразка вважається останнє розведення, у якому виявляється позитивний результат. Значення титру використовують для подальшого контролю ефективності лікування (серонегативація): після адекватної терапії первинного і вторинного сифілісу титр повинен знижуватися принаймні в 4 рази через 3–4 міс і в 8 разів – через 6–8 міс. У більшості пацієнтів при лікуванні на ранніх стадіях інфекції титри знижуються аж до мінімального або порогового рівня чутливості реакції приблизно через рік.

Специфічність RPR-теста дорівнює 98 %, а чутливість залежить від стадії сифілісу і становить при первинному сифілісі 86 %, при вторинному – 100%, при прихованому – 98 %, при пізньому – 73 %. У даний час RPR-тест на картках за використанням займає лідируюче положення у світі серед нетрепонемних тестів на сифіліс, що обумовлено рядом переваг, серед яких:

- найвища чутливість серед нетрепонемних тестів при первинному, прихованому і пізньому сифілісі;
- швидкість отримання відповіді (8 хв);
- низька вартість аналізу;
- зручність постановки реакції, придатність для індивідуальної постановки і масового скринінгу;
- наявність готових стандартних наборів, що включають все необхідне для постановки;
- висока стабільність RPR-антигену, великий термін придатності (18 міс);
- стандартизація результатів, одержаних у різних лабораторіях;
- прекрасний збіг з сучасними підтверджуючими трепонемними тестами на сифіліс (зокрема, з РПГА).

Позитивні результати, отримані в RPR-тесті, як і у всіх інших нетрепонемних тестах, не можуть трактуватися як наявність інфекції *T. pallidum* без додаткового підтвердження в трепонемних тестах.

TRUST (Toluidin Red Unheated Serum Test) – макрофлокуляційний нетрепонемний тест. Ця модифікація нетрепонемного тесту на картках схожа з RPR-тестом. Основна відмінність полягає в тому, що для приготування антигену використовують дрібнодисперсну суспензію водонерозчинного барвника толуїдинового червоного (в деяких модифікаціях використовують барвник судановий чорний), аглютинація якого в процесі флокуляції дозволила б легше враховувати результат неозброєним оком. Реакцію можна ставити з непрогрітою сироваткою, а також із плазмою крові. Час отримання результату – 8–10 хв. Специфічність тесту – 99 %, а чутливість на різних стадіях сифілісу становить: при первинному сифілісі – 85 %, при вторинному – 100 %, при прихованому – 98 %. TRUST-тест непридатний для дослідження цереброспінальної рідини.

Мікрореакція преципітації з кардіоліпіновим антигеном (МР). В Україні в клінічній практиці використовують мікрофлокуляційний тест з кардіоліпіновим антигеном (мікрореакція преципітації) – відбірковий тест, а також існує кількісний варіант МР при обстеженні хворих на сифіліс у процесі й після закінчення лікування. МР повинна ставитися з інактивованою сироваткою крові, а з плазмою – тільки в день взяття крові з пальця. МР менш чутлива порівняно з РЗК. Специфічність МР – 98 %, а чутливість при різних стадіях сифілісу менше такої при інших стандартних нетрепонемних тестах: при первинному сифілісі – 81 %, при вторинному – 91 %, при прихованому – 94 %. Її проведення трудомістке і небезпечне. Альтернативою є PRP-тест.

*Серологічні трепонемні тести.* Реакція іммобілізації блідих трепонем (РІТ) заснована на феномені втрати блідами трепонемами (штам Nichols) рухливості за наявності специфічних протитрепонемних антитіл у досліджуваній сироватці й комплементу в анаеробних умовах. У РІТ виявляються іммобілізини, що відносяться до пізніших протитрепонемних антитіл і з'являються пізніше тих, що зв'язують комплемент, тому дана реакція мало придатна для підтвердження діагнозу раннього сифілісу, але при вторинному і пізньому сифілісі, нейросифілісі, вродженому сифілісі вона позитивна у 95–100 % випадків. Чутливість РІТ – від 79 до 94 %, а специфічність – 99 %. У реакції використовують сироватки крові, інактивовані прогріванням при 56 °С, або зразки сироваток, висушені на вощеному папері. Відповідь дають у процентах іммобілізації блідих трепонем. За кордоном РІТ застосовують дуже рідко і лише в дослідницьких цілях. Це пояснюється насамперед неможливістю стандартизації методу, необхідністю роботи з живими блідами трепонемами, трудомісткістю і тривалістю постановки реакції, не використанням у випадках, коли розпочато антибактеріальну терапію, меншою чутливістю порівняно з новими серологічними трепонемними тестами.

Реакція зв'язування комплементу (реакція Вассермана) з трепонемним ультразвученим антигеном T. pallidum. Чутливість реакції близько 80 %, специфічність – 98 %. Реакція не входить у список стандартних тестів, рекомендованих ВООЗ.

Реакція імунофлюоресценції (РІФ) непряма. Принцип методу полягає в тому, що специфічні трепонемні антитіла досліджуваної сироватки хворого після реакції з трепонемним антигеном (суспензія блідих трепонем, штам Nichols) візуалізуються при люмінесцентній мікроскопії препарату за допомогою сироватки проти імуноглобулінів людини, міченої флюорохромом (флюоресцеїн ізотіоціанат).

У РІФ можна також визначати титр антитіл за найбільшим розведенням сироватки крові (використовують фосфатний буфер), що дає позитивний результат. Результати РІФ оцінюють наступним чином: позитивними вважають сироватки крові, які дають свічення на 4+, 3+ і 2+; блискуче зелено-жовте свічення оцінюють на 4+, яскраве – 3+, слабке – 2+. Негативними вважають сироватки, які дають свічення 1+ (трепонемні у препараті пофарбовані трохи інтенсивніше фону або не пофарбовані).

РІФ, як і РІТ, рекомендують для діагностики прихованих і пізніх форм сифілісу, розпізнавання хибнопозитивних результатів КСР і МР, особливо у вагітних і соматичних хворих при клінічній, епідеміологічній і анамнестичній підозрі на сифіліс, для встановлення ретроспективного діагнозу захворювання. РІФ не придатна для оцінки результатів лікування, тому що у 85 % пролікованих хворих позитивні результати РІФ зберігаються роками.

Реакція пасивної гемаглютинації (РПГА) для виявлення антитіл до антигенів *T. pallidum*. Принцип реакції полягає в аглютинації еритроцитів, сенсibilізованих трепонемним антигеном у присутності специфічних протитрепонемних антитіл у досліджуваній сироватці. Формалінізовані еритроцити барана або птиць, оброблені таніном, сенсibilізують ультразвуком антигеном *T. pallidum* (штам Nichols). Як негативний контроль використовують несенсibilізовані еритроцити, щоб виключити наявність антиеритроцитарних антитіл, які можуть призводити до хибнопозитивних результатів. Постановка РПГА не вимагає спеціального обладнання, за винятком планшета для гемаглютинації. Діагностикуми з використанням більших (ядерних) еритроцитів птахів дають більш чітку картину аглютинації і в більш короткий термін (45 хв).

Кількісний метод постановки РПГА за допомогою дворазових розведень досліджуваної сироватки дозволяє оцінити концентрацію специфічних трепонемних антитіл у крові. РПГА зазвичай стає позитивною через 3 тиж після появи твердого шанкру. Це дещо пізніше порівняно з РІФ при первинному сифілісі. Порівняльні дослідження сироваток від хворих із різними формами сифілісу в РІТ, РЗК, РІФ, РПГА виявили велику чутливість РПГА порівняно з РІТ і РЗК. РПГА залишається позитивною у пацієнтів, які перенесли сифіліс, протягом багатьох років. Порівняння двох стандартних трепонемних тестів РІФ і РПГА свідчить про те, що РПГА дає меншу кількість хибнопозитивних результатів серед здорового населення (менше 1 %). Хибнопозитивні результати можуть спостерігатися у хворих з інфекційним мононуклеозом, у наркоманів, при колагенозах,

лепрі та інших захворюваннях, що необхідно враховувати при диференційній діагностиці. Залежно від стадії сифілісу чутливість РПГА становить: при первинному сифілісі 76 %, при вторинному – 100 %, при прихованому – 97 %, при пізньому – 94 %. Специфічність РПГА оцінюють вище, ніж специфічність РІФ: вона становить 99 %.

**Твердофазний імуоферментний аналіз (ІФА)** на антитіла проти антигенів *T. pallidum*. Принцип методу полягає у виявленні сорбованого на твердій фазі (поверхня лунок пластикового планшета) специфічного комплексу антиген–антитіло антиглобуліновими антитілами, міченими ферментом (пероксидазою), у кольоровій реакції з субстратом і кількісній оцінці результатів при спектрофотометрії.

У лунки мікропланшетів, сенсибілізовані антигенами мікроба, поміщають досліджувану сироватку та інкубують. За наявності специфічних трепонемних антитіл вони зв'язуються антигенами, утворюючи комплекс антиген–антитіло, що залишається на полістиролі після відмивання імуноглобулінів, що не зв'язалися. Реєстрацію реакції здійснюють за допомогою антитіл до імуноглобулінів людини, найчастіше анти-IgG і анти-IgM, мічених пероксидазою (кон'югат). Після приєднання кон'югата до комплексу антиген–антитіло і відмивання незв'язаного кон'югата в лунки додають субстрат для ферменту (при пероксидазі – розчин перекису водню), що містить будь-який хромоген – хімічну сполуку. У процесі окислення атомарним киснем, що виділяється при ферментативному розщепленні перекису водню, воно дає забарвлені продукти, концентрацію яких можна виміряти спектрофотометрично. Найчастіше як хромоген використовують ортофенілєндіамін (ОФД) або тетраметилбензидин (ТМД).

*У пастковому ІФА* (використовується для виявлення антитіл класу IgM до антигенів *T. pallidum*) на поверхні лунок планшета сорбовані очищені антитіла до імуноглобулінів людини класу IgM. У результаті інкубації досліджуваної сироватки всі IgM зв'язуються з носієм. Наявність серед зв'язаних IgM специфічних для антигенів *T. pallidum* виявляється за допомогою антигенів *T. pallidum*, кон'югованих з ферментом.

Чутливість різних варіантів ІФА становить 98–100 %, а специфічність – 96–100 %.

Основні переваги ІФА полягають у високій чутливості й специфічності методу; автоматизації постановки реакції; високому ступені стандартизації; можливості дослідження великої кількості зразків сироваток; у кількісному обліку та об'єктивній документації отриманих результатів; можливості одночасного визначення титру протитрепонемних антитіл різних класів (IgG і IgM) в одному зразку; придатності для ранньої діагностики сифілісу та діагностики вродженого сифілісу; у зручності застосування для тестування крові в службі переливання крові; можливості застосування як підтверджуючого специфічного трепонемного тесту.

До недоліків ІФА можна віднести можливість отримання неспецифічних результатів при виявленні антитрепонемних антитіл класу IgM у разі використання звичайних, а не пасткових варіантів ІФА. Реакція не

підходить для дослідження одиничних зразків; метод дорогий, потребує оснащення лабораторії спеціальним устаткуванням; отримання результату в ІФА більш тривале.

**Підтверджуючі імунологічні тести** на антитіла проти антигенів *T. pallidum*. При використанні високочутливих методів ІФА не завжди можливо виключити хибнопозитивні результати, використовуючи менш чутливі тести, що працюють на інших принципах.

**Лінійний імуоферментний аналіз (LIA).** Принцип методу: на нітроцелюлозну смужку наносять окремі смуги очищених антигенів. Реакція спостерігається у вигляді окремих забарвлених смуг (від 1 до 3). Метод є напівкількісним. Нанесені в контрольній зоні смуги з різною концентрацією імуноглобулінів людини дозволяють оцінити ступінь інтенсивності забарвлення смуг до окремих антигенів від  $-$ ,  $\pm$  до  $+4$  з чутливістю 99,6 % і специфічністю 99,5 %. У даний час це єдиний у світі тест, що серійно виробляється та підтверджує сифіліс.

**Молекулярно-біологічні методи** діагностики сифілісу (ПЛР). Метод заснований на принципі природної реплікації ДНК, що включає розплітання подвійної спіралі ДНК, розходження ниток ДНК, і комплементарній побудові подвійного ланцюга ДНК. Реплікація ДНК починається не в довільних точках, а в певних стартових блоках – коротких двониткових ділянках. Суть методу полягає в тому, що, маркувавши такими блоками специфічну тільки для даного мікроорганізму ділянку ДНК (консервативний фрагмент), можна неодноразово відтворити (ампліфікувати) цю ділянку. Для здійснення процесу в лабораторних умовах використовують специфічні олігонуклеотидні послідовності, названі праймерами (як затравка синтезу специфічного фрагменту). При внесенні в досліджувану пробу виділеної ДНК праймери приєднуються тільки до комплементарних ділянок, після чого починається реплікація ДНК за допомогою термостабільного ферменту Taq-ДНК-полімерази. Синтезовані нитки ДНК служать як матриця для синтезу в новому циклі. Це і є ПЛР. Кількість копій фрагменту збільшується в геометричній прогресії. Через 25 циклів ампліфікації синтезується 106 копій специфічного обраного фрагменту. Для отримання такої кількості специфічних фрагментів ДНК зазвичай достатньо 30–40 циклів ампліфікації, щоб виявити їх у вигляді окремої смуги після електрофорезу в агарозному гелі. Теоретично в зразку можна виявити навіть одну копію геному. ПЛР-тести для детекції *T. pallidum* дозволяють виявити в досліджуваних зразках еквівалент, що дорівнює 65 мікроорганізмам. Зразки для дослідження в ПЛР-тесті: матеріал з поверхні ерозивних або виразкових елементів, амніотична рідина, неонатальна сироватка, цереброспінальна рідина та ін.

**Схема діагностики сифілісу.** При наявності у пацієнта характерного ураження шкіри і слизових оболонок, а також вказівки в анамнезі на контакт проводять мікроскопічне дослідження в темному полі серозних виділень із місця ураження, і при позитивному результаті негайно призначають лікування.

За відсутності характерних уражень шкіри і слизових оболонок і при негативному результаті мікроскопічного дослідження в темному полі проводять дослідження плазми або сироватки крові пацієнта в нетрепонемних тестах. Зазвичай це швидкий плазмореагінний тест RPR-тест, що виконується за 8 хв на картках. При позитивному результаті скринінгового тесту визначають титр реагінних антитіл (із метою контролю ефективності терапії і серонегативації в процесі лікування) і ставлять трепонемний тест (найчастіше РПГА). Негативний результат свідчить про хибно-позитивну реакцію. Слід додатково розібратися в клінічних проявах. Позитивний результат трепонемного тесту дозволяє поставити серологічний діагноз сифілісу і призначити антибіотикотерапію. Після проведеного курсу антибіотикотерапії та зникнення клінічних проявів сифілісу через 3–4 міс призначають контроль плазми або сироватки крові в нетрепонемних тестах у кількісному варіанті з дворазовими розведеннями сироватки. Зниження титру реагінних антитіл принаймні в 4 рази свідчить про ефективність проведеного курсу лікування.

**Алгоритм:** *«Мікроскопічне дослідження в темному полі».*

Рідину відбирають бактеріологічною петлею і вносять у краплю ізотонічного розчину на предметному склі, накривають покривним склом, яке щільно притискають до предметного. Так отримують препарат «роздавлена крапля». Мікроскопію проводять негайно у темному полі (підсилення препарату може призвести до втрати збудником сифілісу характерної рухливості). Бліда трепонема в темному полі зору має вигляд тендітної сріблястої з рівномірними завитками спіралі з характерними видами рухливості (згинальний, поступальний, обертальний, хвилеподібний, судомний), що відрізняє її від сапрофітних трепонем (*T. dentinum*, *T. buccalis*, *T. perfringens*). За зовнішнім виглядом і типом рухливості роблять висновок про виявлення блідої трепонеми.

Можна зробити мазок та зафарбувати за методом Романовського–Гімзи. У препараті видно блідо-рожеву спірохету.

**Алгоритм:** *«Постановка реакції пасивної гемаглютинації».*

У дві лунки мікропланшетів вносять по 25 мкл досліджуваної сироватки, розведеної в співвідношенні 1:20 буфером, що міститься у наборі, потім додають по 1 краплі (75 мкл) з фіксованої крапельниці на флаконі тест-еритроцитів, сенсibilізованих трепонемним антигеном, в одну лунку і контрольних несенсibilізованих еритроцитів в іншу лунку. Планшет злегка похитують і залишають при кімнатній температурі на 45 хв. Результат реакції враховують через 45–60–120 хв візуально.

При позитивному результаті еритроцити рівномірно вистилають всю поверхню лунки у вигляді парасольки. При меншій концентрації антитіл частина еритроцитів зісковзує до центру лунки. Слабкопозитивна реакція характеризується утворенням плівки еритроцитів на частині поверхні лунки і скупченням значної кількості еритроцитів у центрі на дні лунки (часто у формі кільця або «гудзика» з центральним просвітом). При негативному результаті еритроцити утворюють щільний осад («гудзичок») на дні лунки.

**Алгоритм:** «Постановка реакції іммобілізації трепонем (РІТ)».

РІТ ґрунтується на феномені втрати рухливості блідими трепонемами за наявності сироватки крові хворого і комплементу в анаеробних умовах. Для постановки РІТ використовують трепонеми, вирощені в ячках кроликів. Кров у хворого беруть натще із ліктьової вени, відділяють сироватку й інактивують її (прогрівають при 56 °С протягом 30 хв, при цьому руйнується комплемент, а імуноглобулінова фракція крові, тобто антитіла, стабілізується). Перед проведенням серологічного дослідження вживання лікарських препаратів відмінюють за 3–4 тиж.

У пробірку вносять 1,7 см<sup>3</sup> зависі тканинних трепонем, додавають 0,2 см<sup>3</sup> сироватки крові, що досліджується, і 0,1 см<sup>3</sup> свіжого комплементу (сироватки крові морської свинки). Паралельно ставлять контрольні реакції. Під мікроскопом у препаратах «роздавлена крапля» враховують кількість рухливих трепонем у краплі з контрольної пробірки та краплі з дослідної пробірки. Результати реакції вважають позитивними, якщо відсоток іммобілізації перевищує 50 %, слабопозитивними – 30–50 %, негативними – нижче 20%.

**Алгоритм:** «Постановка мікрореакції преципітації (МРП)».

МРП із кардіоліпіновим антигеном використовують для профілактичного масового обстеження на сифіліс і для діагностики. Використовують два варіанти мікрореакції: якісний і кількісний.

Якісний варіант частіше застосовують під час профілактичного обстеження. Для отримання плазми у пацієнта беруть кров із пальця капіляром апарата Панченкова, змоченим 5 % розчином натрію цитрату (для запобігання згортанню крові), і вносять її у пробірку Вассермана, в якій міститься декілька крапель розчину натрію цитрату. Кров відстоюють або центрифугують для отримання плазми. Паралельно ставлять реакції з плазмою і сироваткою крові хворого. Для отримання сироватки кров беруть із вени, отримують сироватку та інактивують її. Паралельно ставлять контрольну реакцію з позитивною сироваткою.

Мікрореакцію ставлять у лунках полістиролового планшету. У лунки вносять по 3 краплі плазми або сироватки крові, що досліджується, додають по 1 краплі емульсії кардіоліпінового антигену і струшують протягом 5 хв. Потім до кожної лунки додають по 3 краплі ізотонічного розчину натрію хлориду, змішують інгредієнти погойдуванням пластин і залишають при кімнатній температурі на 5 хв (оптимальною є температура 23–28 °С). Результати враховують після появи пластівців у контрольній позитивній сироватці крові, але не пізніше ніж через 7–10 хв після змішування всіх інгредієнтів. У лунках із плазмою і сироваткою крові осідають різні за розміром пластівці. Появу великих пластівців розцінюють як позитивний результат (++++, +++), середньої величини і дрібних – як слабопозитивний (++, +).

Кількісний варіант мікрореакції дає змогу, не подовжуючи часу (15–30 хв), об'єктивніше оцінити стан пацієнтів (визначити кількість антитіл) і використати його як критерій оцінки в динаміці лікування хворих на сифіліс. Для цього сироватку або плазму крові пацієнта розводять

у співвідношеннях від 1:2 до 1:64. Облік результатів проводять за тим самим принципом. Титром сироватки або плазми вважається розведення, у якому результат має оцінку "+".

**Алгоритм:** «Постановка реакції зв'язування комплементу».

РЗК (реакція Вассермана, РВ, або RW). Для постановки реакції використовують такі інгредієнти: сироватка крові хворого, антиген трепонемний ультраозвучений, антиген кардіоліпіновий, ізотонічний розчин натрію хлориду, комплемент, гемолітична система (суміш гемолітичної сироватки й еритроцитів барана).

Взяття крові проводять натще або не раніше ніж через 6 год після споживання їжі. Не можна брати кров у хворих із підвищеною температурою тіла, після недавно перенесеної інфекційної хвороби, у жінок під час менструації, у вагітних в останні 10 днів, у породіль у перші 10 днів після пологів, у немовлят у перші 10 днів життя, у разі вживання спиртних напоїв раніше ніж через 24 год.

Кров відбирають з ліктьової вени у кількості 8–10 см<sup>3</sup> у суху стерильну пробірку, у немовлят кров відбирають із п'ятки. До лабораторії вона має бути доставлена не пізніше ніж через 24 год за умови зберігання її у холодильнику при 4 °С. Відстояну сироватку переносять в іншу стерильну пробірку й інактивують. Інактивовані сироватки можуть зберігатися у морозильній камері холодильника протягом 5–6 діб, активні сироватки – 30 діб (повторне розморожування і заморожування не допускається).

РВ ставлять з двома антигенами: ультраозвученим трепонемним і кардіоліпіновим.

**Алгоритм проведення реакції Вассермана:**

- у штатив ставлять 3 пробірки Вассермана;
- маркують пробірки: на першій зазначають номер аналізу і цифру 1, на другій – 2, на третій – 3 (контроль);
- в усі пробірки вносять по 0,25 см<sup>3</sup> досліджуваної сироватки;
- у першу пробірку добавляють 0,25 см<sup>3</sup> антигену трепонемного, у другу – 0,25 см<sup>3</sup> антигену кардіоліпінового, у третю – 0,25 см<sup>3</sup> ізотонічного розчину натрію хлориду;
- пробірки струшують, витримують їх 10 хв при кімнатній температурі;
- в усі пробірки добавляють по 0,25 см<sup>3</sup> комплементу;
- пробірки струшують і ставлять у термостат при 37 °С на 45–60 хв;
- в усі пробірки добавляють по 0,5 см<sup>3</sup> гемолітичної системи;
- пробірки струшують, ставлять їх у термостат на 45–60 хв при 37 °С (до настання гемолізу у контрольній пробірці).

Облік результатів реакції: еритроцити осіли на дно, рідина безбарвна або злегка рожева – реакція позитивна; осад незначний або осаду немає, рідина інтенсивно забарвлена – реакція негативна.

**Термінологія.** Treponemataceae, Treponema pallidum, T.denticola, T. macrodenticum, T. orale, T. vincentii, Treponema pallidum; підвиди: pallidum, endemicum, pertenue, carateum.



### **Запитання для контролю знань**

1. Загальна характеристика збудників спірохетозів. Класифікація патогенних спірохет, їх значення в патології людини.
2. Трепонеми. Морфологія і біологічні властивості блідої трепонеми. Антигенна структура. Стійкість до чинників навколишнього середовища.
3. Патогенез, клінічні прояви, імунітет при сифілісі.
4. Правила відбору матеріалу при підозрі на сифіліс. Транспортування його до лабораторії. Лабораторна діагностика сифілісу. Серодіагностика захворювання.
5. Принципи профілактики та лікування при сифілісі.

### **Тестові завдання**

1. При проведенні серодіагностики сифілісу інкубували трепонеми з сироваткою пацієнта в анаеробних умовах, після чого бактерії втратили рухливість. Яка реакція була поставлена і що вона означає?  
*A. Реакція Вассермана, пацієнт хворий на сифіліс.*  
*B. Реакція Вассермана, пацієнт в інкубаційному періоді.*  
*C. Реакція іммобілізації трепонем, пацієнт хворий на сифіліс.*  
*D. Реакція непрямой імунофлюоресценції, пацієнт хворий на сифіліс.*  
*E. Реакція іммобілізації трепонем, пацієнт колись переніс сифіліс.*
2. При обстеженні хворого з папульозно-розеолезним висипом на тулубі та кінцівках був уставлений діагноз «сифіліс». Яким методом лабораторної діагностики цей діагноз може бути підтверджений?  
*A. Алергічним.* *C. Бактеріологічним.* *E. Серологічним.*  
*B. Біологічним.* *D. Бактеріоскопічним.*
3. Лаборант приготувала мікропрепарат з патогенного матеріалу від хворого сифілісом. Протягом якого часу забарвлюється препарат за Романовським–Гімзою?  
*A. 30 с.* *B. 2 хв.* *C. 3 хв.* *D. 5 хв.* *E. 60 хв.*
4. У хворого з підозрою на первинний сифіліс був узятий зскрібок зі слизової ротової порожнини. При мікроскопії мазка, пофарбованого за методом Романовського–Гімзи, були виявлені покручені бактерії фіолетового кольору. Який із зазначених нижче висновків є вірним?  
*A. У пацієнта виявлена T. pallidum.*  
*B. У пацієнта виявлені атипові форми T. pallidum.*  
*C. У пацієнта виявлені непатогенні трепонеми.*  
*D. Був обраний неправильний метод забарвлення.*  
*E. –.*
5. У пацієнта з підозрою на сифіліс була поставлена реакція мікропреципітації. Позитивною реакція вважається при утворенні:  
*A. Кільця на межі двох середовищ.*  
*B. Вусиків преципітації.*  
*C. Пластівців.*  
*D. Гемолізу.*  
*E. Осаду у вигляді перевернутої парасольки.*

## **Тема: Лабораторна діагностика лептоспірозу**

**Кількість годин: 2**

**Обґрунтування теми.** Під *Leptospira* об'єднує два види: *L. interrogans* і *L. biflexa*. Патогенним для людей і тварин є *L. interrogans*. Захворювання називається лептоспірозом. Лептоспіроз поширений практично в усіх країнах світу. У багатьох країнах виражена тенденція до зростання захворюваності (Ізраїль, Литва, Росія, а також в Україні). Рівень захворюваності серед людей найбільш високий у країнах Латинської Америки, Азії та Африки. Це може бути пов'язано з кліматогеографічними умовами, санітарною культурою і технічною оснащеністю процесів землеробства.

В Україні лептоспіроз є найбільш значущою зоонозною інфекцією з широко розповсюдженими природними та антропоургічними вогнищами, які становлять постійну небезпеку для здоров'я людей. В Україні в етіологічній структурі лептоспірозу превалюють лептоспіри 5 серогруп: *Icterohaemorrhagiae*, *Grippotyphosa*, *Pomona*, *Canicola*, *Hebdomadis*. Найбільшу (67,8–75,3 %) питому вагу мають лептоспіри серогрупи *Icterohaemorrhagiae*, які спричиняють важкі форми захворювання з високою летальністю. Природні осередки лептоспірозу в Україні поширені у певних ландшафтних зонах – це полісся і лісостепова зона. Досить великі спалахи лептоспірозу в Україні спостерігаються у південних і західних областях.

Захворюваність на лептоспіроз на сучасному етапі має спорадичний характер, але в окремі роки відзначаються групові захворювання і невеликі спалахи інфекції.

Збудник лептоспірозу вперше був описаний і вивчений Р. Інадо й У. Ідо в 1915 р. і названий *Leptospira icterohaemorrhagiae*. Пізніше були відкриті й інші серологічні варіанти лептоспір.

### **Мета:**

*Загальна:* оволодіти мікробіологічною діагностикою лептоспірозу.

*Конкретна:*

а) знати правила безпеки при роботі з біологічним матеріалом (Державні санітарні правила – ДСП 9.9.5.03599).

б) вміти:

1. Підготувати робоче місце лаборанта.
2. Дотримуватися правил роботи і техніки безпеки з інфікованим матеріалом, культурами мікроорганізмів, апаратурою.
3. Відбирати та транспортувати матеріал для дослідження при підозрі на лептоспіроз.
4. Готувати матеріал, який надійшов від хворого з підозрою на лептоспіроз.
5. Досліджувати матеріал за допомогою методів, призначених для виявлення лептоспір.
6. Давати оцінку результатів дослідження та заповнювати відповідну лабораторну документацію.

**Матеріальне та методичне забезпечення теми:** музейні мікро-препарати, бланки направлень, бікс, барвник Романовського-Гімзи, мікроскоп, імерсійне масло, дезінфікуючий розчин, таблиці, атлас.

### **Зміст заняття**

#### **Таксономія.**

*Сімейство:* Leptospiraceae.

*Рід:* Leptospira.

*Вид:* L. interrogans і L. biflexa.

*Серовари:* L. icterohaemorrhagiae, L. grippotyphosa, L. pomona і L. canicola.

**Морфологічні та тинкторіальні властивості.** Лептоспіри мають вигляд туго закрученого канату, що складається з 12–18 завитків I порядку. Навколо протоплазматичного циліндру розміщено 2 або більше периплазматичних джгутики, завдяки їх скороченню утворюються вторинні завитки у вигляді крючків, а клітина лептоспір набуває C- і S-подібної форми. Середня довжина лептоспір – від 7 до 15 мкм. Лептоспіри дуже рухливі, їм притаманні всі види рухливості, що характерні для спірохет. Грамнегативні. За Романовським-Гімзою забарвлюються у блідо-рожевий колір. Легко імпрегнуються (від *лат. impraegnatio* – просякати) сріблом і набувають коричневого або чорного кольору. Лептоспіри не утворюють спор і капсул.

**Культуральні властивості.** Лептоспіри – хемоорганотрофи, аероби, мікроаерофіли, але легко культивуються в аеробних умовах в рідких поживних середовищах, що містять 5–10 % кролячої сироватки, при рН 7,1–7,4 (наприклад, середовище Ферворта–Вольфа), напіврідких, щільних поживних середовищах. Оптимальною температурою росту є 28–30 °С. Ростуть порівняно повільно – 5–8 діб, інколи 21–25 діб. У культурах виявляються клубки із лептоспір. Рідке середовище залишається прозорим або у разі пишного росту виникає легка опалесценція – кільце в декількох сантиметрах від поверхні. У напіврідких середовищах виявляються круглі колонії діаметром 1–3 мм. На щільних середовищах ріст відмічається під поверхнею агарового шару (вростання в глиб щільного середовища, часто до дна чашки Петрі).

В лабораторних умовах патогенні лептоспіри швидко втрачають вірулентність.

**Ферментативні властивості.** У лептоспір виявлені ліпази, що ферментують високомолекулярні жирні кислоти. Каталазо- і оксидазопозитивні.

**Антигенні властивості.** Антигенна структура лептоспір неоднорідна. Патогенні лептоспіри мають один білковий антиген, на основі якого вони об'єднані в один вид – L. interrogans. Враховуючи групові й типові антигени (поверхневий антиген ліпополісахаридної природи, що виявляється в реакції аглютинації), лептоспіри поділяють на 25 серогруп, до яких входять більше ніж 200 сероваріантів, кожен з яких має свою назву. Лептоспіроз в Україні спричиняють лептоспіри серогруп L. icterohaemorrhagiae, L. grippotyphosa, L. pomona і L. canicola.

**Резистентність.** Лептоспіри малостійкі в навколишньому середовищі. Вони можуть існувати в природі тільки у воді або вологому ґрунті. У прісноводних водоймах вони виживають до 30 діб, у заболоченому ґрунті –

до 280 діб, у сухому – 2–3 год. На овочах, фруктах, у харчових продуктах вони здатні зберігатися від декількох годин до декількох діб. Краще зберігаються у вологому середовищі при рН 7,0–7,4 і низькій температурі. Не втрачають життєздатності під час заморожування. Лептоспіри миттєво гинуть під час кип'ятіння, під дією ультрафіолетового опромінення, дезінфекційних засобів (активний хлор у дозі 0,3–0,8 мг/дм<sup>3</sup> вбиває через 2 год). Миттєво інактивуються в кислому і лужному середовищі. Згубну дію на них чинять антибіотики групи пеніциліну, тетрацикліну, стрептоміцин.

**Фактори патогенності.** Ендотоксин – основний фактор патогенності. Він спричинює загальну інтоксикацію, підвищує проникність судин, руйнує ендотелій, спричинює крововиливи в тканини. Деякі серовари характеризуються гемолітичною і ліпазною активністю, продукують плазмокоагулазу, фібринолізин, гіалуронідазу, уреазу, цитотоксини.

**Епідеміологія.** Лептоспіроз – зоонозна природно-осередкова інфекція. В Україні виявлено природні осередки лептоспірозу на території понад 200 районів 25 областей. Джерелом інфекції у природних осередках є гризуни, парнокопитні, хижаки, деякі птахи. Найбільше значення мають миші, ондатри, велика і мала рогата худоба. В Україні основним джерелом інфекції є сірі щури та полівки.

У тварин лептоспіроз зазвичай має безсимптомний перебіг, але лептоспіри протягом тривалого часу (декілька місяців) виділяються із сечею.

Основним шляхом передачі для людини є водний (97 % в Україні). Зараження людей відбувається під час купання (через пошкоджену шкіру або слизові оболонки), у разі використання у побуті води з відкритих водойм, під час ловлі риби, полювання на ондатру, косовиці сирих луків, збирання сіна. У воду та харчові продукти збудник потрапляє з інфікованою сечею тварин-лептоспіроносіїв. Можливий контактний-побутовий та аліментарний шлях передачі. Випадки професійного зараження трапляються у рибалок, працівників м'ясокомбінатів, скотарів, механізаторів, пастухів, доярок, ветеринарів та ін. У різні роки таких випадків в Україні було зареєстровано від 20 до 70.

**Патогенез і клінічна картина.** В організм людини лептоспіри проникають через слизові оболонки носа, рота, очей, стравоходу (але не шлунка, де вони найчастіше гинуть), а також через мікротравми на шкірі. Спершу лептоспіри проникають у лімфу, але лімфаденіт зазвичай не спричинюють. З лімфи проникають у кров (через 5–60 хв з моменту ураження) і зумовлюють лептоспіремію, тобто генералізовану інфекцію. Вона триває 4–5 діб і супроводжується накопиченням збудника в органах ретикулоендотеліальної системи (нирках, печінці, селезінці). Проходячи через гематоенцефалічний бар'єр, лептоспіри потрапляють у центральну нервову систему (на 7–15-у добу хвороби). У тканинах цих органів вони розмножуються. Лептоспіри спричиняють механічне ушкодження клітин внутрішніх органів (печінки, ниркових каналців тощо), що призводить до порушення

їх функцій. Ушкодження ендотелію кровоносних судин призводить до численних крововиливів і масивного гемолізу. Продукти метаболізму й ендотоксин спричиняють загальну інтоксикацію. Масивні крововиливи, прогресуюча тромбоцитопенія можуть спричинити синдром внутрішньосудинного згортання крові. На початку другого тижня збудник депонується переважно у звивистих каналцях нирок та зникає з крові та інших тканин. Вибірча концентрація в епітелії і міжклітинному просторі призводить до важких пошкоджень ниркових каналців і порушення сечоутворення, у важких випадках викликає анурію і уремію. Після одужання лептоспіри тривало зберігаються в нирках і виділяються з сечею (до 40-го дня захворювання). Менінгеальні явища, які часто спостерігаються при лептоспірозі, пов'язані з безпосередньою дією мікроорганізмів і продуктів їх розпаду на ЦНС. У лікворі лептоспіри регулярно виявляють з 7-ї по 15-у добу хвороби. Захворювання протікає гостро, з явищами хвилеподібної лихоманки, інтоксикації, з жовтяницею, розвитком ниркової недостатності, асептичного менінгіту. Летальність – від 3 до 25–48 %.

Інкубаційний період триває від 2 до 19 діб. Клінічні прояви можуть бути різноманітними: від безсимптомних до тяжких. У перші дні хвороби лептоспіроз часто нагадує гостру респіраторну інфекцію: озноб, висока температура тіла, головний біль, біль у суглобах і м'язах, гіперемія склер та лица.

Розрізняють дві форми лептоспірозу: безжовтушну і жовтушну (хвороба Васильєва–Вейля). Жовтушну форму спричинює *L. interrogans icterohaemorrhagiae*, це найбільш злочи́сна форма, при якій летальність може досягати 35 %. Найчастіше хвороба починається гостро, температура тіла підвищується до 38–40 °C; обличчя гіперемоване, виявляється почервоніння склер, кон'юнктивіт; можливі нудота, блювання (часто з кров'ю), біль у животі, сильний головний біль, безсоння, марення, непритомність. Раннім типовим симптомом є біль у м'язах, особливо у литкових; навіть під час легкої пальпації виникає нестерпний біль, хворим важко триматися на ногах. На 3–5-у добу на кінцівках і тулубі можуть з'явитися висипання, як при кору, з 2–4-ї доби можуть збільшуватися печінка, селезінка, виникає жовтяниця. У разі тяжкого ураження нирок проявляється гематурія, зменшення сечовиділення до анурії. Можуть бути кровотеча з носу, кровохаркання, кашель.

Гарячковий стан триває 1 тиждень, але можливе повторне підвищення температури тіла ще на 3–4 дні. У разі своєчасного ефективного лікування хвороба триває 3–4 тиж, за наявності рецидивів може затягнутися на 2–3 міс. Ниркова (при безжовтушній формі) або ниркова і печінкова (при жовтушній) недостатність можуть бути причиною летального наслідку.

Менінгеальні симптоми з'являються в кінці 1-го тижня і значно обтяжують перебіг хвороби. Їх розвиток пов'язують з інфікуванням лептоспірами серовара ротона, рідше з іншими сероварами.

Прогноз при лептоспірозі в цілому сприятливий. Летальність при безжовтушних формах становить 0,56–1 %. При тяжкому перебігу з вира-

женим геморагічним синдромом, жовтяницею, ураженням нирок або ЦНС летальність досягає 10–48 % в результаті гострої ниркової недостатності (ГНН), інфекційно-токсичного шоку.

Можливе і безсимптомне носійство, за якого збудник постійно виділяється із сечею.

**Імунітет.** Після перенесеної лептоспірознаї інфекції формується гуморальний типоспецифічний тривалий, стійкий імунітет.

**Мікробіологічна діагностика.** Дослідження на лептоспіроз проводять у лабораторіях особливо небезпечних інфекцій або інших бактеріологічних лабораторіях, що мають дозвіл на право роботи з патогенними мікробами III–IV груп патогенності.

На аналіз відбирають: на початку захворювання – кров із метою виявлення збудника, у разі менінгеальних проявів – спинномозкову рідину, з 10–12-го дня хвороби – сечу.

Для діагностики лептоспірозу використовують *мікроскопічний* (виявлення лептоспір у темному полі мікроскопа), *бактеріологічний, серологічний* (РА, РСК), *біологічний, молекулярно-генетичний* (ПЛР) методи.

Для виявлення лептоспір у воді відкритих водойм також застосовують біологічний метод: "купають" у підігрійтій воді, що підлягає дослідженню, завчасно скарифікованих морських свинок, потім засівають їх кров, відібрану з серця, на поживні середовища з метою виділення культури лептоспір.

Мікроскопія ефективна тільки у перші дні захворювання. Матеріал досліджують у темному полі або проводять мікроскопію мазків, забарвлених за Романовським–Гімзою. Кількість лептоспір у мазку крові невелика і ефективність мікроскопії не перевищує 10 %. Кращий результат дає попереднє центрифугування.

Виділення збудника з крові проводять в перші 2–4 дні на середовищі Ферворта-Вольфа. Посіви інкубують в анаеробних умовах (пробірки заливають рідким парафіном) при 28–30 °С. Бактерії ідентифікують за допомогою типових аглютинуючих сироваток.

Парні сироватки досліджують на 2–3-й тиждень захворювання. Сироваткові антитіла визначають у реакції мікроаглютинації і лізису з сироваткою пацієнта і стандартним набором мікроорганізмів. При позитивному результаті можна бачити клубки лептоспір (специфічна реакція з титром не менш 1:400) або утворення зернистого осаду бактерій. Використовують також РЗК, РПГА. Для виявлення наростаючого титру антитіл дослідження необхідно повторити через 3–7 днів.

Біологічну пробу проводять на хом'ячках або кроликах. Кров або сечу хворого вводять внутрішньоочередно. Через 48–72 год проводять мікроскопію черевного ексудату і крові. На 10–14-й день тварина гине. При розтині в тканинах виявляють множинні геморагічні вогнища, що містять лептоспіри.

**Профілактика.** Для профілактики лептоспірозу необхідно проводити комплекс медико-санітарних і ветеринарно-санітарних заходів: за-

безпечити захист продуктів харчування від контакту з гризунами, не використовувати для пиття неперевірену воду з відкритих водойм, дотримуватися особистої гігієни, а також проводити ветеринарний нагляд за сільськогосподарськими тваринами, своєчасно знищувати гризунів у природних осередках та на сільськогосподарських і харчових підприємствах, проводити меліоративні роботи тощо.

Людей, хворих на лептоспіроз, госпіталізують, а їх випорожнення знезаражують.

Для специфічної профілактики використовують убиту полівалентну лептоспірознa вакцину за епідеміологічними показниками особам груп ризику (тваринники, ветеринарні працівники, робітники м'ясокомбінатів та ін.).

**Лікування.** Для специфічного лікування використовують гаммаглобулін із крові гіперімунізованих волів. Як етіотропні препарати використовують доксицикліну гідрохлорид і тетрацикліну гідрохлорид.

#### ***Практичні навички з теми***

1. Проведення мікроскопії мазків-препаратів з лептоспірами.
2. Визначення морфотинкторіальних властивостей лептоспір.

#### ***Алгоритми лабораторної роботи***

**Алгоритм:** «Правила забору матеріалу за підозри на лептоспіроз».

**Матеріал для дослідження і способи забору:**

- Кров (з перших днів захворювання). Беруть 5 мл із ліктьової вени стерильним шприцом.
- Сеча (з другого періоду). Відбирають стерильним катетером у стерильний посуд.
- Спинномозкова рідина. Відбирають стерильною голкою у стерильну пробірку.
- Вода, харчові продукти. Відбирають відповідно у стерильний посуд.
- Секційний матеріал (печінка, нирки) для посіву. Беруть проколом органів пастерівською піпеткою з глибини 0,5 см і засівають у пробірки з рідким живильним середовищем.

**Алгоритм:** «Хід мікробіологічного дослідження матеріалу за підозри на лептоспіроз».

Лабораторна діагностика лептоспірозу проводиться з метою виявлення лептоспір або протилептоспірозних антитіл у досліджуваному матеріалі від хворого. Основні методи дослідження: мікроскопічний, бактеріологічний, біологічний, серологічний, ПЛР.

Вибір методу дослідження залежить від стадії хвороби і характеру досліджуваного матеріалу. У перші 1–6 днів від початку хвороби, коли лептоспіри циркулюють у крові, застосовують мікроскопічний, бактеріологічний, біологічний методи і ПЛР.

З кінця 1-го тижня хвороби в крові з'являються протилептоспірознi антитіла, які можуть бути виявлені різними серологічними тестами (РМА,

РЗК, РІГА, ІФА та ін.). Ці методи придатні й для ретроспективної діагностики лептоспірозу.

З 10–16-го дня досліджують сечу і спинномозкову рідину (ЦСР) на присутність лептоспір мікроскопічним, бактеріологічним та біологічним методами, проводять ПЛР.

У період реконвалесценції виділяють уринокультуру.

**Мікроскопічний метод дослідження.** Мікроскопічні дослідження дозволяють виявити лептоспіри безпосередньо в досліджуваному матеріалі: цитратній крові, сечі, спинномозковій рідині, постмортальному матеріалі. Кров, отриману за допомогою пункції вени, змішують з 1,5 % розчином лимонно-кислого натрію у співвідношенні 2:1, відстоюють при кімнатній температурі 2 год. Проводять мікроскопію надосадкової рідини. Сечу попередньо центрифугують 30 хв при 10 000–12 000 об/хв, проводять мікроскопію осаду. Спинномозкову рідину також досліджують після центрифугування в аналогічних умовах. Постмортальний матеріал (шматочки печінки, нирок) розтирають у ступці із стерильним фосфатно-сольовим буферним розчином (ФСБ) або живильним середовищем до отримання гомогенної суміші. Суспензію центрифугують 10 хв при 3000 об/хв або відстоюють при 4 °С 1–2 год. Досліджують надосадкову рідину. Для виявлення лептоспір в органах (печінка, нирки) загиблих від лептоспірозу людей проводять мікроскопічні дослідження гістологічних зрізів, пофарбованих методом сріблення (за Вартином–Стері, за Левадіті). Живі лептоспіри можуть бути виявлені тільки при темнопольній мікроскопії. Для проведення цього досліді готують препарат «роздавлена крапля». На верхню лінзу конденсора мікроскопа наносять краплю дистильованої води, потім на предметний столик поміщають препарат і досліджують при збільшенні 40×10–15. Лептоспіри мають вигляд сріблястих ниток, що знаходяться в постійному русі. Ці спірохети погано забарвлюються аніліновими барвниками. ВООЗ (2003) рекомендує використовувати такі методи: імпрегнацію сріблом, імунопероксидазне фарбування, РІФ з використанням флюоресцентних кролячих або мишачих моноклональних антитіл, методи гібридизації ДНК.

Для мікроскопії використовують кров від початку і до 5-ї доби захворювання, сечу – з 10-ї до 40-ї доби, спинномозкову рідину досліджують у разі появи менінгеальних симптомів з 10-ї до 16-ї доби хвороби, із секційного матеріалу відбирають тканинну рідину з уражених органів (печінки, нирок) піпеткою з глибини 2–5 мм.

Виявити лептоспіри у крові важко, тому із однієї проби крові готують 10–15 препаратів. Бактеріоскопічне дослідження проводять з живими збудниками у темному полі зору у препараті «роздавлена крапля».

**Бактеріологічний метод.** Виділення гемокультури проводять до початку лікування антибіотиками. Кров, отриману за допомогою пункції вени, сечу або центрифугат сечі, спинномозкову рідину по кілька крапель вносять у 3–5 пробірок з живильним середовищем. Виділення уринокультур проводять на середовищах з 5-фторурацилом або антибіотиками. Викорис-



товують посуд із нейтрального скла. Культури вирощують при температурі 28–30 °C. При розмноженні лептоспир живильне середовище залишається прозорим протягом усього спостереження. При струшуванні пробірок можна виявити опалесцентні «муарові» хвилі, утворені культурою, що росте. Контроль проводять, використовуючи мікроскопію через кожні 5 днів. Якщо протягом 3 міс лептоспіри не виявлені, результат вважається негативним. Слід підкреслити, що виділення гемокультури є найбільш надійним методом виявлення лептоспир, що дає позитивні результати більше ніж у 80% випадків. Отримані культури лептоспир клонують на щільних поживних середовищах з наступним виділенням чистої культури. Ідентифікацію, видову і штамову диференціацію лептоспир проводять за схемою. Для диференціації патогенних і сапрофітних видів застосовують такі тести:

- вивчення патогенності в біологічних тестах (на лабораторних тваринах, у культурах клітин);
- ріст у присутності 8-азагуаніна в концентрації 225 мкг/мл;
- ріст при 13 °C;
- конверсія у сферичні форми в 1 М розчині хлориду натрію (NaCl) протягом 2 год при 20–30 °C;
- ріст у присутності  $\text{NaHCO}_3$  (бікарбонатний тест);
- ІФА з моноклональними антитілами F9-4, які взаємодіють з антигенами тільки патогенних лептоспир;
- вивчення відсотка гомології ДНК;
- вивчення ферментативної активності: гемолітичної по відношенню до еритроцитів тварин різних видів, фосфоліпазну, ДНКазну, естеразну.

Відомості про ферментативну активність можуть бути використані й для характеристики виділених штамів.

*Гемолітичну активність* лептоспир на щільних поживних середовищах вивчають методом «лунок» або агарових шарів. При використанні методу «лунок» у чашки Петрі розливають по 20 мл живильного середовища з 2,5 % відмитих еритроцитів тварин, 1 % агару, 0,85 % розчину натрію хлориду і забуферену дистильовану воду до 100 мл. Пробойником роблять лунки діаметром 8 мм у застиглому живильному середовищі й заповнюють їх чистою культурою лептоспир у рідкому середовищі зі вмістом клітин  $(2-3) \times 10^8$  в 1 мл. Як контроль в одну з лунок вносять рідке живильне середовище без лептоспир.

Метод агарових шарів полягає в наступному: лептоспіри культивують на середовищі БСА до досягнення колоніями другого періоду розвитку (утворення чіткого обідка по периферії). Потім колонії, що утворилися, заливають другим шаром середовища, до складу якого входять 3 % відмитих еритроцитів тварин, 1,7 % розчину натрію хлориду, 1 % агару і 94,3 % забуференої дистильованої води. Кількість середовища в 1-му та 2-му шарах має бути однаковою (по 20 мл).

Чашки Петрі з залитими лунками і колоніями інкубують при 28 °С. Спостереження за появою зон гемолізу еритроцитів проводять протягом 10 днів. Ступінь гемолітичної активності визначають за шириною зон гемолізу навколо лунок із культурами лептоспир або колоній.

*Фосфоліпазну активність* лептоспир виявляють на щільному живильному середовищі БСА, що містить 1 % L-лецитину. Інкубують так само, як описано вище. Фосфоліпазну активність визначають за шириною зон зміни середовища навколо колоній. Сапрофітні лептоспири дають 2 зони зміни середовища: прозору, безпосередньо навколо колоній (дія фосфоліпази А) і наступну за нею каламутну, непрозору зону, обумовлену дією фосфоліпази С. Патогенні лептоспири утворюють тільки прозору зону, ширина якої більше у вірулентних штамів.

*Естеразну активність* лептоспир визначають за їх здатністю спричиняти гідроліз твіну-80, 60, 40 або 20, що є похідними поліоксіетиленсорбітану, гідроксильна група якого заміщена залишком жирної кислоти (моноолеїнової, моностеаринової, монопальмітинової або монолауринової відповідно). Дослідження проводять методом «лунок» на щільних поживних середовищах наступного складу: NaCl – 0,5 г,  $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$  – 0,02 г, агар – 1 г, твін-80, 60, 40 або 20 – 1 мл, дистильована вода до 100 мл. Естеразну активність і її ступінь визначають за появою зон зміни середовища та їх ширини навколо лунок з культурами лептоспир на 6–7-й день інкубації в термостаті при 28 °С.

*ДНКазну активність* лептоспир визначають на щільних поживних середовищах методом «лунок». Як субстрат може бути використана ДНК із еритроцитів курчат або з тимуса великої рогатої худоби. ДНК попередньо розчиняють у дистильованій воді, підлуженій 1N розчином NaOH. У МПА вносять ДНК з розрахунку 2 мг на 1 мл середовища. Стерилізують 20 хв при 0,5 атм в автоклаві. У розплавлене середовище перед розливом у чашки Петрі додають хлорид кальцію з розрахунку 0,8 мг на 1 мл середовища. Роблять лунки, в які вносять рідку культуру лептоспир. Через 5–6 днів інкубації в термостаті при 28 °С проводять аналіз результатів. Для цього поверхню чашки Петрі заливають на 7–10 хв 1N розчином HCl. Після видалення кислоти виявляється зона просвітління середовища навколо лунок, ширина якої характеризує ступінь активності ДНКаз.

Виділену від хворого культуру лептоспир досліджують в РМА з метою визначення серогрупового статусу. Використовують набір діагностичних антилептоспирозних сироваток до основних діагностичних штамів лептоспир. Орієнтовно штам вважають належним до тієї серогрупи, з сироваткою якої він показав найбільш високий титр.

Для уточнення таксономічного положення його досліджують у перехресній РМА і реакції імуноабсорбції (аглотинаційно-абсорбційний тест).

У перехресній РМА визначають антигенні взаємини виділеного штаму з усіма референс-штамами, що входять до передбачуваної серогрупи. Перехресну РМА проводять у 2 етапи: на першому етапі передбачається

постановка РМА з виділеним штамом і антисироватками до референс-штамів основних серогруп; на другому – постановка РМА з антисироваткою до штаму, виділеного від хворого, і всіма референс-штамами цієї ж серогрупи. Виділена культура може бути аглютинована однією або декількома антисироватками. Позитивно реагують 10 % і більше штамів і антисироватки до них вивчають у перехресній реакції імуноабсорбції. Ця реакція дозволяє визначити точний антигенний статус виділеної культури, застосовуючи метод перехресної абсорбції (виснаження) антитіл із антисироваток з убитими культурами лептоспир. Виснажені сироватки титрують і досліджують у перехресній РМА. Два штами вважаються належними до різних сероварів, якщо після перехресної абсорбції з адекватною кількістю гетерологічного антигену в повторних дослідах виявляється 10 % гомологічних антитіл і більше ніж в одній з виснажених сироваток. Визначення серовару виділеної від хворого культури може бути швидко проведено в РМА з використанням панелей моноклональних антитіл (МКАт) на основі виявлення відмінностей в аглютинаційному профілі досліджуваних штамів. МКАт реагують у РМА з поодинокими антигенними епітопами, що дозволяє визначити їх мозаїку, яка не повторюється на рівні серовара і навіть підсеровара.

**Біологічний метод** у цілях діагностики застосовують:

- для виділення культур лептоспир з крові, сечі й тканин, контамінованих сторонньою мікрофлорою (непрямий метод виділення культур);
- для визначення патогенності й вірулентності штамів, виділених від хворих.

Використовують золотистих хом'ячків (вік – 4–6 тиж, маса тіла – 25–40 г), молодих морських свинок (вік – 2–3 тиж, маса тіла – 150–175 г) і крольчат-сисунців. Для виділення культур 0,5–1 мл досліджуваного матеріалу інокують внутрішньочеревно.

За тваринами спостерігають протягом 15 діб, кожного дня їм вимірюють температуру тіла і зважують. На 1–3-й день досліджують перитонеальний ексудат мікроскопічно в темному полі зору і при виявленні лептоспир тварин забивають, беруть кров із серця і засівають на живильні середовища. У разі позитивного результату на 4–6-у добу маса тіла тварин знижується, починається сльозотеча, підвищується температура тіла до 39–40 °С. Тварини гинуть на 9–10-й день при явищах загальної жовтяниці. Під час розтину загиблих тварин виявляють геморагії (крововиливи) в органах і тканинах.

Проводять мікроскопічне і бактеріологічне дослідження кіркового шару нирок, а також серологічне дослідження крові. Виділення лептоспир із крові й органів, захворювання тварин або виявлення специфічних антитіл свідчить про наявність збудника у досліджуваному матеріалі.

Патогенність і вірулентність виділеної культури визначають на золотистих хом'яках. Тварин заражають внутрішньочеревно культурою, що містить  $10^8$ – $10^9$  клітин в 1 мл, в дозах 0,1; 0,3; 0,5; 1 мл. Якщо загибель

тварин настає при введенні 0,1 мл, штам вважають високовірулентним, 0,3 мл – середньої вірулентності, 0,5–1 мл – слабовірулентним.

**Серологічні методи діагностики** лептоспірозу у людей. Серед цих основних методів діагностики особливе місце займає реакція мікроаглютинації (РМА) як стандартний еталонний тест, що має високу чутливість і серогрупоспецифічність. Мета реакції – виявлення антитіл у сироватці крові хворих і встановлення їх титру. Аглютиніни ізотипів IgM і IgG можуть бути виявлені за допомогою цієї реакції. Принцип методу полягає в тому, що при змішуванні культур лептоспир з імунною сироваткою відбувається склеювання цих спірохет у вигляді «кіс», «вузликів», «тяжів», що виявляється при мікроскопічному дослідженні в темному полі зору.

Реакцію проводять у мікротитраційних планшетах з 96 лунками. Як антиген використовують культури живих активно рухливих лептоспир зі щільністю  $(1-2) \times 10^8$  клітин/мл без спонтанної аглютинації і контамінації сторонніми мікроорганізмами. Можна використовувати культури, убиті формальдегідом (у кінцевій концентрації 0,2 %). Однак при цьому збільшується відсоток гетерологічних реакцій і знижується титр антитіл. Враховуючи, що протилептоспірозні антитіла володіють високим ступенем сероваро- і серогрупової специфічності, постановку РМА проводять із діагностичним набором штамів лептоспир.

Сироватку хворого, отриману за допомогою пункції вени, спочатку інактивують при 56 °C протягом 30 хв.

Постановку реакції здійснюють у дві фази:

- скринінгову (відбіркову) – для визначення серогрупи лептоспир, що аглютинуються досліджуваною сироваткою;
- кількісну – для визначення титру сироватки з кожним тест-антигеном, що вступив у реакцію.

РМА зазвичай стає позитивною з 10–11-го дня хвороби, але сероконверсія іноді відзначається на 5–7-й день. Імунна відповідь може бути різко знижена, якщо антибіотикотерапія була розпочата до взяття крові. Діагностичним титром РМА вважають 1:100, однак для правильної оцінки результатів доцільно досліджувати парні сироватки з інтервалом 10–14 днів. Наростання титрів антитіл відбувається лише при розвитку захворювання. Дослідження парних сироваток допомагає в установленні етіологічного значення лептоспир тієї чи іншої серогрупи, яке ускладнено через наявність міжгрупових реакцій. Відомо, що в перші дні хвороби в крові накопичуються IgM, що мають низьку специфічність і беруть участь у перехресних реакціях з гетерологічними штамми. IgG з'являються в більш пізні терміни (пізніше 10–12-го дня), коли кількість IgM різко знижується, і характеризуються більшою специфічністю, реагують тільки з гомологічними антигенами лептоспир.

Для вивчення динаміки накопичення IgM і IgG у РМА досліджувані сироватки обробляють редукуючими речовинами (цистеїном або 2-меркапто-

етанолом) для руйнування антитіл ізотипа IgM зі втратою аглютинуючої активності. РМА використовують і для ретроспективної діагностики, тому що протилептоспірозні антитіла можуть бути виявлені через 20–22 роки після перенесеного захворювання в більш низьких титрах.

Для виявлення протилептоспірозних антитіл застосовують й інші реакції. В останні роки як відбіркові тести використовують ІФА з родоспецифічними антигенами, виготовленими з *L. biflexa* серовара *patos* або *L. interrogans* серовара *hardjo*. При позитивних результатах цього тесту необхідна постановка РМА для виявлення етіологічно значущого збудника. Показана можливість використання РЗК, РНГА, гемолітичного тесту (ГТ), РЛА та інших тестів для виявлення родоспецифічних антитіл.

*Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)* використовується для виявлення ДНК лептоспир у досліджуваних матеріалах (крові, сечі та ін.).

Для виявлення лептоспир у довкіллі проводять дослідження матеріалу з відловлених гризунів і води відкритих водойм. У відловлених гризунів досліджують кров, сечу і кірковий шар нирок мікроскопічним, бактеріологічним та біологічним методами.

**Алгоритм:** «Постановка реакції мікроаглютинації (РМА)».

Скринінгове дослідження проводять наступним чином. У лунки першого ряду планшета вносять по 50 мкл ізотонічного розчину натрію хлориду або фосфатно-сольового буферу (ФСБ) з рН 7,2. Кількість лунок має відповідати кількості діагностичних штамів лептоспир, що використовуються в реакції. У кожен лунку цього ряду вносять по 50 мкл культур тест-антигенів. Цей ряд використовують для контролю антигенів. Другий ряд призначений для дослідження сироваток хворих: перший ряд – для сироватки 1-го хворого, наступний – для сироватки 2-го хворого та ін. Інактивовані сироватки хворих попередньо розводять 1:25 і вносять у лунки відповідного ряду в об'ємі 50 мкл. Потім додають рівну кількість тест-антигену відповідно антигенам контрольного ряду. Закривають кришкою та інкубують при кімнатній температурі 2 год, після чого проводять аналіз результатів у темному полі зору при  $\times 400$  у препараті «роздавлена крапля». Позитивно вважають сироватку, у якій аглютинують не менше 50 % лептоспир.

Подальшому дослідженню підлягають сироватки, у яких позитивні результати відзначені з одним або декількома тест-антигенами (міжгрупові реакції).

Кількісну РМА з метою визначення титру сироваток ставлять наступним чином. У лунки планшета вносять по 50 мкл ізотонічного розчину натрію хлориду (або ФСБ), потім у першу лунку додають таку ж кількість досліджуваної сироватки в розведенні 1:25, перемішують, проводять подальші 2-кратні розведення сироватки до кінцевого титру 1:25 000. Після цього в лунки вносять по 50 мкл тест-антигену, що призводить до повторного розведення сироватки і збільшення її титрів у 2 рази. Ставлять контроль антигену та сироватки. Кількість рядів у планшеті для кожної сиро-

ватки відповідає кількості штамів лептоспир, які у скрининговому тесті дали позитивні результати. Інкубацію та облік результатів проводять так само, як описано вище.

**Термінологія.** Leptospiraceae, Leptospira interrogans, L. biflexa, серовари: L. icterohaemorrhagiae, L. grippotyphosa, L. pomona і L. canicola.

### ***Запитання для контролю знань***

1. Лептоспіри. Морфологія та біологічні властивості. Антигенна структура. Класифікація. Резистентність. Патогенність для тварин.

2. Значення лептоспир в патології людини. Основи патогенезу лептоспірозу, клінічні прояви. Імунітет.

3. Матеріал для дослідження, особливості взяття його і транспортування. Методи лабораторної діагностики: бактеріоскопічний, бактеріологічний, серологічний. Біологічна проба. Експрес-методи.

4. Загальна, специфічна профілактика та лікування лептоспірозу.

### ***Тестові завдання***

1. Для діагностики лептоспірозу використовують серологічний метод лабораторної діагностики. Яка з реакцій при цьому застосовується?

A. Реакція мікроаглоутинації і лізису.

D. РНГА.

B. Розгорнута РА.

E. РН.

C. РГА.

2. Яке середовище доцільно використовувати для культивування лептоспир?

A. МПБ.

B. Кров'яний агар.

C. Кров'яно-вугільний агар.

D. Середовище з кролячої сироваткою.

E. Середовище Тінсдаля–Садикової.

3. При лептоспірозі у хворого спостерігаються симптоми загальної інтоксикації, порушення судинної проникності. Чим обумовлені дані клінічні симптоми захворювання?

A. Дією ендотоксину збудника.

B. Інгібуванням лептоспірами продукції антитіл.

C. Алергізацією організму.

D. Дією екзотоксину збудника.

E. Занесенням лептоспир в легені.

4. Які методи лабораторної діагностики використовують при лептоспірозі?

A. Бактеріоскопічний, серологічний.

B. Бактеріоскопічний і бактеріологічний.

C. Бактеріоскопічний, бактеріологічний, серологічний, біологічний.

D. Серологічний і бактеріологічний.

E. Алергічний і біологічний.

5. Який метод бактеріоскопії доцільно застосувати для виявлення лептоспир у досліджуваному матеріалі?

A. Фарбування за Грамом.

B. Фарбування за Романовським–Гімзою.

C. Фарбування карболовим фуксином.

D. Фарбування препарату за Ожешко.

E. Вивчення нативних препаратів при темнопольній мікроскопії.

6. Який температурний режим є оптимальним для вирощування лептоспир?

A. 28–30 °C.

C. 38–40 °C.

E. 25–28 °C.

B. 35–37 °C.

D. 36–38 °C.

### Тема: Лабораторна діагностика бореліозу

#### Кількість годин: 2

**Обґрунтування теми.** До бореліозів, збудниками яких є бактерії роду *Borrelia* (названі на честь французького мікробіолога А. Borrel, що вивчав спірохети на початку XX ст.), відносяться епідемічний (вошивий) поворотний тиф, аргасові кліщові бореліози (АКБ), іксодові кліщові бореліози (ІКБ) – захворювання групи хвороби Лайма. Найбільш відомими серед них є епідемічний і ендемічний поворотний тиф. Епідемічний поворотний тиф нині реєструється вкрай рідко. АКБ зустрічаються в тропічних і субтропічних країнах, а також у південних регіонах і країнах з помірним кліматом (Африка, Америка, Євразія). Найбільш значущими серед збудників є борелії *B. duttonii*, що зустрічається в Східній і Центральній Африці, *B. hermsii* (Канада, США) і *B. persica*, що циркулюють в Іраку, Єгипті, Кашмірі, Індії, Західному Китаї. У суміжних з Росією країнах і в Росії зустрічаються *B. caucasica*, *B. armenica* (райони Північного Кавказу і Закавказзя та ін.), *B. latishvii*, *B. sogdiana* (Середня Азія, Південний Казахстан та ін.). Лайм-бореліоз реєструється на території Північної Америки, Австралії, Євразії.

Збудник був відкритий у 1868 р. німецьким лікарем О. Обермейєром (звідси назва – спірохета Обермейєра). Інфекційність крові та епідемічну роль у поширенні епідемічного поворотного тифу довели шляхом самозараження вітчизняні вчені Г. М. Мінх і Й. Й. Мочутковський, а роль вошей у передачі інфекції експериментально довів французький бактеріолог Ш. Ніколь.

Один із збудників ендемічного поворотного тифу (кліщового бореліозу) *B. duttoni* був виявлений у крові хворих у 1904 р. Р. Россом, пізніше, на початку XX ст., були описані й інші збудники кліщового бореліозу.

Збудником епідемічного поворотного тифу є *B. recurrentis*, ендемічного – декілька видів борелій: *B. duttoni*, *B. caucasica*, *B. persica* тощо. Всі борелії подібні між собою за морфологічними і біологічними властивостями.

Хвороба Лайма зареєстрована в Північній Америці, зокрема, в США, Північній Африці, Європі, Євразії, Азії. У Росії виявлено випадки ІКБ на лісових територіях від Калінінграда до Південного Сахаліну і виявлені збудники *B. afzelii*, *B. garinii* і *B. burgdorferi* s.s. Остання знайдена у дорослих кліщів *I. ricinus* у Молдавії, в Україні в Львівській та Миколаївській областях.

У даний час у Північній Америці виявлені наступні види борелій – збудників ІКБ: *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. bissettii*, а в Центральній і Східній Європі – *B. afzelii*, *B. garinii*. В Європі та Росії, крім цих видів, з іксових кліщів виділені також *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, патогенність яких вірогідна.

**Мета:**

*Загальна:* оволодіти мікробіологічною діагностикою бореліозів.

*Конкретна:*

а) знати правила безпеки при роботі з біологічним матеріалом (Державні санітарні правила – ДСП 9.9.5.03599);

б) вміти:

1. Підготувати робоче місце лаборанта.
2. Дотримуватися правил роботи і техніки безпеки з інфікованим матеріалом, культурами мікроорганізмів, апаратурою.
3. Відбирати та транспортувати матеріал для дослідження при підозрі на бореліози.
4. Готувати матеріал, який надійшов від хворого з підозрою на бореліози.
5. Досліджувати матеріал за допомогою методів, призначених для виявлення борелій.
6. Давати оцінку результатам дослідження та заповнювати відповідну лабораторну документацію.

**Матеріальне та методичне забезпечення теми:** музейні мікропрепарати, бланки направлень, мікроскоп, імерсійне масло, дезінфікуючий розчин, таблиці, атлас.

**Зміст заняття**

**Таксономія.**

*Сімейство:* Spirochaetaceae

*Рід:* Borrelia

*Вид:* *B. recurrentis* (збудник епідемічного поворотного тифу), *B. burgdorferi*, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae* (збудники хвороби Лайма), *B. duttonii*, *B. caucasica*, *B. persica*, *B. hispanica*, *B. venezuelensis* тощо.

**Морфологічні та тинкторіальні властивості.** Борелії мають розміри 0,5–2×3–20 мкм, утворюють 3–10 нерівномірних глибоких і дрібних великих завитків, відстань між якими становить 2–4 мкм, на кінцях загострені. Спору і капсулу не утворюють. Борелії дуже рухливі, мають 7–30 ендоджгутиків, здатні до згинальних, обертальних і поступальних рухів. Забарвлюються за Романовським–Гімзою у синьо-фіолетовий колір, грам-негативні. Розмножуються шляхом бінарного поділу. У старих культурах утворюють цистоподібну форму.

**Культуральні властивості.** Борелії – анаероби, мікроаерофіли, хеморганотрофи, оптимальна температура 28–30 °C, pH 7,2–7,4. Культи-



вуються на спеціальних поживних середовищах, що містять кров, сироватку або тканини тваринного походження. Добре розмножуються в курячому ембріоні при зараженні в жовтковий мішок. Максимальний ріст спостерігається на 4–7-у добу під час культивування на поживних середовищах і курячому ембріоні патогенність борелій швидко втрачається.

**Ферментативні властивості** борелій практично не вивчені.

**Антигенні властивості** можуть змінюватися. Під впливом борелій в організмі людини продукуються антитіла.

**Резистентність** борелій до факторів навколишнього середовища невисока. При температурі 50 °С вони гинуть протягом 30–40 хв, швидко гинуть під час висушування, під дією дезінфекційних засобів. При 0 °С і знижених температурах можуть зберігатися кілька діб; в умовах заморожування зберігаються кілька місяців.

**Фактори патогенності:**

- фактори адгезії – білки поверхневої мембрани;
- ендотоксин – ліпополісахарид клітинної стінки.

**Епідеміологія.** Джерелом епідемічного поворотного тифу є хворі люди, особливо в період нападу лихоманки. Переносник – одежна воша (*Pediculus vestimenti*), інколи головна (*P. capitis*). Воші стають заразними через 5–7 діб після ссання крові хворого. З кишечника воші спірохети проникають у гемолімфу і там розмножуються. Воша залишається заразною впродовж усього життя (25–40 діб). Спірохети не проникають у слинні залози воші, тому інфекція не передається через укуси. В організм людини спірохети потрапляють у разі роздавлювання воші й втирання її гемолімфи через ранки, які залишаються після укусу воші або утворюються внаслідок розчісування. Трансоваріально (у спадок своєму поколінню) воша інфекцію не передає. Захворювання найчастіше виникає у зимову пору року, коли створюються умови для збільшення вошовитості.

Джерелом ендемічного поворотного тифу є тварини: гризуни, хижаки, а переносником – кліщ роду *Ornithodoros*. У кліщів спірохети проникають у слинні залози, тому вони передають інфекцію через укуси. Крім того, кліщі передають збудника трансоваріально своїм нащадкам. Таким чином створюються ендемічні природні осередки кліщового поворотного тифу.

Природний резервуар лайм-бореліозу – дрібні гризуни, олені, лосі. Основні переносники – кліщі *Ixodes ricinus* та *I. persulcatus*. Від людини до людини захворювання не передається. Зараження відбувається через слину після присмоктування кліща.

**Патогенез і клінічна картина.** Інкубаційний період при епідемічному поворотному тифі триває 3–10 діб. Борелії із ранки проникають у лімфатичну систему і розмножуються всередині макрофагів, а наприкінці інкубаційного періоду потрапляють у кров. Під дією бактерицидних речовин крові, а також антитіл, що утворюються в процесі хвороби, вони частково гинуть. Вивільнений ендотоксин уражає ендотелій кровоносних

судин, що спричинює крововиливи. Борелії здатні адсорбувати на своїй поверхні тромбоцити, внаслідок чого утворюються агрегати, які затримуються у капілярах внутрішніх органів. Крововиливи і закупорка капілярів призводять до емболії, вогнищ некрозу, інфаркту, що порушує функцію внутрішніх органів (печінки, селезінки, серцево-судинної системи). Клінічно це проявляється високою температурою тіла (39–40 °C), головним болем, помірним болем у м'язах гомілок, нудотою, блюванням, збільшенням селезінки, болем у лівому боці; у разі ураження центральної нервової системи проявляються ознаки менінгіту. Висипи на шкірі відсутні або мають вигляд папул (прищів), розеола чи петехій (дрібні крововиливи в шкіру або слизові оболонки). Перший напад гарячки триває 3–7 діб, потім температура тіла різко знижується, що супроводжується проливним потовиділенням, і настає період ремісії, або апіреksії (період без гарячки), який триває 5–7 діб. Потім розвивається наступний напад. Борелії у крові виявляються під час гарячки. Зазвичай при епідемічному поворотному тифі спостерігається 3 таких напади і рідко кількість їх досягає 7–10, причому інтенсивність і тривалість їх весь час зменшуються, а період ремісії збільшується.

Періодичність нападів гарячки і ремісії пояснюють тим, що під впливом антитіл гинуть не всі борелії. Ті з них, що містяться в глибоких тканинах і центральній нервовій системі, внаслідок зміни антигенної структури не знищуються антитілами, що утворилися під час першого нападу, а розмножуються в період ремісії і спричиняють другий напад. Це повторюється до тих пір, поки організм не знешкодить всі різновиди борелій. Хвороба триває понад 2 міс.

Основними відмінностями ендемічного поворотного тифу є наявність первинного афекту (прояву) у місці укусу кліща (спочатку з'являється рожева пляма, потім вузлик з геморагічним обідком). Інкубаційний період коротший, тривалість нападів гарячки від декількох годин до 2–3 діб, але їх багато – від 6 до 18 і більше, тривалість періодів ремісії – від 1 до 9 діб. Борелії кліщового поворотного тифу виявляють у крові не тільки під час гарячки, а й у період ремісії.

Захворювання може мати стертий, легкий, середньої тяжкості й тяжкий перебіг. Зазвичай воно закінчується одужанням, але небезпечно для ослаблених пацієнтів і дітей.

Хвороба Лайма (хронічна мігруюча еритема, кліщовий іксодовий бореліоз) є хронічною інфекцією, з ураженням шкіри, серцевої та нервової системи, суглобів. Інкубаційний період при лайм-бореліозі – від 3 до 32 днів. У 80 % пацієнтів на місці укусу з'являється мігруюча еритема у вигляді овальної або круглої папули. Якщо збудник потрапляє у кров, розвивається дисемінована форма захворювання з ураженням опорно-рухового апарату, нервової, серцево-судинної системи, вторинних уражень шкіри. Розвиваються васкуліти, аутоімунні процеси. Через декілька місяців або років ураження суглобів набуває хронічного характеру. У деяких хворих розви-

ваються менінгіти, менінгоенцефаліти, моновироти периферичних або черепних нервів.

**Імунітет.** Після перенесеної інфекції накопичуються антитіла, які зумовлюють нетривалий і нестійкий імунітет. В ендемічних осередках імунітет набувається у дитячому віці, що було доведено шляхом виявлення специфічних антитіл. Перехресний імунітет проти епідемічного й ендемічного поворотного тифу не формується.

**Мікробіологічна діагностика.** На аналіз відбирають кров у період гарячки, у разі необхідності беруть кістковий мозок. При лайм-бореліозі досліджують біоптати шкіри, синовіальну рідину суглобів, ліквор, сироватку крові.

Основним методом діагностики для поворотних тифів є *мікроскопічний*. Використовують «товсту» або «висячу» краплю та досліджують у темному полі. Спірохетемія при епідемічному поворотному тифі найбільш виражена на початку гарячкового періоду. Висушені мазки без фіксації забарвлюють за Романовським–Гімзою, фуксином, метиленовим синім. У період приступу епідемічного поворотного тифу бактерій буває так багато, що вони переплітаються між собою, утворюючи «повстяну сітку», при ендемічному – спірохетемія не виражена (1–2 бактерії в декількох краплях). Якщо досліджують кров у період між нападами, її центрифугують та досліджують осад. Для диференціації епідемічного і ендемічного поворотного тифу використовують *біологічний* метод. Для цього заражують кров'ю пацієнта морських свинок або кроликів через кон'юнктиву очей або слизову оболонку носа. Через 2–4 дні проводять мікроскопію крові тварин або досліджують препарати з різних органів. *Серологічний* метод застосовують під час *ремісії*. Для цього використовують реакції лізису, РЗК, навантаження борелій тромбоцитами, реакцію іммобілізації борелій.

Для лайм-бореліозу основний метод – серологічний, використовують РНІФ, ІФА. IgM виявляють на 3–6-му тижні, IgG – через декілька місяців після інфікування. Для визначення наявності борелій в лікворі, суглобовій рідині використовують молекулярно-генетичний метод (ПЛР).

**Профілактика.** Неспецифічна профілактика спрямована на своєчасне виявлення й ізоляцію хворих, дезінсекцію їх речей і помешкання, санітарну обробку осіб, що контактували з хворим, на спостереження за особами, що були в контакті протягом 25 днів, а також на боротьбу з педикульозом (вошивістю) і захист від укусів кліщів. Серед населення необхідно проводити санітарно-освітню роботу з індивідуальної профілактики. При цьому слід відзначати важливість негайного звернення до лікаря при виникненні мігруючої еритеми.

Специфічна профілактика не розроблена.

**Лікування.** Хворому призначають левоміцетин, тетрациклін, еритроміцин, пеніцилін, цефалоспорин, доксициклін, азитроміцин та ін. Як

додаткові терапевтичні засоби застосовують препарати, що діють на серцево-судинну систему, а також плазму, глюкозу, вітаміни. При розриві селезінки показано оперативне втручання.

Превентивне лікування ІКБ дозволяє попередити захворювання. З цією метою використовують тетрациклін (доксидиклін, юнідокс), макроліди нового покоління (азитроміцин, рокситроміцин, кларитроміцин), цефалоспорины, пеніциліни та ін. При виявленні борелій у переносника (не пізніше 3 днів після нападу кліща) пацієнтові призначають курс доксицикліну. Використовують також комбінований препарат амоксилав. Ефективність лікування оцінюють через 1,5–2 міс з використанням комплексу діагностичних методів. Перехворілі на лайм-бореліоз повинні знаходитися (незалежно від тяжкості захворювання) під диспансерним наглядом не менше 1 року.

### ***Практичні навички з теми***

1. Проведення мікроскопії мазків-препаратів з бореліями.
2. Визначення морфотинкторіальних властивостей борелій.

### ***Алгоритми лабораторної роботи***

**Алгоритм:** «Правила забору матеріалу за підозри на бореліоз».

**Матеріал для дослідження і способи забору:**

Кров:

- Одержання товстої краплі. Проколювання м'якуша на пальці. Предметним склом торкаються до краплі крові, що виступила, не віднімаючи скло, круговими рухами доводять діаметр краплі до 1–1,5 см).

- Одержання мазка. Предметним склом торкаються до краплі крові, що виступила. Ребром другого шліфувального скла розмазують краплю на склі.

**Алгоритм:** «Хід мікробіологічного дослідження матеріалу за підозри на епідемічний поворотний тиф».

**Мікроскопія препаратів.** Мікроскопії підлягають кров хворого, гемолімфа ектопаразитів (вошей, кліщів), секційний матеріал. Кров у хворого відбирають на початку періоду підвищення температури тіла і виготовляють декілька препаратів: мазок, товсту краплю і висячу краплю. Товсту краплю не фіксують. На висушену на повітрі товсту краплю наносять 0,5 см<sup>3</sup> розведеного барвника Гімзи (1 крапля барвника + 1 крапля дистильованої води). Через декілька хвилин настає гемоліз під дією дистильованої води, цю порцію барвника змивають і наносять нову. Фарбування проводять 20–30 хв. Барвник зливають і дуже обережно (крапля не фіксована!) промивають водою. Під час мікроскопії виявляють лейкоцити і борелії, які мають синьо-фіолетовий колір, містять 4–12 нерівномірних завитків. Виявлення борелій при мікроскопії препаратів крові або сироватки хворого може виявитися вирішальним.

При мікроскопії «висячої краплі» в темному полі або при фарбуванні тушшю за Бурі збудник нагадує сріблясті, дуже рухливі, звивисті нитки на темному фоні.

Для диференційної діагностики епідемічного й ендемічного поворотного тифу кров для мікроскопії беруть у період ремісії. При ендемічному поворотному тифі в період ремісії виявляється помірна або слабка спірохетемія, при епідемічному – в період ремісії спірохети не виявляються.

**Серологічні проби.** *Бактерицидна дія сироватки крові.* На предметному склі роблять суміш з сироватки перехворілого, що містить бактерицидні антитіла до збудника після нападу лихоманки (період апірексії), і сироватки хворого, яка можливо утримує борелії. Приблизно через 45 хв інкубації в термостаті предметного скла з сумішшю, накритого покривним склом, препарат мікроскопіюють. Під дією присутніх у сироватці бактерицидних антитіл відбувається загибель спірохет і, отже, втрата рухливості. Нормальна сироватка крові людини не містить антибореліозних антитіл, і в реакції з нею загибель спірохет не спостерігається.

*Реакція іммобілізації.* До 3 об'ємів суміші сироватки крові хворого і нітратної плазми інтактної морської свинки в рівних співвідношеннях додають 1 об'єм суспензії борелій. Після перемішування суміші в кінцевій пробірці та її інкубації при 37 °С протягом 15 хв із дна пробірки збирають пробу, наносять краплю на предметне скло, накривають покривним склом і проводять мікроскопію з імерсією в темному полі. При позитивній реакції тромбоцити морської свинки адсорбуються на поверхні борелій, які будуть знерухомлені (відбувається «навантаження» борелій тромбоцитами).

*Реакція непрямой імуофлюоресценції (РНІФ), реакції імуоферментного аналізу.* Ці реакції проводять зі зразками матеріалу від хворого з сироваткою крові. Реакція РНІФ вважається позитивною при наявності світіння у комплексу, що утворився з флуоресцентних антитіл сироватки і борелій.

**Полімеразна ланцюгова реакція.** Використовуючи ПЛР, можна тестувати матеріал хворого на наявність ДНК *B. recurrentis*. Реакція має високу чутливість і вимагає особливих умов для проведення, щоб уникнути діагностичних помилок.

**Біологічний тест на тваринах.** При необхідності диференційної діагностики епідемічного поворотного і кліщового поворотного тифу (аргасового кліщового бореліозу) кров хворої людини (3–5 мл) вводять внутрішньовенно або підшкірно морській свинці. Тварина залишається здоровою, якщо в пробі є збудник епідемічного поворотного тифу, до якого тварина несприйнятлива. Епідемічний поворотний тиф диференціюють також від інших кліщових бореліозів, лептоспірозу, висипного тифу, крупної пневмонії, малярії та ін.

**Алгоритм:** *«Хід мікробіологічного дослідження матеріалу за підозри на ендемічний поворотний тиф».*

Лабораторна діагностика ендемічного поворотного тифу схожа з такою при епідемічному поворотному тифі. Застосовують мікроскопію мазків крові, пофарбованих за Романовським–Гімзою, та імпрегнацію гіс-

тологічних препаратів сріблом, а також виявлення борелій у «товстій» або «висячій» краплині крові. З кінця 2-го тижня захворювання проводять *серодіагностику*. Спочатку використовують ІФА, РНІФ, потім імуноблотинг для визначення специфічності IgG і IgM до білків борелій.

Виявлення борелій можна проводити, інфікуючи кров'ю хворого морських свинки (0,5–1 мл підшкірно, внутрішньоочеревинно або 1–2 краплі на слизову оболонку носа, в кон'юнктиву). При позитивному результаті через 5–7 днів у крові тварин з'являються борелії в значній кількості. Внутрішньоочеревинне введення крові хворого лінійним білим мишам також викликає розмноження борелій, і через 48 год їх легко виявити у крові мишей. Для виявлення ДНК збудника у крові й сироватці хворого перспективне використання всіх методів генодіагностики, включаючи ПЛР.

**Алгоритм:** *«Хід мікробіологічного дослідження матеріалу за підозри на лайм-бореліоз».*

Діагноз ставлять на підставі лабораторних та епідеміологічних даних. У лабораторній діагностиці застосовують мікроскопічний і культуральний методи, які є малоінформативними, серологічні методи, ПЛР.

**Мікроскопічний метод дослідження** найчастіше не дозволяє виявити борелії в крові, цереброспінальній і синовіальній рідині, біоптатах після фарбування за Романовським–Гімзою, після сріблення, а також при темнопольній мікроскопії через низьку концентрацію збудника в біоматеріалі, яка може залишатися незначною навіть після проведення збагачення.

**Культуральний метод.** Відомо, що борелії вибагливі мікроорганізмами. Проте їх можна виділити з будь-якого інфікованого матеріалу. Оскільки культивування триває не менше 5 тиж при 30–33 °С, періодично проводять контроль зростання методом темнопольної мікроскопії. Успішності виділення збудників ІКБ (іксодових кліщових бореліозів) сприяють асептичні умови взяття матеріалу і швидке внесення його в живильне середовище. З цереброспінальної, внутрішньосуглобової рідини та в інших рідких зразках збудник можна виділити, попередньо сконцентрувавши його методом центрифугування у стерильному посуді, оскільки борелії з таких зразків ізолювати важко. Збудників зі шкірних біоптатів вдається виділити навіть через кілька місяців після зникнення мігруючої еритеми. Оскільки середовища BSK дорогі, а техніка вирощування тривала і трудомістка, діагностична цінність культурального методу незначна.

**Серологічні методи:** РІФ, ІФА, імуноблотинг, РЕМА, іноді в поєднанні. На ранніх стадіях лайм-бореліозу імунну відповідь визначають на основний імуногенний компонент флагелін (p41) і білок зовнішньої мембрани (OspC). На 3–6-му тижні з'являються IgM, потім через 4–6 тиж, іноді через кілька місяців IgG. Особливістю імунної відповіді при ІКБ є повільний підйом рівня антитіл. Дисемінація збудника супроводжується активною продукцією IgG.

Найбільш поширеним методом є РНІФ. Для її проведення застосовують антигени видів комплексу *B. burgdorferi sensu lato* (s.l.).

У пізніх стадіях захворювання при титруванні сироваток хворих зазвичай виявляють високі позитивні титри. Для ранніх проявів (протягом перших 2–3 тиж хвороби) через низьку концентрацію антитіл і запізнення IgG-відповіді в сироватках, як правило, виявляють низькі титри специфічних антитіл. Більш точній серологічній діагностиці сприяє проведення реакцій з парними сироватками. Першу сироватку вивчають після надходження хворого, другу – через 3–5 тиж від початку хвороби і не раніше 2-го тижня після першого аналізу. Значуще (4-кратне) збільшення титру підтверджує правильність клінічного діагнозу. Хибнопозитивні результати можуть виникати при сифілісі, системних захворюваннях сполучної тканини, ревматоїдному артриті та ін.

*Імуноферментні реакції.* Принцип реакції ензиммічених антитіл (РЕМА) аналогічний РНІФ (специфічний антиген – антитіло – мічений кон'югат антиантитіло). Однак антиантитіла в цьому випадку мітять ферментом (найчастіше лужною фосфатазою або пероксидазою хрому). На 2-му етапі реакції зв'язану в позитивній пробі ферментну мітку виявляють за кольоровою реакцією з адекватним ферменту субстратом (проявником), що додається до проби. Результати реакції враховують візуально або за зміною оптичної щільності проби. Проведення модифікацій реакції цього типу може виконуватися з корпускулярними антигенами, а облік – за допомогою мікроскопа (за специфічним фарбуванням борелій). У найбільш поширених модифікаціях (ELISA) застосовують стандартні полістиролові мікропланшети (плашки) з плоскодонними лунками, на дні яких сорбований розчинний антиген. Останній готують у вигляді концентрату корпускулярного антигену. Клітини руйнують соніфікацією. Після осадження центрифугуванням препарат антигену розводять до концентрації по білку 5–10 мкг/мл. Потім антиген вносять у лунки мікропланшети. При висушуванні антиген сорбують на мікропланшеті. Після цього в лунки послідовно вносять тестовану сироватку в робочих розведеннях, кон'юговані з ферментом антитіла до видів борелій і проявник. Облік результатів проводять, як зазначено вище. Слід зазначити, що проведення реакції вимагає отримання досить великої кількості мікробної біомаси для виділення антигену методом соніфікації.

*Метод імунного блотингу (Western-blott)* виявляє специфічні антитіла до певних білків борелій (мол. м. 39 000), які поділяють за допомогою електрофорезу. Після виконання методичних прийомів щодо зв'язування антитіл з відповідними антигенами та візуалізації комплексів оцінюють результати.

*Визначення бактеріцидних властивостей сироватки крові.* У діагностиці ІКБ застосування цього методу обмежено. У ранні терміни захворювання кров не має бактеріцидних властивостей, мабуть, через відсутність

специфічних антитіл. Однак за бактерицидними властивостями сироватки крові можна встановити, чи відбулося утворення загальних і захисних антитіл. При їх наявності в присутності комплементу борелії елімінуються.

*ПЛР* дозволяє ідентифікувати *Borrelia* до генотипу на 7–10-й день з моменту укусу.

**Алгоритм:** «Постановка РНІФ для діагностики лайм-бореліозу».

РНІФ проводять у два етапи: 1-й – зв'язування специфічних антитіл сироваткою, що тестується, з відповідним антигеном; 2-й – зв'язані з антигеном специфічні антитіла ідентифікуються зв'язуванням з антивидовими, міченими флюорохромом (ФІТЦ) антитілами, отриманими до глобулінів сироватки людини для певних класів імуноглобулінів (IgM, IgG та ін.). Для постановки реакції застосовують корпускулярний антиген *B. burgdorferi*, а також стандартні мічені сироватки проти глобулінів людини і бичачий альбумін, мічений родаміном, що забезпечує контрастування фону для зручності зчитування результатів реакції.

Отримання антигену: вирощування борелій проводять на середовищі BSK II протягом 10–14 днів, потім мікробні клітини центрифугують при 10–12 тис. g у центрифугі з охолодженням (при 10–12 °C) протягом 30 хв. Осад борелій ресуспендують у суміші ізотонічного розчину натрію хлориду з 0,01 М фосфатним буфером (ФБС), рН 7,2. Процедура центрифугування і відмивання ФБС повторюють 3 рази. Отриманий осад РС суспендують у ФБС (у 10-кратно меншому об'ємі порівняно з початковим об'ємом мікробної суспензії). При зберіганні антигену (при 4–6 °C до 1 року) додають азид натрію (0,01 %), а також пеніцилін і стрептоміцин (100 ОД на 1 мл антигену).

Підготовка антигену до роботи: антиген розводять в ФБС до концентрації 30–100 мікробних клітин у полі зору мікроскопа; краплю суспензії антигену (близько 0,02 мл) вносять у кожну лунку чистого, знежиреного предметного скла, призначеного для постановки РІФ, висушують при кімнатній температурі в горизонтальному положенні. Антиген на склі зберігається при 4–6 °C до 6 міс.

Проведення РНІФ: спочатку готують робоче розведення ФІТЦ-міченої сироватки в розчині альбуміну, міченого родаміном, і 2-кратні розведення тестованої сироватки в ФБС, починаючи з розведення 1:5, а також для контролю розведення позитивної та негативної сироваток. Потім краплю (близько 0,05 мл) кожного розведення вносять у відповідну лунку з антигеном й інкубують при 37 °C протягом 30 хв у вологій камері. Після цього відмивають скло в ФБС протягом 10 хв. При цьому використовують магнітну мішалку або шютель-апарат. Скло сушать під струменем повітря. Краплю робочого розведення міченої сироватки вносять у кожну лунку, інкубують, відмивають і сушать, як вже було вказано.

Обов'язкові контролю специфічності РНІФ:

а) негативний контроль – антиген, оброблений на 1-му етапі нормальною сироваткою (без специфічних антитіл);



б) позитивний контроль – антиген, оброблений на 1-му етапі людською сироваткою, що містить специфічні антитіла у визначеному титрі. Контрольну сироватку застосовують у розведенні, що передре її титру.

Препарати вивчають у люмінесцентному мікроскопі, у відбитому світлі, з водно-імерсійним об'єктивом х60, тубусом х1,6 і окуляром ×4 або масляним імерсійним об'єктивом ×90, тубусом х1,1 і окуляром ×4. Результати оцінюють за яскравістю і тоном світіння антигену мікробних клітин. Зелена флюоресценція більшості мікробних клітин розглядається як позитивний результат. Відсутність флюоресценції у погано видимих у препараті борелій або їх слабка зеленувато-червона флюоресценція оцінюється як негативний результат. Титром тестованої сироватки вважається її найбільше розведення, у якому спостерігається позитивний результат.

**Термінологія.** Spirochaetaceae, Borrelia recurrentis, B. burgdorferi, B. afzelii, B. garinii, B. valaisiana, B. lusitaniae, B. duttonii, B. caucasica, B. persica, B. hispanica, B. venezuelensis.

#### **Заняття для контролю знань.**

1. Борелії поворотного тифу. Морфологія і біологічні властивості. Класифікація. Антигенна структура. Резистентність. Патогенність для тварин.
2. Епідемічний та ендемічний поворотний тиф, лайм-бореліоз. Переносники збудників. Механізм передачі інфекцій.
3. Основи патогенезу, клініка, імунітет при бореліозах.
4. Правила відбору матеріалу та лабораторна діагностика бореліозів.
5. Профілактика та лікування бореліозів.

#### **Тестові завдання**

1. У хворого з підозрою на епідемічний поворотний тиф у період апірексії необхідно підтвердження або спростування діагнозу. Який метод лабораторної діагностики є найбільш ефективним у цей період?

A. Темнопольна мікроскопія мазка крові.

B. Реакція іммобілізації борелій.

C. Приготування препарату «товстої краплі» крові і забарвлення за Романовським–Гімзою.

D. Біологічна проба.

E. Все перераховане вище.

2. У хворого з підозрою на поворотний тиф була взята кров у період нападу лихоманки. Кров була введена морським свинкам. Через 10 діб у тварин не було виявлено жодних ознак захворювання. Про що можуть свідчити отримані результати?

A. Пацієнт хворий на черевний тиф.

B. Пацієнт хворий на епідемічний поворотний тиф.

C. Пацієнт хворий на ендемічний поворотний тиф.

D. Пацієнт хворий на висипний тиф.

E. Пацієнт хворий на лептоспіроз.

3. Який тест є специфічним для діагностики епідемічного поворотного тифу?
- A. Реакція аглютинації.
  - B. Реакція Вассермана.
  - C. Проба з алергеном.
  - D. Реакція іммобілізації.
  - E. Біологічна проба на кроликах.
4. В інфекційну лікарню госпіталізували пацієнта з попереднім діагнозом «епідемічний поворотний тиф». Який матеріал, взятий від пацієнта, необхідно досліджувати насамперед?
- A. Сечу.
  - B. Фекалії.
  - C. Ліквор.
  - D. Кров.
  - E. Змив з носоглотки.
5. В інфекційне відділення був госпіталізований пацієнт з лихоманкою, що періодично повторюється. При первинному огляді був поставлений діагноз «поворотний тиф». Що не характерно для ендемічного поворотного тифу?
- A. Наявність первинного афекту на місці укусу.
  - B. Збудник весь час знаходиться у крові.
  - C. Переносник – кліщі.
  - D. Переносник – платяна воша.
  - E. Джерело – гризуни.

## Література

### *Основна*

1. Борисов Л. Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология / Л. Б. Борисов. – М. : Медицина, 2001. – 721 с.
2. Медицинская и санитарная микробиология : учеб. пособие для студ. высш. мед. учеб. заведений / А. А. Воробьев, Ю. С. Кривошеин, В. П. Широбоков. – М. : Изд. центр «Академия», 2003. – 464 с.
3. Микробиология / И. Л. Дикий, И. Ю. Холупяк, Н. Е. Шевелева, М. Ю. Стегний. – Харьков : Прапор, изд. УкрФА, 1999. – 413 с.
4. П'яткін К. Д. Мікробіологія з вірусологією та імунологією / К. Д. П'яткін, Ю. С. Кривошеїн. – К. : Вища шк., 1992. – 431 с.
5. Ситнік І. О. Мікробіологія, вірусологія, імунологія / І. О. Ситнік, С. І. Климнюк, М. С. Творко. – Тернопіль : Укрмедкнига, 1998. – 392 с.

### *Додаткова*

1. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія : підруч. для студ. вищ. мед. навч. закладів / за ред. В. П. Широбокова. – вид. 2-е. – Вінниця : Нова книга, 2011. – 952 с.
2. Коротяев А. И. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология : учебник для мед. вузов / А. И. Коротяев, С. А. Бабычев. – СПб. : СпецЛит, 2008. – 767 с.
3. Медицинская микробиология / под ред. В. И. Покровского. – М. : ГЭОТАР-МЕД, 2001. – 768 с.
4. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология : учеб. по дисциплине «Микробиология, вирусология и иммунология» для студ. учреждений высш. проф. образования / под ред. В. В. Зверева, М. Н. Бойченко. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 480 с.
5. Руководство к практическим занятиям по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии / под ред. В. В. Теца. – изд. 2-е, перераб. и доп. – М. : Медицина, 2002. – 352 с.
6. Медицинская микробиология / под ред. А. М. Королюка и В. Б. Сбойчакова. – СПб., 2002. – 267 с.
7. Частная медицинская микробиология с техникой микробиологических исследований : учеб. пособие / под ред. А. С. Лабинской, Л. П. Блинковой, А. С. Ещиной. – М.: ОАО «Издательство медицина», 2005. – 600 с.
8. Конспект лекцій.

## *Навчальне видання*

### **Спеціальна мікробіологія. Патогенні спірохети. Патогенні гриби. Рикетсії. Хламідії. Мікоплазми. Віруси**

#### **Частина 1. Патогенні спірохети**

#### ***Методичні вказівки з дисципліни «Мікробіологія, вірусологія та імунологія з мікробіологічною діагностикою» для студентів-бакалаврів III–IV курсу***

Упорядники    Мінухін Валерій Володимирович  
                      Коваленко Наталія Іллівна  
                      Замазій Тетяна Миколаївна  
                      Кочнева Олена Володимирівна

Відповідальний за випуск    В. В. Мінухін



Редактор М. В. Тарасенко  
Коректор Є. В. Рубцова  
Комп'ютерна верстка О. Ю. Лавриненко  
Комп'ютерний набір Т. М. Замазій

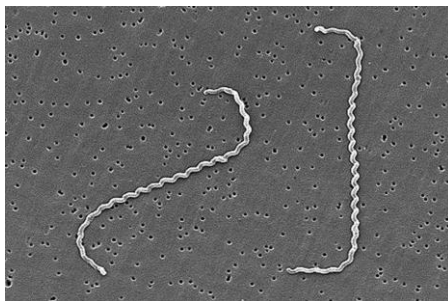
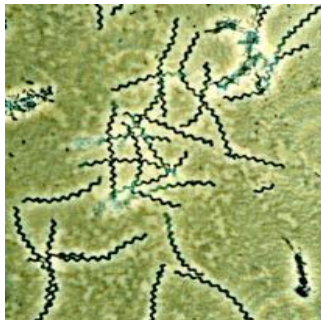
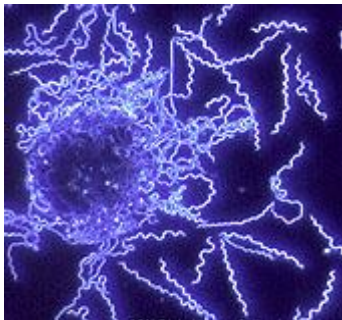
План 2015, поз. 80.  
Формат А5. Ризографія. Ум. друк. арк. 3.3.  
Зам. № 15–3323.

---

**Редакційно-видавничий відділ  
ХНМУ, пр. Леніна, 4, м. Харків, 61022  
izdatknmu@mail.ru, izdat@knmu.kharkov.ua**

Свідectво про внесення суб'єкта видавничої справи до Державного реєстру видавництв, виготівників і розповсюджувачів видавничої продукції серії ДК № 3242 від 18.07.2008 р.





**Спеціальна мікробіологія.  
Патогенні спірохети. Патогенні гриби.  
Рикетсії. Хламідії. Мікоплазми. Віруси**

## **Частина 1. Патогенні спірохети**

***Методичні вказівки з дисципліни  
«Мікробіологія, вірусологія та імунологія  
з мікробіологічною діагностикою»  
для студентів-бакалаврів III–IV курсу***