

*МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Кафедра мікробіології, вірусології та імунології ім. проф. Д.П. Гриньова*

ПРОТОКОЛИ ПРАКТИЧНИХ ЗАНЯТЬ

зі СПЕЦІАЛЬНОЇ МІКРОБІОЛОГІЇ



*МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Кафедра мікробіології, вірусології та імунології ім. проф. Д.П. Гриньова*

ПРОТОКОЛИ ПРАКТИЧНИХ ЗАНЯТЬ

зі СПЕЦІАЛЬНОЇ МІКРОБІОЛОГІЇ

СТУДЕНТА (КИ) II - III КУРСУ

_____ ГРУПИ _____ Ф-ТА

П.І.П. _____

ВИКЛАДАЧ _____

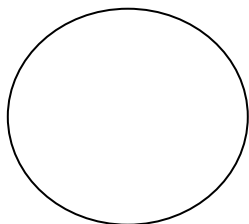
Протоколи практичних занять зі спеціальної мікробіології для студентів 2 - 3 курсу стоматологічного та медичного факультетів //М.М. Мішина, Л.В. Краснікова, Л.С. Габишева, Н.І. Коваленко, В.Л. Ткаченко, Т.М. Замазій, Ю.А. Мозгова, О.С. Дубовик, А.М. Кузьменко, О.К. Балак. - Харків: ХНМУ, 2017. - 172 с.

Протокол № 1

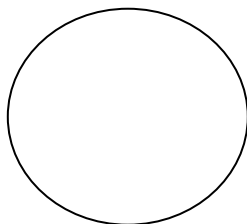
Тема: Мікробіологічна діагностика захворювань, спричинених грамозитивними коками.

Мета: Вивчення основних елементів мікробіологічного дослідження при діагностиці захворювань, викликаних стафілококами і стрептококами.

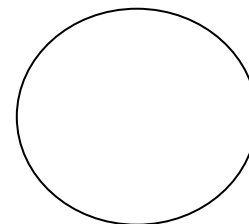
1. Вивчення морфології стафілокока, стрептокока і пневмокока у мазках із чистих культур, фарбованих за Грамом. Замальовання препаратів.



Staphylococcus aureus
(фарбування за Грамом)



Streptococcus pyogenes
(фарбування за Грамом)



Streptococcus pneumoniae
(фарбування метиленовим синім)

2. Вивчення колекції живильних середовищ без посіву:

- а) МПБ для стафілокока;
- б) сироваткові і глюкозні бульйони для стрептокока;
- в) асцитний бульйон для пневмокока;
- г) середовище з вуглеводами (середовище Гісса).

3. Вивчення культурально-біохімічних властивостей:

- а) ріст стафілокока на МПА _____
- б) ріст стафілокока на МПБ _____
- в) ріст стафілокока на і стрептокока на кров'яному агарі _____
- г) ріст стафілокока на жовтково-солевому агарі Чистовича _____

д) середовище з манітом (розкладає патогенний стафілокок) і інуліном (розкладає пневмокок і не розкладає стрептокок);

е) цукролітичні і протеолітичні властивості стафілококів на середовищах Гісса і МПБ:

Вид	Лактоза	Глюкоза	Манніт	Мальтоза	Сахароза	МПБ	
						H ₂ S	Індол
<i>S.aureus</i>	к	к	к	к	к	+	-
<i>S.epidermidis</i>	к	к	-	к	к	+	-
<i>S.saprophyticus</i>	к	к	к	к	К	+	-

4. Ознайомлення з засобами специфічної терапії і профілактики – антистафілококовий імуноглобулін, аутовакцина.

5. Демонстрація антибіотиків, ефективних у відношенні стафілокока та інших грамозитивних коків (цефалоспорино I і II поколінь: цефазолін, цефуросим, цефаклор, цефокситин; пеніциліни: оксацилін, ампіцилін, амоксицилін+клавуланова кислота

(амоксиклав), ампіцилін+оксацилін (ампіокс); фторхінолони: ломефлоксацин, моксіфлоксацин, левофлоксацин; ванкоміцин, кліндаміцин та ін.).

6. Демонстрація чашки Петрі з визначенням чутливості стафілокока до антибіотиків дисковим методом.

7. Вивчення схем лабораторної діагностики стафіло- та стрептококових інфекцій.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Стафілококи. Сімейство Micrococcaceae, рід Staphylococcus.

Морфологія. Стафілококи (від грец. staphyle - виноградне гроно) мають вигляд круглих куль діаметром 0,5-1,5 мкм. Розмножуючись, утворюють скупчення у вигляді грона винограду. Така форма є результатом поділу мікробів в різних площинах. Однак в гної зустрічаються поодинокі і парні коки. Стафілококи нерухомі, не мають спор, при спеціальних умовах культивування утворюють мікрокапсулу, грамположительні.

Культивування. Стафілококи - факультативні анаероби, проте краще ростуть в присутності кисню. Ростуть і розмножуються на звичайних поживних середовищах, добре ростуть на середовищах з кров'ю, оптимальні умови - температура 37⁰С, рН 7,2-7,4.

Елективних середовищами є желточно-сольовий агар і сольовий агар. На МПА колонії стафілокока опуклі, круглі, непрозорі, блискучі, розміром 2-4 мм з рівними краями. При зростанні стафілококи утворюють пігмент: золотистий, лимонно-жовтий або білий. Найкраще пігмент утворюється на молочному середовищі при кімнатній температурі і розсіяному світлі. Стафілококовий пігмент не розчиняється у воді, розчиняється в ацетоні, ефірі, спирті та ін. При зростанні деяких штамів стафілокока на агарі з кров'ю навколо колонії утворюється зона гемолізу. Зростання на бульйоні характеризується рівномірним помутнінням і осадом на дні.

Ферментативні властивості. Стафілококи виробляють сахаролітичні та протеолітичні ферменти. Сахаролітичні ферменти розщеплюють ряд сахарів: лактозу, глюкозу, сахарозу, мальтозу, гліцерину та інших з утворенням кислоти.

Протеолітичні властивості стафілокока виражаються в здатності розчинити казеїн, розчинити желатин (поступово), розщеплювати інші білкові субстрати.

Стафілококи продукують ферменти патогенності: 1) коагулазу (згортає плазму крові); 2) гіалуронидазу (фактор розподілу); 3) лецитиназу (розчиняє лецитин оболонки кліток); 4) фібринолізин (лізує фібрин); 5) ДНКазу (деполімеризує ДНК); 6) фосфатазу і др.

Наявність плазмокоагулаза дозволяє диференціювати золотистий стафілокок від стафілококів інших видів. Багато стафілококи виробляють пенициліназу, руйнуючи пеніцилін.

Токсинутворення. Стафілококи виробляють екзотоксини. До їх числа відносяться гемолізін чотирьох типів, з яких найбільше значення має α -токсин. Він має такі властивості: гемолітичним - викликає гемоліз еритроцитів, дермонекротическим - при внутрішньошкірне введення викликає некроз, летальним - при внутрішньовенному введенні призводить до загибелі чутливих до нього тварин. Крім гемолизинов стафілококи утворюють лейкоцидін, що вбиває лейкоцити, ентеротоксини шести типів, що викликають харчові отруєння, ексfolіатін двох типів, що призводять до відшарування епідермісу у новонароджених дітей.

Антигенна структура. Стафілококи мають протейновий антиген А, загальний для всіх золотистих стафілококів, і полісахаридні антигени: А, Б, С. Стафілококи виділяють бактеріюцини (стафілоціни), які володіють антагоністичною дією по відношенню до мікроорганізмів даного роду. Серед золотистих (рідше епідермальних) стафілококов розрізняють близько 40 фаговаров. Визначення чутливості виділених з різних об'єктів

стафілококових культур до типових фагів має важливе епідеміологічне значення (при встановленні джерела і шляхів передачі збудника).

Класифікація. В даний час стафілококи, виділені від людини, ділять на 3 види: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*.

Стійкість до факторів навколишнього середовища. Стафілококи досить стійкі, тому вони виявляються в повітрі, ґрунті, воді, на предметах побуту. При температурі 100⁰С вони гинуть моментально, при температурі 70⁰С - через 10-15 хв. Вони добре переносять низькі температури. При заморожуванні зберігають життєздатність протягом декількох років. Добре переносять висушування. Пряме сонячне світло вбиває їх тільки через кілька годин. Звичайні розчини дезінфікуючих речовин (наприклад, сулема в розведенні 1: 1000) вбивають їх через 15-20 хв. При знешкодженні виділень, що містять гній, білок, мокроту, не слід застосовувати фенол. Це дезінфікуючий речовина викликає коагуляцію білків, що оберігає мікроорганізми від загибелі. Стафілококи чутливі до діамантового зеленого.

Сприйнятливість тварин. До стафілококу чутливі велика і дрібна рогата худоба, коні, свині, кури. З експериментальних тварин - кролики, білі миші і кошенята.

Джерела інфекції. Хвора людина і бактеріоносій.

Шляхи передачі. Контактно-побутовий, повітряно-крапельний, повітряно-пиловий, харчовий.

Захворювання у людини. Піодермія, фурункули, карбункули, панариції, абсцеси; запальні процеси різних органів і тканин; ангіни, цистити, остеомієліти, холецистити, мастити; сепсис і септикопиемия; харчові токсикоінфекції та багато інших. Описано близько 120 нозологічних форм стафілококової етіології.

Патогенез. Стафілококи проникають через шкіру і слизові оболонки.

Переважне значення при стафілококових захворюваннях має золотистий стафілокок (*S. aureus*). Менш виражена роль в патології людини *S. epidermidis* і *S. saprophyticus*. Патогенез обумовлюється властивостями збудника - ферментами, екзотоксинами, речовинами бактеріальної клітини і станом імунної системи макроорганізму.

Найчастіше уражається шкіра і підшкірна клітковина - виникають піодерміти, фурункули, панариції. Нерідко стафілококи обумовлюють вторинні захворювання, наприклад пневмонію при грипі. Вони також викликають ранові інфекції. Особливо велика роль стафілококів в акушерській практиці, так як новонароджені дуже чутливі до них. Протягом стафілококових захворювань має значення розвиток алергії, тому захворювання характеризуються рецидивами.

Особливе місце серед стафілококових захворювань займають харчові інтоксикації. Клінічно вони протікають як токсикози, супроводжуються блювотою, проносом, головним болем і іншими явищами.

Імунітет. У людини є природна резистентність, пов'язана з механічними факторами, фагоцитозу і наявністю антитіл. Запальний процес, що виникає в місці проникнення збудника, обумовлює затримку стафілококів і ускладнює їх поширення по організму. У утворився вогнищі стафілококи піддаються фагоцитозу.

Утворений в процесі захворювання антитоксин є важливим фактором у загальному комплексі імунітету. Однак набутий імунітет нестійкий, тому спостерігаються рецидиви.

Профілактика. Зводиться до поліпшення санітарно-гігієнічних умов, активного виявлення хворих і бактеріоносіїв, правильного режиму роботи лікарняних закладів.

Специфічна профілактика. Стафілококовий анатоксин і антистафілококовий імуноглобулін.

Лікування. Антибактеріальні препарати, полівалентний стафілококовий бактеріофаг, антистафілококовий плазма і імуноглобулін. У деяких випадках при хронічному перебігу стафілококових інфекцій застосовують аутовакцину.

Мікробіологічна діагностика стафілококових інфекцій.

Матеріалом для досліджень є гній, кров, відокремлюване слизової оболонки, спинномозкова рідина, мокротиння, сеча, а при харчових отруєннях – блювотні маси, промивні води шлунку.

Добір патологічного матеріалу звичайно виконують стерильними квачами, які вносять у пробірку з транспортним живильним середовищем для контролю стерильності (СКС). Із закритих гнійних вогнищ матеріал беруть за допомогою шприца. Мокротиння, сечу, блювотні маси та промивні води шлунку поміщають у стерильні пробірки, банки. Кров висівають біля ліжка хворого в живильне середовище на основі СКС у співвідношенні 1:10.

Використовують мікроскопічний та бактеріологічний методи.

Мікроскопічний метод. З матеріалу, який досліджується (за виключенням крові) готують мазки, фарбують за Грамом. Грампозитивні стафілококи, діаметром 0,5-1,5 мкм, розташовуються в мазках найчастіше у вигляді скупчень, що нагадують грона винограду. Також вони можуть виявлятися поодиночі, парами, короткими ланцюжками.

Мікроскопічне дослідження не дозволяє ідентифікувати стафілококи, але дає можливість зорієнтуватися у виборі живиль середовищ для виділення чистої культури мікробів.

Бактеріологічний метод. Включає виділення чистої культури мікробів з досліджуваного матеріалу та їх ідентифікацію.

Патологічний матеріал висівають на кров'яний агар, жовточно-солевий агар та інкубують в термостаті 18-24 годин при температурі 37⁰С.

Через добу вивчають колонії, які виростили на поживному середовищі. Стафілококи утворюють опуклі непрозорі колонії середньої величини (1-3 мм), гомогенної структури, гладенькі з рівними краями.

Колонії *S. aureus* на кров'яному агарі оточені зоною гемолізу і часто мають золотистий пігмент. На жовтково-солевому агарі (ЖСА) колонії цього виду стафілококів оточені райдужним вінцем помутніння середовища, яке каламутніше, оскільки ці мікроорганізми здатні продукувати лецитиназу.

З ізольованих колоній, які виростили на щільному живильному середовищі готують мазок, фарбують за Грамом, мікроскопують. Частина колонії, яка залишилась, пересівають на скошений м'ясо-пептонний агар й ставлять його в термостат для збільшення кількості виділених мікробів. Через 18-24 годин з мікробного нальоту, що утворився на скошеному агарі, готують мазок, фарбують за Грамом, мікроскопують. Впевнившись, що культура виділених мікробів чиста, приступають до вивчення комплексу їх біологічних властивостей з метою видової ідентифікації стафілококів до виду.

Для диференціації *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* ставлять реакцію плазмокоагуляції, визначають ДНК-азну активність, фосфатазу, здатність розщеплювати маніт в анаеробних умовах, викликати некроз шкіри у кроля.

Реакція плазмокоагуляції. У пробірку наливають 0,5 мл розведеної 1:5 кролячої плазми і петлею вносять в неї добову агарову культуру стафілококу. Пробірку поміщають в термостат. Поява драглеподібного згустку свідчить про наявність у штаму, який вивчається, ферменту плазмокоагулази. Це є характерним для *S. aureus*.

Визначення ДНК-ази. На поверхню м'ясо-пептонного агару, який містить ДНК, засівають штрихом добову агарову культуру стафілококу і поміщають в термостат на 24 години. Після інкубації поверхню агару заливають 1 N розчином соляної кислоти. Якщо стафілококи продукують ДНК-азу, то навколо колоній залишається зона просвітління.

Визначення фосфатази. На чашку з фенолфталеїновим агаром висівають виділену культуру стафілококу. Колонії, які виростили через 18-24 години, оброблюють парами аміаку. Поява рожевого забарвлення колоній свідчить про позитивну реакцію.

Токсигенність виділених культур стафілококів визначають в досліді *in vitro* за допомогою реакції дифузної преципітації в гелі.

Для встановлення джерела інфекції визначають фаговар патогенних стафілококів.

Стрептококи. Сімейство Streptococcaceae, рід Streptococcus.

До роду *Streptococcus* відносяться: *Streptococcus pyogenes* (гноєрідний) і *Streptococcus pneumoniae* (пневмокок).

Streptococcus pyogenes (гноєрідний)

Морфологія. Стрептококи - це коки, що мають кулясту форму. Діаметр кожного кока в середньому 0,6-1 мкм, однак для них характерний поліморфізм: зустрічаються дрібні і великі коки, строго кулясті і овальні. Стрептококи розташовуються ланцюжком, що є результатом поділу їх в одній площині. Довжина ланцюжків різна. На щільному живильному середовищі ланцюжка зазвичай короткі, на рідких - довгі. Стрептококи нерухомі, не мають спор. Свежевиделення культури іноді утворюють капсулу. На ультратонких зрізах видно мікрокапсулу, під нею розташована тришарова клітинна стінка і тришарова цитоплазматична мембрана. Грамположительні.

Культивування. Стрептококи - факультативні анаероби. Ростуть при температурі 37°C і рН середовища 7,6-7,8. Оптимальними середовищами для їх вирощування є середовища, що містять кров або сироватку крові. На щільних поживних середовищах колонії стрептококів дрібні, плоскі, мутні, сіруватого кольору. На агарі з кров'ю деякі різновиди стрептококів утворюють гемоліз. β -Гемолитическіе стрептококи проявляються у вигляді чіткої зони гемолізу, α -гемолітичні стрептококи утворюють невелику зелену зону (результат переходу гемоглобіну в метгемоглобін). Зустрічаються стрептококи, що не дають гемолізу.

На цукровому бульйоні стрептококи ростуть з утворенням пристінкового і придонного дрібнозернистого осаду, бульйон при цьому залишається прозорим.

Ферментативні властивості. Стрептококи мають сахаролитическою властивостями. Вони розщеплюють глюкозу, лактозу, сахарозу, маніт (не завжди) і мальтозу з утворенням кислоти. Протеолітичні властивості у них слабо виражені. Вони згортають молоко, желатин не розріджують.

Токсиноутворення. Стрептококи утворюють ряд екзотоксинів: 1) стрептолізин - руйнують еритроцити (О-стрептолізин володіє кардіотоксичної дії); 2) лейкоцидін - руйнує лейкоцити (утворюється високовірулентних штамми); 3) еритрогенний (скарлатинозний) токсин - обумовлює клінічну картину скарлатини - інтоксикацію, судинні реакції, висип та ін. Синтез еритрогенний токсину детермінований профагом; 4) цитотоксини - мають здатність викликати гломерулонефрит.

Токсиноутворення. Стрептококи утворюють ряд екзотоксинів: 1) стрептолізин - руйнують еритроцити (О-стрептолізин володіє кардіотоксичної дії); 2) лейкоцидін - руйнує лейкоцити (утворюється високовірулентних штамми); 3) еритрогенний (скарлатинозний) токсин - обумовлює клінічну картину скарлатини - інтоксикацію, судинні реакції, висип та ін. Синтез еритрогенний токсину детермінований профагом; 4) цитотоксини - мають здатність викликати гломерулонефрит.

Антигенна структура і класифікація. У стрептококів виявлені різні антигени. У цитоплазмі клітини міститься видовий Нуклеопротеїдні природи антиген - єдиний для всіх стрептококів. На поверхні клітинної стінки розташовані протеїнові типові антигени. У клітинній стінці стрептококів виявлений полісахаридних груповий антиген.

По складу полісахаридной групоспецифічною фракції антигену все стрептококи діляться на групи, що позначаються великими латинськими літерами А, В, С, D та ін. до S. Крім груп, стрептококи поділені на серологічні типи, які позначаються арабськими цифрами.

Група А включає 70 типів. У цю групу входить більшість стрептококів, що викликають різні захворювання у людини. Група В включає в основному умовно-патогенні для людини стрептококи. Група С включає патогенні для людини і тварин стрептококи. Група D складається з непатогенних для людини стрептококів, проте в цю групу входять ентерококи, які є мешканцями кишкового тракту людини і тварин. Потрапляючи в інші органи, вони обумовлюють запальні процеси: холецистити, пієліти і ін. Таким чином, їх можна віднести до умовно-патогенних мікробів.

Належність виділених культур до однієї з серологічних груп визначають за допомогою реакції преципітації з груповими сироватками. Для визначення серологічних типів використовують реакцію аглютинації з типоспецифічними сироватками.

Стійкість до факторів навколишнього середовища. Стрептококи досить стійкі в навколишньому середовищі. При температурі 60⁰С гинуть через 30 хв.

У висушеному гної і мокроті вони зберігаються місяцями. Звичайні концентрації дезінфікуючих речовин гублять їх через 15-20 хв. Ентерококи значно стійкіше, дезінфікуючі розчини вбивають їх тільки через 50-60 хв.

Сприйнятливість тварин. До патогенних стрептококів чутливий рогата худоба, коні, собаки, птахи. З лабораторних тварин чутливі кролики і білі миші. Однак стрептококи, патогенні для людини, не завжди патогенні для експериментальних тварин.

Джерела інфекції. Люди (хворі і носії), рідше тварини або інфіковані продукти.

Шляхи передачі. Повітряно-крапельний і повітряно-пиловий, іноді харчової, можливий контакт-побутовий.

Захворювання можуть виникати в результаті екзогенного зараження, а також ендогенно - при активації умовно-патогенних стрептококів, що мешкають на слизових оболонках зівя, носоглотки, піхви. Зниження опірності організму (охолодження, голодування, перевтома і ін.) може привести до виникнення аутоінфекції. Велике значення в патогенезі стрептококових інфекцій має попередня сенсibiliзація - як наслідок раніше перенесеного захворювання стрептококової етіології.

При проникненні в кров'яне русло стрептококи обумовлюють важко протікає септичний процес.

Захворювання у людини найчастіше викликають β-гемолітичні стрептококи серологічної групи А. Вони продукують ферменти патогенності: гиалуронидазу, фібринолізин (стрептокиназу), дезоксирибонуклеазу і ін. Крім того, у стрептококів виявляють капсулу, М-протеїн, що володіють антифагоцитарної властивостями.

Стрептококи викликають у людини різні гострі і хронічно протікають інфекції, як з утворенням гною, так і не нагноїтельніє, що розрізняються по клінічній картині і патогенезу. Нагноїтельніє - флегмони, абсцеси, ранові інфекції, ненагноїтельніє - гострі інфекції верхніх дихальних шляхів, бешиха, скарлатина, ревматизм та ін.

Стрептококи часто викликають вторинні інфекції при грипі, кору, кашлюку та інших захворюваннях і нерідко ускладнюють ранові інфекції.

Імунітет. За характером імунітет - антиоксичний і антибактеріальний. Постінфекційний антимікробний імунітет малонапружений. Це пояснюється слабкою иммуногенностью стрептококів і великою кількістю сероварів, що не дають перехресного імунітету. Крім цього, при стрептококових захворюваннях спостерігається алергізація організму, чим пояснюють схильність до рецидивів.

Профілактика. Зводиться до санітарно-гігієнічним заходам, зміцненню загальної резистентності організму. Специфічна профілактика не розроблена.

Лікування. Застосовують антибіотики. Найчастіше використовують пеніцилін, до якого стрептококи не набули стійкості, а також еритроміцин і тетрациклін.

Значення стрептокока в етіології ревмокардіта. Патогенез ревмокардіта вивчений недостатньо. Але на користь ролі стрептокока у розвитку цього захворювання говорить ряд фактів:

1. У хворих ревмокардитом із зіву висівають В-гемолітичний стрептокок.
 2. Ревматизм часто виникає після перенесеної ангіни, тонзилітів, фарингітів, сенсibiliзуючих організм.
 3. У сироватці крові хворих виявляють антистрептолізін, антистрептогіалуронідази - антитіла до стрептококовим ферментам, токсинів.
 4. Непрямим підтвердженням ролі стрептокока є успішне лікування пеніциліном.
- Останнім часом у виникненні хронічних форм ревмокардіта надають значення L-форм стрептокока.

Профілактика загострень ревмокардіта зводиться до попередження стрептококових захворювань (наприклад, навесні і восени проводять профілактичний курс введення пеніциліну). Лікування зводиться до застосування антибактеріальних препаратів - пеніциліну.

Значення стрептокока в етіології скарлатини. Г. Н. Габричевский (1902) вперше висловив припущення про те, що гемолітичний стрептокок є збудником скарлатини. Але так як стрептококи, що виділяються при інших захворюваннях, не відрізнялися від збудників скарлатини, то ця думка не всіма поділялося. В даний час встановлено, що скарлатину викликають стрептококи групи А, що виробляють еритрогенний токсин.

У перехворілих виникає імунітет - стійкий, антитоксичний. Його напруженість визначають постановкою реакції Діка - внутрішньошкірне введення еритрогенний токсину. У не хворіли навколо місця введення виникають гіперемія і набряк, що характеризується як позитивна реакція (відсутність антитоксина в сироватці крові). У перехворілих така реакція відсутня, так як утворився у них антитоксин нейтралізує еритрогенний токсин.

Профілактика. Ізоляція, госпіталізація. Контактним, ослабленим дітям вводять гамма-глобулін. Специфічна профілактика не розроблена.

Лікування. Використовують пеніцилін, тетрациклін. У важких випадках вводять антитоксичну сироватку.

Мікробіологічна діагностика стрептококової інфекції.

Матеріалом для дослідження є гній, відокремлюване із зіву та носа, ліквор, мокротиння, кров, сеча, вміст везикул, пустул.

Матеріал відбирають одноразовим шприцом або стерильним ватним тампоном, який поміщають у пробірку із транспортним живильним середовищем (СКС- середовище для контролю стерильності).

Кров для бактеріологічного дослідження в об'ємі 5-10 мл засівають в цукровий бульйон безпосередньо біля ліжка хворого таким чином, щоб співвідношення крові та живильного середовища було б не менш ніж 1:10 – 1:20. Термін передачі патологічного матеріалу в бактеріологічну лабораторію не повинен перебільшувати двох годин.

Мікробіологічну діагностику стрептококових захворювань проводять мікроскопічним, бактеріологічним та серологічним методами.

Мікроскопічний метод. З матеріалу, який досліджується готують мазок і фарбують його за Грамом. При мікроскопії в мазку виявляються грампозитивні коки, які розташовуються короткими ланцюжками, іноді попарно чи у вигляді одиничних коків. На основі вивчення морфологічних і тінкторіальних властивостей неможливо визначити рід виявлених в препараті мікробів.

Для виявлення патогенного стрептококу, в отриманому від хворого клінічному матеріалі, використовують реакцію імунофлюоресценції (РІФ). В цьому випадку використовують специфічні сироватки, в яких антитіла проти стрептококів помічені флюорохромом.

Бактеріологічний метод є основним в діагностиці стрептококових захворювань. Взятий для дослідження матеріал висівають в середовище збагачення, в якості якого використовують середовище для контролю стерильності (СКС). Після інкубації в термостаті матеріал, що досліджується пересівають на цукровий бульйон і на 5% кров'яний агар з метою виділення чистої культури мікробів, вивчення культуральних властивостей та виду його гемолізу. Висіви поміщають у ексикатор зі щільно притертою кришкою та запаленою в середині свічкою, або в анаеростат, де створюють підвищену концентрацію двоокису вуглецю. Інкують в термостаті при температурі 37°C протягом 18-24 годин. На цукровому бульйоні *S. pyogenes* дає придонно-пристінковий ріст з утворенням дрібнозернистого осаду і збереженням повної прозорості середовища. *S. bovis* викликає інтенсивне помутніння бульйону з утворенням невеликого гомогенного осаду. У виготовлених з бульйонної культури мазках стрептококи розташовуються звичайно у вигляді типових для них довгих ланцюжків.

На кров'яному агарі стрептококи утворюють дрібні (1-2 мм в діаметрі) прозорі або напівпрозорі колонії сірувато-білого кольору. За типом гемолізу на кров'яному агарі стрептококи поділяють на три групи.

Перша група представлена β -гемолітичними стрептококами, здатними викликати повний лізис еритроцитів (повне просвітлення середовища) навколо колоній. Колонії прозорі, слизові, круглої форми, нагадують краплі роси. Це характерно для свіжовиділених штамів *S. pyogenes*. Блискучі колонії характерні для багатьох штамів *S. agalactiae*.

Друга група представлена α -гемолітичними стрептококами, які викликають на кров'яному агарі неповний гемоліз у вигляді напівпрозорої зони зеленуватого відтінку. Зеленаші стрептококи ростуть у вигляді дрібних колоній сіруватого кольору з гладкою чи шорсткою поверхнею. Такий ріст характерний для багатьох видів стрептококів, вегетуючих на слизовій оболонці порожнини рота (*S. salivarius*, *S. mutans*, *S. oralis* та ін.)

Третя група представлена негемолітичними γ -стрептококами. Вони не викликають змін кров'яного агару у процесі свого росту, мають слабо виражену вірулентність.

З підозрілих колоній готують мазки, фарбують за Грамом і мікро-скопують. Колонії, які вирости на кров'яному агарі, пересівають на скошений кров'яний агар. Висіви інкують в термостаті при температурі 37°C на протягом 18-24 годин. З метою перевірки чистоти виділеної культури, з мікробного нальоту, що виріс на скошеному агарі готують мазок, фарбують за Грамом, мікроскопують. У випадку, коли культура мікробів чиста, продовжують вивчати їх біохімічні та антигенні властивості. Для встановлення видової приналежності стрептококів найбільше значення мають наступні тести: тип гемолізу на кров'яному агарі, проба на каталазу, чутливість до бацитрацину й сульфаніламідів (сульфаметоксазолу та триметоприму), жовчно-ескуліновий тест, ріст в бульйоні з 6,5% NaCl, наявність піролідоніларіламідози (PYR), гідроліз гіпурату натрію.

Проба на каталазу. Тест заснований на здатності мікроорганізмів, які мають цей фермент, розщеплювати перекис водню з утворенням кисню і води. Для постановки цього тесту чисту культуру поміщають у краплину 3-10% розчину перекису водню на предметному склі і розтирають круговими рухами. В позитивному випадку спостерігають виділення пухирців газу. На відміну від стафілококів, стрептококи не мають цього ферменту.

Проба с бацитрацином і сульфаніламидами. Для попередньої ідентифікації *S. pyogenes* і β -гемолітичних стрептококів груп С та G використовують два паперових диски, один з яких просякнутий розчином антибіотика бацитрацина, а другий – сумішшю сульфаметоксазолу та триметоприма. Диски поміщають на чашку з кров'яним агаром, засіяним культурою, яку випробовують та інкують 18-24 години в аеробних умовах. Будь-яка видима зона затримки росту навколо дисків інтерпретується як чутлива до цих

антимікробних препаратів. Абсолютна більшість штамів *S. pyogenes* чутлива до бацитрацину, а стрептококи груп C і G – до сульфаніламідів.

Жовчно-ескуліновий тест. Використовується для попередньої ідентифікації стрептококів *S. bovis*, які ростуть на жовчно-ескуліновому агарі з утворенням колоній темно-брунатного чи чорного кольору.

Ріст в бульйоні з 6,5% розчином NaCl. *S. agalactiae* на відміну від інших стрептококів стійкий до високої концентрації хлористого натрію і дає ріст в бульйоні через 24-48 години інкубації в термостаті при температурі 37°C.

PYR-тест. В основі тесту лежить виявлення ферменту піролідоніламідози, яка є у більшості штамів *S. pyogenes* і не зустрічається в інших стрептококів. Культуру, яку досліджують, петлею вносять в живильний бульйон, що містить 0,01% L-піролідоніл-β-нафтиламід у та інкубують при температурі 37°C протягом 4 годин. Після додавання однієї краплі диметиламіноацетинамальдегіда в позитивному випадку з'являється яскраво-червоне забарвлення.

Гідроліз гіпурату натрію. В основі даного тесту лежить здатність *S. agalactiae* викликати гідроліз гіпурату натрію. Виділену чисту культуру з допомогою петлі диспергують у 1% водному розчині гіпурату натрію. Через 2 години інкубації при температурі 37°C додають 3,5% розчин нінгідрину у суміші бутанолу і ацетону (1:1). При позитивному результаті після інкубації на протязі 10 хв. з'являється пурпурне забарвлення.

Диференціація стрептококів за антигенною структурою. Ґрунтується на виявленні полісахаридного антигену клітинної стінки стрептококу. Наприклад застосовують реакцію преципітації з групспецифічними сироватками груп А, В, С, G. Ці сироватки наливають у 4 вузькі преципітаційні пробірки. Екстракт, отриманий після обробки центрифугату чистої культури стрептококу розчином хлористо-водневої кислоти, обережно, не зміщуючи рідини, нашаровують на групспецифічні сироватки. При позитивній реакції на межі двох рідин з'являється біле кільце. Звичайно реакція преципітації виникає через 5-30 хв.

Серологічний метод діагностики стрептококових захворювань знайшов використання у разі встановлення діагнозу ревматизму. Для цього в сироватці крові хворого визначають титр антитіл до екстрацелюлярних продуктів стрептококу – стрептолізину-О. Досліджують парні сироватки хворого з інтервалом 7-10 діб. Препарат стрептолізину-О, який випускають у сухому вигляді, розчинюють та вносять в кожну пробірку з розведеною сироваткою. У день постановки досліду готують 5% завись еритроцитів дефібринованої крові кролика і також вносять в кожну пробірку.

Реакція базується на нейтралізації здатності стрептолізину-О розчиняти еритроцити *in vitro* у випадку присутності в сироватці хворого антитіл проти стрептококу (антистрептолізину-О). Максимально розведена сироватка у пробірці забезпечує затримку гемолізу еритроцитів і вказує на відповідну кількість антистрептолізину-О.

Титр антистрептолізину-О у практично здорових осіб не перевищує 250 міжнародних одиниць. При гострих і хронічних стрептококових інфекціях він наростає, причому за наявності ревматизму чи нефриту з перших днів захворювання відмічається дуже високий титр антитіл (500 од. і вище).

***Streptococcus pneumoniae* (пневмокок)**

Морфологія. Пневмококки - це диплококи, у яких сторони кліток, звернені один до одного, сплюснені, а протилежні сторони витягнуті, тому вони мають ланцетовидну форму, що нагадує полум'я свічки. Розмір пневмококів 0,75-0,5 × 0,5-1 мкм, розташовуються вони парами. У рідких поживних середовищах часто утворюють короткі ланцюжки, набуваючи схожість зі стрептококами. Пневмококки нерухомі, не мають спор, в організмі утворюють капсулу, навколишнє обидва кока. У капсулі міститься термостійке речовина антифагін

(захищає пневмокок від фагоцитозу і дії антитіл). При зростанні на штучних поживних середовищах пневмококи втрачають капсулу. Пневмококки грамположительні. У старих культурах зустрічаються грамнегативні бактерії.

Культивування. Пневмококки - факультативні анаероби. Ростуть при температурі 36-37⁰С і рН середовища 7,2-7,4. Вони вимогливі до середих, так як не можуть синтезувати багато амінокислот, тому ростуть тільки на середовищах з додаванням нативного білка (крові або сироватки). На агарі з сироваткою утворюють дрібні, ніжні, досить прозорі колонії. На агарі з кров'ю виростають вологі колонії зеленувато-сірого кольору, оточені зеленою зоною, що є результатом переходу гемоглобіну в метгемоглобін. Пневмококки добре ростуть в бульйоні з додаванням 0,2% глюкози і в бульйоні з сироваткою. Зростання в рідких середовищах характеризується дифузним помутнінням і пилоподібним осадом на дні.

Ферментативні властивості. Пневмококки мають досить виражену сахаролітичну активність. Вони розщеплюють: лактозу, глюкозу, сахарозу, мальтозу, інулін з утворенням кислоти. Не ферментують маніт. Протеолітичні властивості у них виражені слабо: молоко вони згортають, желатин не розріджують, індол не утворюють. Пневмококки розчиняються в жовчі. Розщеплення інуліну і розчинення в жовчі є важливою діагностичною ознакою, що відрізняє *Streptococcus pneumoniae* від *Streptococcus pyogenes*.

Фактори патогенності. Пневмококки продукують гіалуронідазу, фібринолізин та ін.

Токсинутворення. Пневмококки утворюють ендотоксин, гемолізін, лейкоцидін. Вірулентність пневмококів пов'язана також з наявністю в капсулі антифагін.

Антигенна структура і класифікація. У цитоплазмі пневмококів є загальний для всієї групи протейновий антиген, а в капсулі - полісахаридних антиген. За полісахаридних антигенів все пневмококи поділяють на 84 сероварів. Серед патогенних для людини найбільш часто зустрічаються I, II, III сероварів.

Стійкість до факторів навколишнього середовища. Пневмококки відносяться до групи нестійких мікроорганізмів. Температура 60⁰С губить їх через 3-5 хв. До низьких температур і висушування вони досить стійкі. У висушеної мокроті зберігають життєздатність до 2 міс. На живильному середовищі вони зберігаються не більше 5-6 днів. Тому при культивуванні необхідно робити пересівання через кожні 2-3 дні. Звичайні розчини дезінфікуючих речовин: 3% фенол, сулема в розведенні 1: 1000 гублять їх через кілька хвилин.

Особливо чутливі пневмококи до оптохіну, який вбиває їх в розведенні 1: 100000.

Сприйнятливості тварин. Природним господарем пневмококів є людина. Однак пневмококи можуть викликати захворювання у телят, ягнят, поросят, собак і мавп. З експериментальних тварин до пневмококи високочутливі білі миші.

Джерела інфекції. Хвора людина і бактеріоносій.

Шляхи передачі. Повітряно-крапельний шлях, може бути повітряно-пиловий.

Вхідні ворота. Слизова оболонка верхніх дихальних шляхів, очей і вуха.

Захворювання у людини. Пневмококки можуть викликати гнійно-запальні захворювання різної локалізації. Специфічними для пневмококів є:

- 1) крупозна пневмонія;
- 2) повзуча виразка рогівки;
- 3) отит.

Найбільш частим захворюванням є крупозна пневмонія, захоплюючи одну, рідше дві або три частки легкого. Захворювання протікає гостро, супроводжується високою температурою, кашлем. Закінчується зазвичай критично.

Імунітет. Після перенесеного захворювання залишається нестійкий імунітет, так як пневмонія характеризується рецидивами.

Профілактика. Зводиться до санітарно-профілактичних заходів. Специфічна профілактика не розроблена.

Лікування. Використовують антибіотики - пеніцилін, тетрациклін та ін.

Мікробіологічне дослідження.

Матеріал для дослідження: харкотиня (пневмонія), слиз із зіву (ангіна), Виділення з виразки (повзуча виразка рогівки), виділення з вуха (отит), гній (абсцес), плевральний пунктат (плеврит), кров (підозра на сепсис).

Основні методи дослідження:

1. Мікроскопічний.
2. Мікробіологічний.
3. Біологічний.

Біологічна проба. Трохи (3-5 мл мокротиння) емульгують в стерильному бульйоні, 0,5 мл цієї суміші вводять внутрішньочеревно білої миші. Через 6-8 год у миші відзначаються ознаки захворювання. В цей час пневмокок вже можна виявити в ексудаті черевної порожнини. Ексудат беруть стерильним шприцом. З нього роблять мазки, фарбують за Грамом і проводять мікроскопію. Для виділення чистої культури ексудат засівають на агар з сироваткою. Якщо миша гине або захворює, роблять посів крові з серця на агар з сироваткою крові для виділення чистої культури. Посіви ставлять в термостат.

Прискорений метод визначення типу пневмокока (реакція мікроаглютинації). 4 краплі ексудату з черевної порожнини зараженої миші наносять на предметне скло. До першої краплі додають агглютинують сироватку I типу, до другої - сироватку II типу, до третьої - III типу, до четвертої - ізотонічний розчин натрію хлориду (контроль).

Сироватки I і II типу попередньо розводять у співвідношенні 1:10, а сироватку III типу - 1: 5. Всі краплі розмішують, висушують, фіксують і забарвлюють розведеним фуксином. При позитивному результаті в одній з крапель відзначається скучиваніє мікробів (аглютинація).

Посіви виймають з термостата, переглядають і з підозрілих колоній роблять мазки. При наявності в мазках грампозитивних ланцетовідних диплококов 2-3 колонії виділяють на скошений агар з сироваткою для отримання чистої культури. Посіви поміщають в термостат. З бульйону роблять мазки, фарбують за Грамом і проводять мікроскопію.

Посіви виймають з термостата. Перевіряють чистоту культури - роблять мазки, фарбують за Грамом і проводять мікроскопію. При наявності в виділеній культурі грампозитивних ланцетовідних диплококов проводять ідентифікацію виділеної культури шляхом посіву:

- 1) на середовища Гісса (лактоза, глюкоза, сахароза, мальтоза) проводять посів звичайним способом - уколом в середу;
- 2) на середу з інουλін;
- 3) на середу з оптохіном;
- 4) ставлять пробу з жовчю.

Проба на інулін. Досліджувану культуру засівають на живильне середовище, що містить інулін і лакмусовий настійку, і ставлять в термостат. Через 18-24 год посіви виймають з термостата. При наявності пневмококів середовище забарвлюється в червоний колір (стрептококи консистенцію і колір середовища не змінюють).

Визначення чутливості до оптохіну. Виділену культуру засівають на 10% агар з кров'ю, що містить оптохін 1: 50000. Пневмококи, на відміну від стрептококів, не ростуть на середовищах, що містять оптохін.

Проба з жовчю. У агглютинаційні пробірки наливають по 1 мл досліджуваної бульйонної культури. В одну з них додають краплю кролячій жовчі, друга пробірка служить контролем. Обидві пробірки поміщають в термостат. Через 18-24 год настає лізис

пневмококів, який виражається в просвітління мутного бульйону. В контролі суспензія залишається каламутною.

Пробу з жовчю можна поставити на щільному живильному середовищі. Для цього на колонію пневмококів, які виростили в чашках з агаром і сироваткою, наносять крупинку сухої жовчі - колонія розчиняється - зникає.

В даний час широко використовуються серологічні методи дослідження (РСК і РИГА) для визначення стрептококових антитіл. Визначення групи і серовар виділеної культури проводять за допомогою флуоресцентних антитіл.

Визначення вірулентності пневмокока. Добову бульйонну культуру пневмокока розводять 1% пептонною водою від 10^{-2} до 10^{-8} , 0,5 мл кожного розведення вводять двом білим мишам. Культуру, що викликала загибель мишей в розведенні 10^{-7} , оцінюють як вірулентну, в розведенні 10^{-4} - 10^{-6} счітають середнєвірулентной. Культура, що не викликала загибель мишей, авірулентніе.

Теоретичні питання:

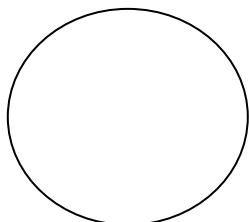
1. Морфологічні, культуральні, біохімічні властивості стафілококів і стрептококів.
2. Принципи класифікації стафілококів (епідермальні, золотисті) і стрептококів.
3. Захворювання, викликані цими мікроорганізмами.
4. Поширення грамполозитивних коків у природі. Потенційно-патогенні.
5. Носійство стафілококів.
6. Шляхи зараження, патогенез.
7. Схема мікробіологічної діагностики інфекційних захворювань, викликаних грамполозитивними коками.

Протокол № 2

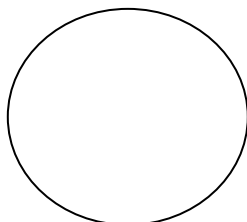
Тема: Мікробіологічна діагностика захворювань, спричинених грамнегативними коками.

Мета: Вивчення методів мікробіологічної діагностики захворювань, викликаних менінгококами і гонококами.

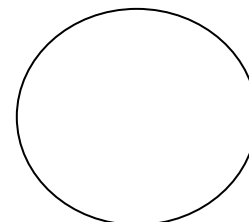
1. Мікроскопія і замалювання демонстраційних препаратів: мазків із чистої культури менінгокока і гонокока (фарбування за Грамом) і із гною хворого на гонорею – незавершений фагоцитоз (фарбування метиленовим синім).



Neisseria meningitidis
(фарбування за Грамом)



Neisseria gonorrhoeae
(фарбування за Грамом)



Neisseria gonorrhoeae
(фарбування метиленовим синім)

2. Вивчення живильних середовищ:

- а) сироватковий агар;
- б) асцитичний агар;
- в) шоколадний агар.

Культури інкубують при 37⁰С і підвищеним вмістом CO₂ (8-10%). Носоглоткові змиви сіють на агар з антибіотиками (ванкоміцином, колістином, ністатином), які затримують ріст інших мікроорганізмів.

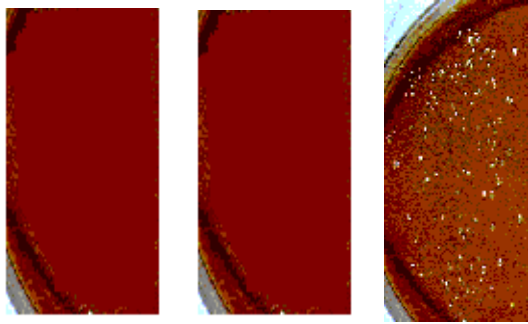
3. Вивчення оксидазної активності нейсерій проводиться на шоколадному агарі при додаткуванні оксидазного реагенту (1% розчин тетраметіл-пара-фенілдіаміно-гідрохлорид) на поверхні колонії. Тест дозволяє визначити наявність у бактерій ферменту цитохромоксидази. Оскільки нейсерії синтезують фермент, края колонії (но не середовище, де вони присутні) фарбуються у синьо-чорний колір протягом декількох секунд.

4. Вивчення ферментативної активності гонокока і менінгокока:

Вид бактерій	Глюкоза	Мальтоза
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	К	-
<i>Neisseria meningitidis</i>	К	К

5. Диференціація менінгокока (*Neisseria meningitidis*) і катарального діплокока (*Neisseria catarrhalis*) на сироватковому і м'ясо-пептонному агарах при різних температурах:

Neisseria meningitidis



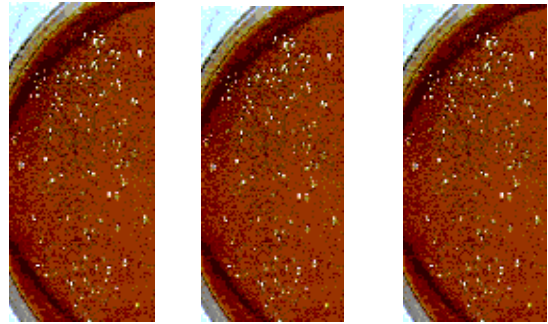
37° С
МПА

22° С
сироватко-
вий агар

37° С
сироватко-
вий агар

Заключення:

Neisseria catarrhalis



37° С
МПА

22° С
сироватко-
вий агар

37° С
сироватко-
вий агар

Заклучення:

6. Вивчення схем лабораторної діагностики гонореї і менінгіта.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Рід *Neisseria* включає два види мікробів, патогенних для людини: *N. meningitidis* і *N. gonorrhoeae*.

Менінгококи

Збудник – *Neisseria meningitidis* входить до родини *Neisseriaceae*, роду *Neisseria*.

Морфологія. Менінгококи - це парні коки, що складаються з двох бобовидних коків, що лежать увігнутими сторонами один до одного, зовнішні стінки у них опуклі. Розмір кожного кока 0,6-0,8 × 1,2-1,5 мкм. Вони поліморфні. Менінгококи нерухомі, не мають спор, утворюють капсулу. Грамнегативні. У чистих культурах розташовуються тетрадами і у вигляді окремих коків без певного порядку, а в мазках, приготовлених із спинномозкової рідини, частіше розташовуються попарно. У гнійному матеріалі знаходяться всередині лейкоцити.

Культивування. Менінгококи - аероби. Вони вимогливі до живильних середовищ, розмножуються тільки на середовищах, що містять нативний білок (сироватку, кров). Ростуть при температурі 36-37⁰С (при 25⁰С ріст припиняється), рН середовища 7,4-7,6. Для їх розмноження необхідна вологе середовище і підвищена кількість вуглекислоти (фактор, що стимулює їх зростання). Посів слід проводити на свіжеприготовленню середу.

На щільних поживних середовищах менингококки утворюють невеликі 2-3 мм в діаметрі, ніжні, напівпрозорі, блакитні, в'язкі колонії. У бульйоні з сироваткою менингококки дають легку каламуть і невеликий осад. Свежевиделеніе штами в S-формі. Старі культури можуть диссоціювати, утворювати шорсткі R-форми колоній.

Ферментативні властивості. Біохімічно менингококки мало активні. Вони розщеплюють глюкозу і мальтозу з утворенням кислоти. Протеолітичні властивості у них не виражені (НЕ створаживається молоко, желатин НЕ розріджують).

Патогенність менінгококів обумовлюється наявністю капсули, яка перешкоджає фагоцитозу, пілей, що сприяють закріпленню мікроба до поверхні епітеліальних клітин, і утворенням ферментів: гіалуронідази і нейрамінідази.

Токсинутворення. При руйнуванні бактеріальних клітин вивільняється сильний термостійкий ендотоксин, який є ліпополісахаридом клітинної стінки. При захворюванні він

виявляється в крові і в спинномозковій рідині хворих. Тяжкість захворювання часто залежить від кількості накопичився токсину.

Антигенна структура. За полісахаридними (капсульний) антигену менингококки поділяють на серогрупи: А, В, С, D, X, Y U-135 29E (всього дев'ять серогруп).

Згідно з міжнародною класифікацією основними групами є А, В і С. Менингококи групи А часто викликають генералізовані процеси і мають найбільше епідеміологічне значення. Менингококи груп В і С викликають спорадичні захворювання. Решта серогрупи мало вивчені.

Стійкість до факторів навколишнього середовища. Менингококи малостійкі. Температура 70⁰С губить їх через 2-3 хв, 55⁰С - через 5 хв. На відміну від інших коків цієї групи вони погано переносять низьку температуру, особливо чутливі до температурних коливань.

Звичайні концентрації дезінфікуючих розчинів гублять їх швидко.

Сприйнятливість тварин. У природних умовах тварини не чутливі до менингококів. Але при субдуральному введенні менингококів мавпам можна викликати у них захворювання.

Внутрішньочеревне зараження морських свинок і білих мишей викликає їх загибель за рахунок дії ендотоксину.

Джерела інфекції. Хвора людина і бактеріоносій.

Шляхи передачі. Основний шлях повітряно-крапельний.

Захворювання у людини:

- 1) назофарингіт;
- 2) менингококцемія;
- 3) цереброспінальний епідемічний менингіт.

Патогенез. Потрапивши на слизову оболонку носоглотки, менингококи можуть там локалізуватися, зумовивши носійство або викликати гострий назофарингіт. Якщо вони проникають в лімфатичні судини, кров і генералізуються, то викликають глибокі зміни в паренхіматозних органах за рахунок дії ендотоксину. Розвивається менингококцемія. При проникненні менингококів в мозкові оболонки виникає гнійне запалення - менингіт. При менингококової менингіті спинномозкова рідина каламутна (на відміну від туберкульозного менингіту). При спинномозковій пункції рідина витікає струменем внаслідок підвищеного внутрішньочерепного тиску. Менингеальні явища характеризуються головним болем, ригідністю потилиці, блювотою та ін. Менингітом частіше хворіють діти. У дорослих частіше зараження обмежується носительством або назофарингіт.

Імунітет. Постінфекційний імунітет напружений, він обумовлюється опсонінами, комплементсвязиваючіє і бактеріоцидне антитілами. Від інтенсивності утворення антитіл до полісахаридних і білковим антигенів залежить перебіг захворювання.

Профілактика. Зводиться до раннього виявлення носіїв, ізоляції хворих назофарингіт. Хворі підлягають госпіталізації.

Специфічна профілактика. Розроблено хімічна вакцина, що складається з полісахаридів серогруп А і С. Для екстреної профілактики використовується імуноглобулін.

Лікування. Антибактеріальні препарати - пеніцилін, левоміцетин, ампіцилін.

Мікробіологічна діагностика менингококової інфекції

Матеріалом для дослідження є слиз із зіву, спинномозкова рідина (СМР), кров, гній, ексудат.

Менингококи дуже чутливі до коливань температури, тому матеріал зразу ж, не допускаючи охолодження, відправляють до лабораторії.

Мікробіологічну діагностика менингококової інфекції проводять наступними методами: експрес, мікроскопічним, бактеріологічним, серологічним.

Експрес-метод. Для виявлення збудника в матеріалі, який досліджують використовують реакцію імунофлюоресценції (РІФ).

Мікроскопічний метод. Мазки із осаду спинномозкової рідини фарбують аніліновими фарбами (водним розчином фуксину, метиленового синього). Препарати з гною та слизу фарбують за Грамом. Менінгококи мають форму подібну до бобу (бобовидну), розташовуються попарно (диплококи) у цитоплазмі лейкоцитів, грамнегативні. Часто виявляється ніжна капсула.

При менінгококцемії менінгококи шукають під мікроскопом у виготовленому препараті „грубої краплі крові” Цей препарат не фіксують. Його фарбують водним розчином метиленової сині 2-3 хвилини.

Бактеріологічний метод. СМР чи її осад сіють на сироватковий бульйон чи агар, агар Хоттінгера. Висів культивують при температурі 37⁰С й підвищеному вмісті СО₂. Менінгококи утворюють дрібні, круглі, опуклі, прозорі колонії. В мазках, виготовлених з колоній, шукають поліморфні диплококи й тетракоки. Колонії пересівають на скошений сироватковий агар. Наступної доби виділену чисту культуру мікробів аглютинують менінгококовими сироватками. З епідемічною метою визначають серовар менінгококів. Цукролітичну активність менінгококів визначають, виконуючи посів на середовище з лактозою, глюкозою, мальтозою, сахарозою, фруктозою. Менінгококи ферментують глюкозу й мальтозу з виділенням кислоти. Щоб встановити приналежність бактеріальної культури до роду нейссерія ставлять оксидазну реакцію. Для цього культуру, яку вивчають наносять петлею на поверхню фільтрувального паперу, змоченого реактивом (1% розчин тетраметилпарафенілен діаміну) при позитивній реакції слід від посіву стає червоним. Диференціацію менінгококів й непатогенних нейсерій проводять з урахуванням властивостей останніх рости на простих поживних середовищах та утворювати колонії при температурі 22⁰С.

Для виявлення менінгококів у крові у флакони с 50 мл бульйону, який містить 0,1% агару, засівають 5-10 мл крові, стерильно взятої із вени. Через добу роблять пересів культури на сироватковий агар. Виділення й ідентифікація культур здійснюється таким же чином, як і при дослідженні СМР.

Серологічний метод. Для виявлення антитіл у сироватці крові хворих і тих, що перехворіли приміняють РПГА, РІФ (непрямий) й ІФА, в яких в якості антигенів використовують групспецифічні полісахариди менінгококу.

Визначення групи менінгококка. Після отримання чистої культури менінгокока проводять серологічне визначення групи. Для цього використовують комерційні агглютинируючі і преципитируючі сироватки.

На предметне скло наносять по одній краплі нерозведених агглютинируючих сироваток груп А, В, С та ін., Краплю ізотонічного розчину натрію хлориду (контроль). До кожної краплі додають одну петлю виділеної культури. Наявність аглютинації в одній з крапель визначає групу виділеної культури.

Для виявлення серогруп можна ставити реакцію преципітації в гелі.

У чашку Петрі з пластинками агару пробівають ямочки, в які поміщують: в центральну - групоу менінгококову сироватка, а у лунки вокруг центральної - досліджувану культуру. При гомологічності культури и групової Сироватко через добу з'являється лінія преципітації.

В даний час з діагностичною метою використовують серологічні методи діагностики: сироватку обстежуваних осіб досліджують в РНГА з менінгококовий еритроцитарних діагностикумів А, С та інших серогруп.

Гонококки

Збудник – *Neisseria gonorrhoeae* входить до родини *Neisseriaceae*, роду *Neisseria*.

Морфологія. Гонококи - це диплококки, що складаються з двох бобовидних коків, що лежать увігнутими сторонами один до одного (нагадують кавові зерна). Розмір гонококів 1,2-1,3 × 0,7-0,8 мкм. Вони поліморфні, поряд з великими зустрічаються дуже дрібні, неправильної форми L-форми бактерій. Гонококи нерухомі, спор не мають. У патологічному матеріалі (гної) виявляють капсулообразное речовина. Грамнегативні. Під впливом лікарських та інших речовин швидко змінюються: з'являються грампозитивні форми. У патологічному матеріалі розташовуються внутрішньоклітинно (в лейкоцит), але можуть бути поза клітиною. Можуть знаходитися у вигляді окремих коків.

Культивування. Гонококи - аероби. Дуже вимогливі до живильних середовищ. Ростуть на середовищах, що містять нативний білок (людський) - кров, сироватку, при температурі 37⁰С і рН середовища 7,2-7,4. Середовища повинні бути свіжоприготовленими і вологими. Посів слід проводити відразу після взяття матеріалу. На сироваткової середовищі гонококи утворюють дрібні колонії 1-2 мм, прозорі, блискучі з рівними краями, що нагадують крапельки роси. На кров'яної середовищі гемолізу не дають. У сироватковому бульйоні вони дають слабе помутніння і плівку, яка осідає на дно пробірки. При мізерному зростанні через 24 год посіви залишають в термостаті на другу добу.

Ферментативні властивості. Сахаролитические властивості слабо виражені. Гонококи розщеплюють тільки один цукор - глюкозу з утворенням кислоти. Протеолітичними властивостями не володіють.

Токсинування. У клітинній стінці гонококів є токсична субстанція - липополисахарид (мало вивчений).

Антигенна структура. Антигенна структура неоднорідна і легко змінюється під впливом факторів зовнішнього середовища. Загальноприйнятого поділу гонококів на серовар і серотипи поки немає.

Стійкість до факторів навколишнього середовища. У зовнішньому середовищі гонококи мало стійкі. При температурі 56-60⁰С вони гинуть. При температурі 40⁰С їх життєздатність різко знижується. Низькі температури і висушування їх швидко гублять. Але в гної вони зберігаються до 24 год. Дезінфікуючі розчини - 1% розчин фенолу, сулема 1: 1000 вбивають гонококи протягом декількох хвилин. Особливо гонококи чутливі до солей срібла - 1% розчин срібла нітрату губить їх відразу. УФ-промені вбивають їх протягом декількох хвилин.

Сприйнятливості тварин. Тварини не чутливі до гонококку. Однак внутрішньоочеревинне введення білим мишам гонококкового токсину викликає їх загибель.

Джерела інфекції. Хворий гонореею людина.

Шляхи передачі. Контактно-побутовий (статевий), рідше через заражені предмети (рушник, губки і ін.).

Захворювання у людини. Гонорея і бленнорея.

Патогенез. Природним господарем гонококів є хвора людина. Гонококи проникають через слизові оболонки уретри (у жінок - уретри і шийки матки). Фактором патогенності гонококів є наявність у них пілей, які, з'єднуючись з микроворсинками циліндричного епітелію, сприяють проникненню гонококка всередину клітини епітелію, зумовлюючи в слизовій оболонці гострий запальний процес.

Клінічно гонорея проявляється болями при сечовипусканні, виділеннями гною з уретри і піхви. Захворювання протікає гостро, але іноді переходить в хронічну форму. Гонококи можуть викликати гонорейний кон'юнктивіт - бленореї (гнійне запалення слизової оболонки очей у новонароджених). Гонококи рідко проникають з уретри в інші органи, але іноді вони можуть бути причиною артритів, ендокардиту та ін.

Імунітет. Природної резистентності до гонококкам немає. Перенесене захворювання також не створює імунітету. Спостерігається фагоцитоз носить незавершений характер.

Профілактика. Обласі охорони здоров'я. Підвищення культурно-гігієнічного рівня. Специфічної профілактики немає. Для профілактики бленореї дітям відразу після народження обов'язково вводять в кон'юнктивальний мішок 1-2 краплі 30% розчину альбуциду.

Лікування. Антибіотики (пеніцилін, біцилін, стрептоміцин та ін.). Застосовують також сульфаніламідні препарати. При хронічній формі використовують гонококкову вакцину.

Мікробіологічна діагностика гонокової інфекції

Для мікробіологічного дослідження використовують гнійне виділення з уретри, вагіни, шийки матки, передстатевої залози та інших органів, уражених гонококами, а також осад сечі. Матеріал із уретри беруть при натискуванні на задню стінку каналу, видавлюючи краплину гною. Секрет передстатевої залози отримують шляхом масажування. Виділення з слизової оболонки шийки матки добувають тампоном. Мікробіологічну діагностику гонокової інфекції проводять мікроскопічним, бактеріологічним, серологічним методами.

Мікроскопічний метод. З матеріалу, який досліджують готують 2 препарати та фарбують метиленовим синім і за Грамом. При мікроскопії гонококи мають вид бобовидних грамнегативних диплококів, розташованих позаклітинно або в середині клітини (нейтрофільних гранулоцитів). Фарбування за Грамом дозволяє диференціювати гонококи.

Для виявлення гонококів в препараті також використовують пряму РІФ у зв'язку з тим, що в матеріалі можуть знаходитися східні грамнегативні бактерії. При прямій РІФ мазки оброблюють флюоресцуючими антитілами проти гонококів і вивчають антигенні властивості збудника. Поєднання антигену з антитілом стає видимим при використанні люмінесцентного мікроскопа. Гонококи при додаванні специфічної флюоресціюючої сироватки у люмінесцентному світлі візуалізуються як зелено-жовте світіння.

Бактеріологічний метод. Використовується в тих випадках, коли гонококи в препаратах не виявляють, або знаходять нетипові, змінені форми. Метод включає виділення чистої культури гонококів на спеціальних живильних середовищах, її ідентифікацію з врахуванням характерних для гонококів ознак.

Слід враховувати особливу чутливість гонококів до температури та дезінфікуючих засобів, тому дослідний матеріал повинен досліджуватися зразу ж без відстрочення. За 1-2 дні до висіву необхідно припинити застосування хворим антибіотиків. Висів роблять безпосередньо після отримання матеріалу на асцитичний агар, або «середовище для культивування гонококів». Перед висівом живильне середовище слід нагріти в термостаті. Для кращого росту гонококів чашки з висівами вміщують в ексікатор, де створюється необхідна концентрація CO₂. Через добу інкубації при температурі 37⁰C на живильному середовищі з'являються прозорі, з рівними краями, опуклі, слизової консистенції колонії гонококів, що нагадують краплі роси.

Серологічний метод. Використовується при хронічній формі гонореї, коли у хворого відсутні виділення та застосувати мікроскопічний і бактеріологічний методи неможливо. З сироваткою крові хворого ставлять РЗК, при якій антигеном є гонококова вакцина, або спеціальний антиген, виготовлений з вбитих формаліном гонококів.

Теоретичні питання:

1. Родина Neisseriaceae. Рід нейсерії (Neisseria).
2. Біологічні властивості.
3. Класифікація.
4. Еволюція патогенності.
5. Менінгококи (Neisseria meningitidis).
6. Біологічні властивості. Класифікація.

7. Патогенез і мікробіологічна діагностика менінгококових захворювань і бактеріоносійства.

8. Диференціація менінгококів і грамнегативних диплококів носоглотки.

9. Гонококи (*Neisseria gonorrhoeae*).

10. Біологічні властивості.

11. Патогенність для людини, мінливість.

12. Гостра і хронічна гонорея.

13. Імунітет. Мікробіологічна діагностика гонореї.

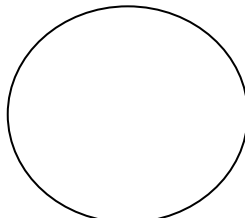
14. Профілактика і спеціальна терапія гонореї і бленореї.

Протокол № 3

Тема: Мікробіологічна діагностика захворювань, спричинених кишковою паличкою.

Мета: Освоєння методів мікробіологічної діагностики захворювань, викликаних кишковою паличкою.

1. Мікроскопія і замалювання демонстраційних препаратів *E. coli* у мазках із чистої культури.



Escherichia coli
(фарбування за Грамом)

2. Вивчення культурально-біохімічних властивостей *E. coli* по колекціям:

Ріст на МПБ	Ріст на МПА		Колонії на середовищі Ендо	Розщеплення вуглеводів						
	Скошений агар	На чашці Петрі		Глюкоза	Лактоза	Мальтоза	Маніт	Сахароза	Індол	H ₂ S
Помутніння	Безкольоровий блискучий наліт	Безкольорові гладкі блискучі колонії	Почервоніння	кг	кг	кг	кг	-	+	-

3. Вивчення біохімічних властивостей *E. coli* по колекції:

Види	Лакмусове молоко	Глюкоза	Лактоза	Мальтоза	Манніт	Сахароза	Індол	H ₂ S
<i>E. coli</i>		кг	кг	кг	кг	-	+	-

4. Вивчення антигенних властивостей кишкової палички.

Сировари *E. coli*, що найчастіше викликають ураження у людини.

Ураження	Серогрупи		
	O-Аг	H-Аг	K-Аг
Кишкові			
Ентеротоксигенні	O6, O8, O11, O15, O20, O114, O115, O153, O166 та ін.	H4, H7, H9, H11, H12, H19, H20, H28, H40	-
Ентеропатогенні	O18, O26, O44, O55, O111, O112 та ін.	H2, H6, H7, H11, H12, H14, H18	-

Ентероінвазивні	O28, O29, O115, O136, O143 та ін.	-	-
Ентерогеморагічні	O26, O157	H6, H7, H8, H11	-
Інфекції сечових шляхів	O1, O2, O4, O6, O7, O8, O9, O11, O18 та ін.	-	K1, K2, K5, K12, K13
Бактеріємії	O1, O2, O4, O6, O7, O8, O9, O11, O18 та ін.	-	K1, K2, K5, K12, K15, K23
Менінгіти	O1, O6, O7, O16, O18, O83	-	K1

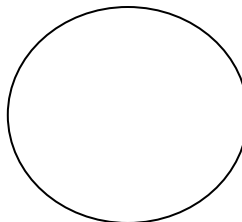
5. Вивчення колекції аглютинуючих сироваток для типування патогенних серотипів кишкової палички (полівалентні ОК-колі сироватки; типоспецифічні сироватки, що містять антитіла до окремих ОК-серогруп).

6. Вивчення схеми лабораторної діагностики колі-інфекції у дітей.

7. Самостійна робота студентів по віділенню чистої культури бактерій із матеріалу хворого на колі-інфекцію:

- вивчення посівів фікальних мас на середовищі Ендо, описування признаков росту_____

- приготування мазків і фарбування за Грамом, мікроскопія, замалювання.



- відбір і пересів підозрілих колоній на середовищі Ресселя.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Сімейство кишкових бактерій

До родини ентеробактерій Enterobacteriaceae відносять численні мікроорганізми, подібні по морфології, тинкторіальними і культуральними властивостями. Вони мешкають в кишечнику людини і тварин і можуть бути виявлені у зовнішньому середовищі.

В даний час все кишкові бактерії ділять на 12 пологів, з яких будуть розглянуті наступні: Escherichia, Shigella, Salmonella, Proteus, Klebsiella, Yersinia. Рода ці, в свою чергу, розділені на види, біологічні та серологічні варіанти (біовари і серовар).

Вважають, що родоначальником всієї цієї групи мікроорганізмів є кишкова паличка. В процесі еволюції різновиди кишкової палички пристосувалися до паразитичного способу існування, придбали патогенні властивості і є в даний час збудниками багатьох хвороб людини і тварин.

До патогенних представників сімейства кишкових бактерій відносяться збудники черевного тифу, паратифів А і В, токсикоінфекцій, дизентерії. Багато кишкові бактерії постійно мешкають в кишечнику. При зміні умов існування (наприклад, ослаблення

організму хазяїна) вони стають збудниками захворювань. Це так звані умовно-патогенні бактерії.

Всі кишкові бактерії грамнегативні палички. Вони є факультативними анаеробами. Добре ростуть на простих поживних середовищах. Ентеробактерій відрізняються ферментативної активністю, яка найбільш виражена у сапрофітов і зменшується в міру посилення патогенності. Цю закономірність можна пояснити тим, що мікроорганізми, пристосовуючись до паразитичного способу життя, втратили стали непотрібними ферменти.

Диференційно-діагностичні ознаки ентеробактерій

Ознака	Escherichia	Shigella	Salmonella	Klebsiella	Proteus	Yersinia
Рухливість	+	-	+	-	+	±
Індолоутворення	+	±	-	-	+	-
Наявність галактозидази	+	±	±	+	-	+
Реакція Фогеса-Проскауера	-	-	-	-	-	-
Утилізація цитратів	-	-	+	+	±	-
Утворення H ₂ S	-	-	+	-	±	-
Розкладання сечовини	-	-	-	+	+	+
Декарбоксілювання лізину	±	-	+	+	-	-
Дезамінування фенілаланіну	-	-	-	-	+	-
Ферментація: глюкози до утворення газу	+	-	+	+	+	+
лактози	+	-	-	+	-	-
сахарози	±	-	-	+	±	-
манніту	+	±	+	+	-	+

Примітка: + - постійна ознака, - - відсутність ознаки, ± - варіабельний прояв ознаки

Ешерихії

Збудник *Escherichia coli* входить до родини *Enterobacteriaceae*, роду *Escherichia*.

Цей рід представлений тільки одним видом бактерій - *E. coli*, але об'єднує безліч варіантів. Різновиди кишкової палички відрізняються за біологічними властивостями, у них можуть бути різні набори ферментів (біовари) і різна антигенна структура (серовар).

Кишкова паличка вперше виділена в 1888 р Ешеріхія з випорожнень людини і названа за його іменем. Природним місцем проживання *E. coli* є кишечник людини. Кишкова паличка - представник нормальної мікрофлори кишечника.

У процесі життєдіяльності *E. coli* виробляє ферменти, які сприяють травленню (наприклад, розщеплюють клітковину), синтезує деякі вітаміни (наприклад, вітаміни групи В). Крім того, ці бактерії проявляють антагоністичну дію відносно патогенних мікроорганізмів, таких як збудники дизентерії, черевного тифу, токсикоінфекцій. Відсутність кишкової палички в товстому кишечнику призводить до важкого захворювання - дисбактеріозу. При цьому порушується нормальний склад мікрофлори кишечника, розвиваються протей, кокковая флора, гриби та ін. При зниженні стійкості організму (голодуванні, перевтомі та ін.) ешерихії можуть проникнути в інші органи і тканини і стати причиною важких патологічних процесів. Таким чином, можна вважати, що ешерихії - типові

умовно-патогенні мікроорганізми: в звичайних умовах вони є сапрофіти, а при зміні умов викликають захворювання.

Виділяючись з фекаліями, кишкова паличка потрапляє в зовнішнє середовище. Виявлення *E. coli* в ґрунті, воді та на інших об'єктах свідчить про їх фекального забруднення, а визначення кількості *E. coli* (колі-титр, коли-індекс) характеризує санітарний стан об'єкта.

Морфологія. *E. coli* - короткі, в середньому $0,5-3,0 \times 0,5-0,8$ мкм палички. Грамнегативні. У більшості випадків вони рухливі, перитрихи. Однак деякі варіанти кишкової палички нерухомі. Багато штамів утворюють капсулу. Суперечка не утворюють.

Культивування. Кишкова паличка - факультативний анаероб. Добре росте на простих поживних середовищах при 37°C і рН середовища 7,2-7,8. Штами *E. coli*, виділені з кишечника людини і тварин, розвиваються і при $43-45^{\circ}\text{C}$, а кишкові палички холоднокровних при цих умовах не розмножуються. Ця різниця у властивостях *E. coli* різного походження використовують для визначення санітарного стану об'єкта, так як тільки виявлення *E. coli* теплокровних свідчить про санітарний неблагополуччя.

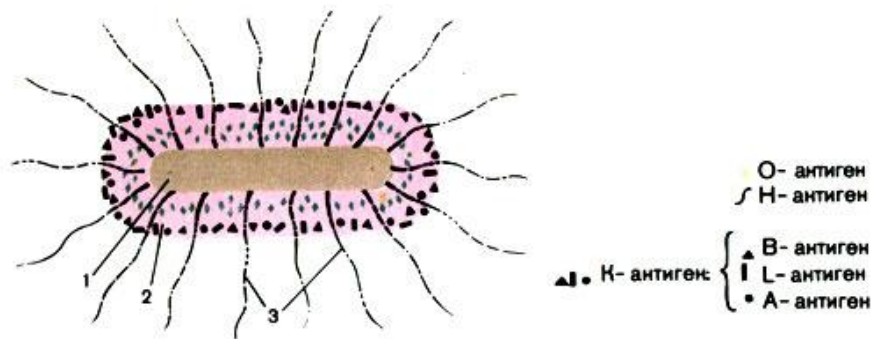
На МПА кишкова паличка утворює мутнуваті, злегка опуклі вологі колонії з рівним краєм. На МПБ дає рівномірне помутніння. Культури, які мають капсулу, ростуть у вигляді слизових колоній. Для ідентифікації ешерихій використовують диференційно-діагностичні середовища: Ендо і агар з еозинметіленовим синім (ЕМС). На середовищі Ендо кишкова паличка зростає у вигляді малиново-червоних колоній з металевим блиском або без нього. На середовищі ЕМС - у вигляді темно-фіолетових колоній.

Ферментативні властивості. *E. coli* мають значну ферментативну активність. Розщеплюють лактозу, глюкозу, маніт, мальтозу, сахарозу та інші вуглеводи і спирти з утворенням кислоти і газу. Протеолітичні властивості: утворюють індол. Желатин не розщеплюється. Окремі біовари не ферментує лактозу і сахарозу.

Токсигенність. Ешерихій мають ендотоксинів (ліггополісахарід).

Антигенна структура. Ешерихій розрізняються за антигенною структурою мікробної клітини, що покладено в основу класифікації бактерій цього роду. Розрізняють три типи антигенів ешерихій: О-антиген (соматичний), К-антиген (капсульний) і Н-антиген (жгутиковий). Термостабільний О-антиген є ліпополісахаріднопротеїновим комплексом і розташований в клітинній стінці бактерій. О-антиген визначає приналежність культури до серологічної групи. Описано понад 170 таких груп. Деякі компоненти О-антигену є загальними для різних О-груп ешерихій, а іноді і інших ентеробактерій (шигел, сальмонел та ін.). К-антигени ешерихій різні: А, В, L і М. Антигени А і М - термостабільні, В і L - термолабільні. К-антиген розташований в мікробної клітині більш поверхнево, ніж О-антиген, і тому в його присутності реакція аглютинації живої культури з О-сироваткою не відбувається. Для виявлення О-антигену культуру прогрівають протягом години при 100°C : К-антиген при прогріванні руйнується, а О-антиген стає здатним вступати у взаємодію з сироваткою. Встановлено, що у ешерихій є близько 100 типів К-антигенів, в основному типу В-антигенів (термолабільних). Н-антиген є тільки у рухомих штамів, так як він пов'язаний з джгутиками. У ешерихій відомо більше 50 типів Н-антигену. Визначення Н-антигену дозволяє встановити сероваріантов виділеної культури (мал.).

Характеристику антигенного складу виділеної культури ешерихій дають на підставі результатів реакції аглютинації з сироватками, що містять О-, К- і Н-антигіла. При цьому визначають, які антигени є в культурі, а їх поєднання характеризує антигенну формулу виділеної культури, тобто її сероваріантов. У таблиці представлені приклади антигенної структури деяких сероваріантов *E. coli*, у яких К-антигени є В-антигенами.



Мал. Антигенна структура ентеропатогенної кишкової палички:
1 - цитоплазма; 2 - клітинна стінка; 3 – джгутики

Якщо культура аглютинується ОК-сироваткою ОП1: К58 (В4) та Н-сироваткою "6", то значить виділений сероваріант *E. coli* O111: В4: Н6; якщо відзначена реакція аглютинації з ОК-сироваткою O26: К60 (В6) і з Н-сироваткою "11" - виділена культура *E. coli* O26: В6: Н11 і т. п. Крім визначення сероваріантів *E. coli*, можна визначити і фаговар виділеної культури. Є набори бактеріофагів, які лизують ешерихії окремих серогруп. За лизису культури одним з фагів встановлюють її фаговар. Визначення фаговарів має епідеміологічне значення.

Антигенна структура ешерихій

ОК-група	Н-антигени, які визначають серовар
O20:K84	1, 4, 7, 8
O26:K60	9, 10, 19
O55:K59	1, 2, 6, 7
O111:K58	2, 4, 6

Антагоністичну дію *E. coli*, їх здатність пригнічувати ріст гнильних і патогенних бактерій використовують для створення бактерійних препаратів для лікування дисбактеріозу і різних захворювань кишечника (колибактерин, біфікол).

Стойкість до факторів навколишнього середовища. *E. coli* досить стійкі. При 55 ° С вони гинуть протягом години, при 60 ° С - за 15 хв. У ґрунті і воді зберігаються до 2-3 міс, в молоці не тільки зберігаються, а й розмножуються. Розчини дезінфікуючих речовин (3% хлорамін, розчин сулеми 1: 1000 та ін.) вбивають їх за 20-30 хв. Особливо чутливі *E. coli* до дії діамантового зеленого.

Сприйнятливість тварин. Ешерихії окремих серогруп патогенні для різних тварин і викликають у них захворювання шлунково-кишкового тракту. З лабораторних тварин найбільш чутливі до *E. coli* морської свинки, кролики, білі миші. Залежно від способу введення культура кишкової палички викликає різні патологічні процеси: запалення і абсцес при підшкірних ін'єкціях, перитоніт і сепсис - при внутрібрюшинном і внутрішньовенному введенні.

Джерела інфекції. Хвора людина. При цьому бактерії проникають в організм із зовнішнього середовища (екзогенна інфекція). Кишкова паличка може також викликати розвиток патологічного процесу "зсередини" (ендогенна інфекція).

Шляхи передачі. Основний шлях передачі при екзогенної формі інфекції - контактно-побутовий (непрямий контакт). Збудники можуть бути перенесені на брудних руках, через посуд, іграшки, білизну, їжу, мух.

Патогенез. Захворювання, що викликаються ешерихіями, називають ешерихіозу. Розвиток ешерихіозів залежить від шляху проникнення збудника в організм і від серогрупи, до якої належить збудник. При проникненні бактерій через рот можуть виникнути кишкові захворювання дітей і дорослих. Деякі О-групи ешерихії (серовар) найбільш часто є збудниками захворювань людини. Такі бактерії називають ентеропатогенними кишковими

паличками (ЕПКП). В даний час відомо багато варіантів ЕПКП, що обумовлюють різний перебіг ешерихіозів. Розрізняють декілька груп ЕПКП:

група I - збудники колієнтеритів у дітей раннього віку (серогрупи O111, O26, O55, O86 та ін.);

група II - збудники дізентерієподібних захворювань у дітей і дорослих (O25, O124, O143, O144 та ін.);

група III - збудники холероподібних захворювань (O1, PRO5, PRO6, O78 і ін.).

Потрапляючи в харчові продукти, кишкова паличка може в них розмножуватися. Вживання в їжу таких продуктів веде до розвитку харчової токсикоінфекції.

Розвиток ендогенної інфекції призводить до ураження різних органів: запалення жовчного міхура (холецистит), сечового міхура (цистит), зараження крові (сепсис) та ін.

Імунітет. Імунітет виробляється тільки по відношенню до одного сероваріантов ешерихії - збудника даного захворювання. Різноманіття ешерихії робить практично цей імунітет недієвим. У розвитку імунного стану при захворюванні дітей велике значення має освіту IgM-антитіл, які не проходять через плаценту, а значить не передаються від матері. IgA-антитіла до ешерихій передаються дитині від матері з грудним молоком.

Профілактика. Дотримання особистої гігієни та санітарно-гігієнічного режиму. Специфічна профілактика відсутня.

Лікування. Антибіотики: ампіцилін, тетрациклін та ін. В даний час випускають коліпротейний фаг, використання якого дає хороші результати.

Мікробіологічна діагностика ешерихіозів

Матеріалом для дослідження є випорожнення, блювотні маси, слиз із зіву і носа, перитонеальна рідина, а у летальних випадках – вміст кишечника, кров й органи (печінка, селезінка).

Мікробіологічну діагностику ешерихіозів проводять бактеріологічним методом.

Бактеріологічний метод є основним методом діагностики, оскільки лише виділивши чисту культуру мікробів та вивчивши їх властивості, зокрема антигенні, можна віддиференціювати патогенні варіанти кишкових паличок від непатогенних й встановити остаточний діагноз захворювання.

Матеріал, який досліджують (частіше випорожнення) висівають на середовище Ендо, ставлять в термостат при $t\ 37^{\circ}\text{C}$. Через 24 години враховують ріст мікробів на цьому середовищі, відбирають не менш як 10 колоній червоного кольору з металевим блиском і ставлять реакцію аглютинації на склі з полівалентною ОК-колі сироваткою (сумішшю сироваток, що включають антитіла до патогенних варіантів кишкових паличок).

Частину колоній, що дали позитивний результат реакції аглютинації та залишились, пересівають на скошений агар чи середовище Ресселя. Наступного дня враховують ріст й зміни в середовищі Ресселя, перевіряють вирощену культуру мікробів на чистоту шляхом мікроскопії мазка, пофарбованого за Грамом. Для вивчення біохімічних властивостей роблять висів на «строкатий» ряд Гіса. Антигенні властивості вивчають у реакції аглютинації, яку ставлять спочатку з полівалентною ОК сироваткою, а потім з кожною із сироваток, що входять до складу полівалентної.

За наявності аглютинації з однією із сироваток ставлять розгорнуту реакцію з цією ж сироваткою. Реакцію аглютинації ставлять з живою культурою для встановлення В-антигену і з нагрітою культурою для встановлення О-антигену. Для цього змивають ізотонічним розчином хлориду натрію ріст зі скошеного агару й отриманий звись прогривають 1 годину на водяній бані, що кипить. Реакцію ставлять з діагностичною сироваткою, розведеною від 1:50 до її титру. Реакція вважається позитивною у розведенні сироватки до титру, вказаного на ампулі, чи напівтитру.

Серологічний метод діагностики колієнтеритів не має широкого використання.

Для виявлення O-антитіл до ентеропатогенних кишкових паличок в сироватці, яка досліджується, може бути використана реакція пасивної гемаглютинації (РПГА). В якості антигену в цій реакції використовують еритроцити, сенсibilізовані 48-годинною культурою *E. coli*, кип'яченої на протязі 2 годин. Реакція дозволяє відрізнити хворих від бактеріоносіїв. В перших звичайно виявляються антитіла - у других ні.

Біохімічна активність і морфологічні властивості кишкової палички

глюкоза	лактоза	мальтоза	маніт	цукроза	Утворення індолу	Утворення сірководню	Розрідженн я желатини	Середовищ е Сімонса	Споруутво рення	Рухливість	Фарбуванн я за Грамом
КГ	КГ	КГ	КГ	-	±	+	+	-	-	+	-

Теоретичні питання:

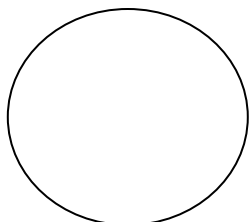
1. Класифікація і загальна характеристика представників родини ентеробактерій (*Enterobacteriaceae*).
2. Сучасні погляди на еволюцію ентеробактерій. Антигенна структура.
3. Фактори вірулентності та їх генетична детермінанта.
4. Патогенні та умовно-патогенні ентеробактерії
5. Рід ешерихій (*Escherichia*), основні особливості.
6. Фізіологічна роль і санітарно-показове значення. Діареєгенні ешерихіози.
7. Класифікація за антигенною структурою і розділення на категорії у залежності від факторів вірулентності, серологічних маркерів, клініко-епідеміологічних особливостей.
8. Парентеральні ешерихіози.
9. Мікробіологічна діагностика ешерихіозів.

Протокол № 4

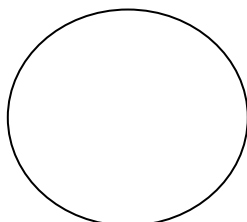
Тема: Мікробіологічна діагностика захворювань, спричинених сальмонелами.

Мета: Освоєння методів мікробіологічної діагностики сальмонельозів.

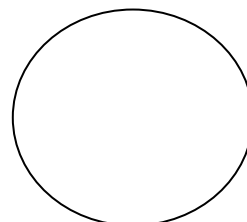
1. Мікроскопія і замалювання демонстраційних препаратів *S.typhi*, *S.paratyphi A* і *S. paratyphi B*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. choleraesuis* у мазках із чистих культур.



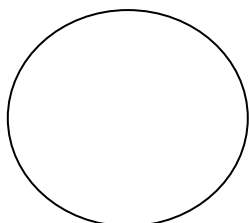
Salmonella typhi
(фарбування за Грамом)



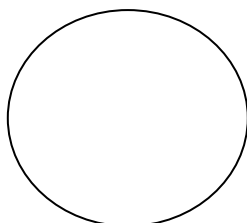
Salmonella paratyphi A
(фарбування за Грамом)



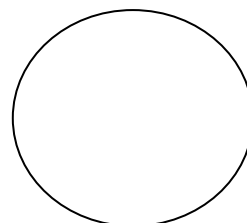
Salmonella paratyphi B
(фарбування за Грамом)



Salmonella enteritidis
(фарбування за Грамом)



Salmonella typhimurium
(фарбування за Грамом)



Salmonella choleraesuis
(фарбування за Грамом)

2. Вивчення культурально-біохімічних властивостей тифо-паратифозних бактерій у порівнянні з кишковою паличкою.

ріст на МПБ _____
 ріст на МПА _____
 колонії на середовищі Ендо _____
 ріст на середовищі Ресселя _____
 проба на індол _____
 проба на H₂S _____

3. Вивчення біохімічних властивостей сальмонел черевного тифу і паратифів А і В по колекції:

Види	Лакмусове молоко	Глюкоза	Лактоза	Мальтоза	Манніт	Сахароза	Індол	H ₂ S
E.coli		кГ	кГ	кГ	кГ	-	+	-
S.typhi		к	-	к	к	-	-	+
S.paratyphi A	рожеве	кГ	-	кГ	кГ	-	-	-
S.paratyphi B	блакитне	кГ	-	кГ	кГ	-	-	+

4. Розбір антигенної структури сальмонел по схемі Кауфмана-Уайта

Антигенна структура сальмонел (із схеми Кауфмана-Уайта)

Вид	Соматичний антиген	Джгутиковий антиген	
		1-ша фаза	2-га фаза
Група А <i>S. paratyphi A</i>	1, 2, 12	a, b	-
Група В <i>S. paratyphi B</i> <i>S. abortus ovis</i> <i>S. typhimurium</i>	1, 4, 5, 12 4, 12 1, 4, 5, 12	- c i	e, n, x 1, 6 1, 2
Група С <i>S. paratyphic</i> <i>S. cholerae suis</i> <i>S. newport</i> <i>S. dusseldorf</i>	6, 7, Vi 6, 7 6, 8 6, 8	c c eh z4, z24	1, 5 1, 5 1, 2 -
Група Д <i>S. typhi</i> <i>S. enteritidis</i> <i>S. moscow</i>	9, 12Vi 1, 9, 12 9, 12	d g, m gq	- - -
Група Е <i>S. anatum</i> <i>S. Cambridge</i>	3, 10 3, 15	eh eh	1, 6 i, w

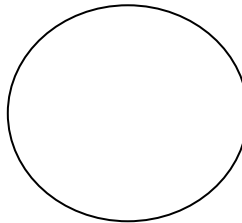
5. Вивчення колекції аглютинуючих сироваток для типування патогенних сальмонел – збудників черевного тифу і паратифів А і В (полівалентні сальмонельозні О-сироватки груп А, В, С, Д, Е; сальмонельозні О-сироватки до рецепторів 1, 2 та іп; сальмонельозні Н-сироватки).

6. Вивчення схеми діагностики сальмонельозної харчової токсикоінфекції та черевного тифу та паратифів А і В.

7. Самостійна робота студентів по віділенню чистої культури бактерій із фекалій хворого на черевний тиф’:

- вивчення посівів фікальних мас на середовищі Ендо, описування признаков росту

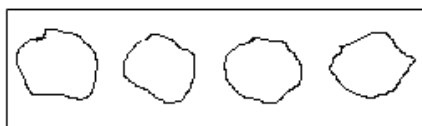
- приготування мазків і фарбування за Грамом, мікроскопія, замалювання.



- відбір і пересів підозрілих колоній на середовищі Ресселя, облік результатів посіву на середовищі Ресселя, відбір пробірок без ознак розщеплення лактози.

- посів крові хворого на черевний тиф на жовчному бульоні (5 мл крові у шприці, жовчний бульон у флаконі (50 мл)).

- постановка реакції аглютинації на склі з діагностичними сироватками для виявлення тифо-паратифозних бактерій:



сальмо- нельозна сироватка сироватка О-4 сироватка О-9 сироватка Н

Заключення: _____

- посів на середовищі Гісса і МПБ для виявлення індолу і H₂S.
8. Облік результатів посіва на жовчному бульйоні, опис ознак росту:

9. Вивчення інгредієнтів і схеми постанови реакції Відаля.

Інгредієнти для постанови реакції Відаля:

- сироватка хворого, розведення 1:50;
- діагностикум О і Н (черевнотифозний, паратифозний А, паратифозний В);
- фізіологічний розчин.

Схема постанови реакції Відаля

Ряди	Інгредієнти	Розведення сироватки				
		1:100	1:200	1:400	1:800	Контроль
1	Фізіологічний розчин Сироватка хворого (1:50) Культура <i>S.typhi</i> (ОН)	1,0 1,0 → 3 краплі	1,0 1,0 3 краплі	1,0 1,0 → 3 краплі	1,0 1,0 3 краплі	1,0 1,0 → 3 краплі
2	Фізіологічний розчин Сироватка хворого (1:50) Культура <i>S.typhi</i> (О)	1,0 1,0 → 3 краплі	1,0 1,0 3 краплі	1,0 1,0 → 3 краплі	1,0 1,0 3 краплі	1,0 1,0 → 3 краплі
3	Фізіологічний розчин Сироватка хворого (1:50) Культура <i>S.paratyphi</i> А	1,0 1,0 → 3 краплі	1,0 1,0 3 краплі	1,0 1,0 → 3 краплі	1,0 1,0 3 краплі	1,0 1,0 → 3 краплі
4	Фізіологічний розчин Сироватка хворого (1:50) Культура <i>S.paratyphi</i> В	1,0 1,0 → 3 краплі	1,0 1,0 3 краплі	1,0 1,0 → 3 краплі	1,0 1,0 3 краплі	1,0 1,0 → 3 краплі

10. Вивчення схеми обліку реакції Відаля (варіанти інфекційної, поствакцинальної і анамнестичної реакції).

Схема обліку реакції Відаля

Антигени	Розведення сироватки															
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:100	1:200	1:400	1:800	1:100	1:200	1:400	1:800	1:100	1:200	1:400	1:800
<i>S.typhi</i> ОН	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-
	О	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>S.paratyphi</i> А	ОН	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	Н	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>S.paratyphi</i> В	ОН	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
	О	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Облік реакції	Реакція на черевний тиф (інфікований)				Реакція групова (поствакцинальна)				Реакція анамнестична (черевний тиф)				Реакція групова (потребує повторної постанови)			

11. Вивчення схеми постанови реакції Vi-гемаглютинації з еритроцитарним Vi-діагностикумом.

12. Ознайомлення з біопрепаратами для специфічної профілактики тифопаратифозних захворювань:

- черевнотифозна спиртова суха вакцина, збагачена Vi- антигеном;
- черевнотифозна хімічна сорбована вакцина з секстаанатоксином;
- черевнотифозний бактеріофаг.

13. Вивчення колекції антибіотиків для лікування черевного тифу і паратифів: фторхінолони, аміноглікозиди, ампіцилін та ін.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Сальмонели

До цього роду сімейства ентеробактерій відноситься більше 2000 різних бактерій, що викликають захворювання людини і тварин. Ці захворювання називають сальмонельозами. Сальмонели подібні за морфологічними, культуральними та ферментативними властивостями, але відрізняються за антигенною структурою.

Сальмонели ділять на монопатогенні і поліпатогенні. До перших відносяться збудники черевного тифу, паратифів А і паратифу В. Цими захворюваннями хворіє тільки людина. До другої групи належать збудники захворювань, що вражають людину і тварин.

Морфологія. Все сальмонели дрібні, $1,0-3,0 \times 0,6-0,8$ мкм палички з закругленими кінцями. Грамнегативні. Рухливі, перитрихи. Суперечка і капсул не утворюють.

Культивування. Сальмонели - факультативні анаероби. Вони не вимогливі до живильних середовищ. Добре ростуть на МПА і МПБ при 37°C (від 20 до 40°C) і рН середовища $7,2-7,4$ (від $5,0$ до $8,0$). На МПА утворюють ніжні, напівпрозорі, злегка опуклі, блискучі колонії, в МПБ - рівномірний помутніння.

При первинному посіві матеріалу від хворих (кал, сеча, блювотні маси, кров, жовч) часто відзначають повільне зростання сальмонел. Для їх накопичення проводять посів на середовища збагачення: селенітовий бульйон, середу Мюллера, середу Кауфмана. Використовують також елективні (виборчі) середовища: жовч ($10-20\%$) і середу Раппопорт.

На диференційно-діагностичних середовищах Ендо, ЕМС, Плоскірева сальмонели ростуть у вигляді безбарвних колоній, оскільки не розщеплюють лактозу, що входить до складу середовища. На вісмут-сульфитном агарі через 48 год вони утворюють колонії чорного кольору, залишають слід після того, як їх знімають петлею (крім сальмонел паратифу А).

У свежевиделених культур *S. paratyphi* В після інкубації в термостаті протягом 18-20 год і витримування при кімнатній температурі протягом 1-2 діб на периферії колонії утворюється слизовий вал.

Ферментативні властивості. Сальмонели розщеплюють глюкозу, маніт, мальтозу з утворенням кислоти і газу. Винятком є збудники черевного тифу (*S. typhi*), які розщеплюють ці цукру тільки до кислоти. Сальмонели не ферментує лактозу і сахарозу. Протеолітичні властивості: більшість сальмонел розщеплює білкові середовища з утворенням сірководню (збудники паратифів А відрізняються відсутністю цієї властивості). Індол не утворюють. Желатин НЕ розріджують.

Токсигенність. Сальмонели містять ендотоксин - ліпополісахаріднопротеїновий комплекс.

Антигенна структура і класифікація. Ще на початку ХХ століття вчені помітили різну природу антигенів сальмонел. Кауфман (1934) на підставі результатів реакції аглютинації різних сальмонел з набором сироваток розділив всі сальмонели на групи і типи і запропонував діагностичну схему їх антигенної структури. Відповідно до цієї схеми в даний час виробляють ідентифікацію сальмонел.

Сальмонели містять два антигенних комплексу: О і Н, О-антиген - ліпополісахаріднопротеїновий комплекс; він термостабільний, інактивується під дією формаліну. Н-антиген пов'язаний з джгутиками, має білкову природу; він термолабільний, інактивується під дією спирту і фенолу, але стійкий до впливу формаліну.

Все сальмонели розділені на О-групи, кожна з яких характеризується наявністю певних О-антигенів: основного, позначеного арабською цифрою (2, 4, 7, 8, 9 та ін.), і додаткових, спільних для декількох О-груп (1, 12). В даний час відомо більше 60 О-груп, які охоплюють прописними буквами латинського алфавіту (А, В, С, D, Е та ін.).

S. typhi містить, крім того, Vi-антиген, який розташований в мікробній клітині більш поверхнево, ніж О-антиген, і перешкоджає аглютинації культури з О-сироваткою. Цей антиген термолабільний. Його присутність пов'язували з вірулентністю збудника. Vi-антиген міститься також в клітинах *S. paratyphi C*.

Н-антигени сальмонел мають дві фази. Сальмонели різних сероваріантів однієї О-групи мають різну першу фазу Н-антигену, яку позначають малими літерами латинського алфавіту: a, b, c, d, eh ... u, z і т. Д. Другу фазу Н-антигену зазвичай позначають арабськими цифрами: 1, 2, 5, 6, 7 і малими латинськими буквами. Поєднання різних О-і Н-антигенів визначає антигенну структуру культур і їх назва.

У практичній роботі для визначення антигенної структури сальмонел використовують адсорбовані імонорецепторні аглютинируючі сироватки, які містять антитіла до одного антигену. Ставлять реакцію аглютинації на склі і по наявності аглютинації з певними сироватками характеризують антигенну структуру виділеної культури. Наприклад, культура аглютинуються О-сироватками "9" і "12" і Н-сироваткою "d"; знаходять в схемі серовар з таким антигенним складом (*S. typhi*), ставлять додатково реакцію з Vi-сироваткою

Є набори специфічних сальмонельозних фагів, які лізують тільки сальмонели відповідного фаговарів. Для визначення фаговарів культур *S. typhi*, що містять Vi-антиген, в нашій країні випускають 45 фагів; для *S. paratyphi B-11* фагів; *S. paratyphi A* - 6 і т. Д. Ці дослідження проводять для визначення джерела і шляхів передачі інфекції.

Стійкість до факторів навколишнього середовища. Сальмонели досить стійкі. При температурі 100°C гинуть миттєво, при 60-70°C - за 10-15 хв. Вони добре переносять низьку температуру, можуть зберігатися в чистій воді і льоду протягом декількох місяців; в копченому і солоному м'ясі - до 2 міс. Стійкі до висихання, які тривалий час зберігаються в пилу.

Під дією дезінфікуючих речовин гинуть протягом декількох хвилин (2-5% розчин фенолу, 1: 1000 розчин сулеми, 3-10% розчин хлораміну).

Сприйнятливість тварин. Більшість сальмонел викликає захворювання людини і багатьох видів тварин і птахів (поліпатогеніє).

Черевний тиф, паратифи А і В

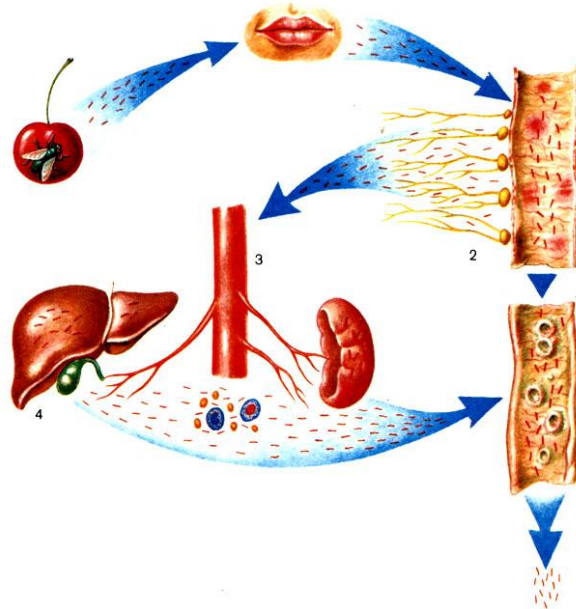
Збудники – *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A*, *Salmonella paratyphi B* належать до родини Enterobacteriaceae, роду *Salmonella*.

Джерело інфекції. Хвора людина і бактеріоносії.

Шляхи передачі. Збудники інфекції передаються через предмети, забруднені виділеннями людини, через руки, воду, їжу. Часто збудників переносять мухи. Залежно від шляхів передачі розрізняють побутові, водні, харчові спалахи черевного тифу і паратифів.

Патогенез. Зараження відбувається через рот. З ротової порожнини мікроорганізми потрапляють в шлунок, де частково руйнуються під впливом шлункового соку і ферментів. Решта сальмонели надходять в тонкий кишечник, проникають в лімфоїдну тканину тонкого кишечника (групові лімфатичні і солітарні фолікули), в якій розмножуються протягом інкубаційного періоду (10-14 днів). До кінця цього терміну збудники надходять в лімфу та

кров (бактеріємія) і розносяться по всьому організму. У цей період вони локалізуються в лімфоїдній тканині внутрішніх органів, системі макрофагів, печінки, селезінці, кістковому мозку. Сальмонели накопичуються в жовчному міхурі, де знаходять сприятливі умови для розмноження, так як жовч - хороша живильне середовище для цих бактерій. При цьому вони вдруге потрапляють в тонкий кишечник і, вражаючи вже сенсibiliзовану лімфоїдну тканину (групові лімфатичні і солітарні фолікули), викликають утворення специфічних черевнотифозних виразок (мал.).



Мал. Циркуляція сальмонел в організмі людини. 1 - тонкий кишківник; 2 - групові лімфатичні фолікули; 3 - кровоносні судини; 4 - жовчний міхур

У період бактеріємії частина мікроорганізмів руйнується, при цьому звільняється ендотоксин і виникають явища інтоксикації: підвищується температура, з'являється загальне нездужання, слабкість, головний біль та ін. З кінця 2-й і початку 3-го тижня сальмонели починають виділятися з організму з калом, сечею, слиною і т. п.

Період реконвалесценції (одужання) характеризується очищенням організму від збудника, посиленням фагоцитарної активності клітин, накопиченням антитіл в крові.

Однак при черевному тифі і паратифах бактеріовиділення часто не закінчується з одужанням хворого - формується бактеріоносійство. Хронічні запальні явища в жовчному міхурі сприяють переживання сальмонел в жовчі і їх тривалого виділенню з організму (іноді до декількох років).

Імунітет. Постінфекційний імунітет досить напружений і тривалий. Повторні захворювання спостерігаються рідко. У перебіг хвороби виробляються антитіла: в кінця 1-го тижня з'являються аглютиніни, преципітини і інші види антитіл. Кількість їх наростає, досягаючи максимуму на 14-15-й день хвороби. Антитіла зберігаються в сироватці крові перехворів тривалий час.

Активність фагоцитів і інші клітинні фактори захисту також мають значення при формуванні імунної стану організму.

Профілактика. Дотримання особистої гігієни та проведення всіх санітарно-гігієнічних заходів: нагляд за джерелами водопостачання, контроль продуктів харчування і за підприємствами громадського харчування.

Специфічна профілактика. Хімічна вакцина, що містить повні антигени збудників черевного тифу, паратифів А і В і правцевий анатоксин (ТАВ'te). Є також брюшнотифозная

спиртова вакцина, збагачена Vi-антигеном, введення якої з профілактичною метою дає хороший ефект. В осередку захворювання особам, які контактували з хворим, дають черевнотифозний бактеріофаг.

Лікування. Антибіотики: левоміцетин, тетрациклін та ін.

Мікробіологічна діагностика черевного тифу і паратифів

Матеріалом для мікробіологічних досліджень є кров, випорожнення, сеча, кістковий мозок, жовч, відокремлюване зі скарифікованих роzeол.

Використовують бактеріологічний і серологічний методи мікробіологічної діагностики.

Бактеріологічний метод. Виділення гемокультури (ранній метод діагностики черевного тифу й паратифів). Кров, взяту із ліктевої вени висівають в 10% жовчний бульйон чи середовище Рапопорт. Рідкого середовища беруть в 10 раз більше, ніж крові, щоб усунути вплив бактерицидних властивостей крові на мікроорганізми. Селективними для збудників тифо-паратифозних захворювань є середовища до складу яких входить жовч. Зразу ж кров висівають і на диференційно-діагностичні середовища: Ендо, Плоскірева, Ресселя. Висіви крові поміщають у термостат при температурі 37°C. Через 18-24 години вивчають характер росту на живильних середовищах: в жовчному бульйоні відмічають помутніння середовища; у середовищі Рапопорт при розмноженні *S. typhi*, які розщеплюють глюкозу з утворенням кислоти, виявляють зміни кольору середовища на червоний; розмноження паратифозних сальмонел супроводжується утворенням газу й кислоти. На середовищах Ендо і Плоскірева *S. typhi*, *S. par. A.* і *S. par. B.* утворюють безбарвні колонії S форми. У середовищі Ресселя сальмонели черевного тифу ферментують глюкозу з утворенням кислоти (посиніння стовпчика агару), не розщеплюють лактозу (колір скошеної частини агару не змінюється). Сальмонели паратифів ферментують глюкозу з утворенням кислоти й газу.

За відсутності росту мікробів, на диференціально-діагностичних середовищах, проводять пересівання з середовищ збагачення (10% жовчний бульйон, середовище Рапопорт) на середовище Ендо, Плоскірева й продовжують інкубацію.

З підозрілих колоній, які вирости, гоують мазок, фарбують за Грамом, мікроскопують.

Збудники черевного тифу й паратифів мають паличкоподібну форму, вони середніх розмірів (до 3-4 мкм в довжину), з закругленими кінцями, грамнегативні. В препаратах розташовуються неупорядковано.

Після отримання великої кількості мікробів на середовищі Ресселя і перевірки культури, яка вирости, на чистоту, продовжують її ідентифікувати: висівають мікроби у строкатий ряд з метою вивчення біохімічних властивостей; ставлять реакцію аглютинації на склі з полівалентною адсорбованою сальмонельозною О-сироваткою, адсорбованими монорецепторними О-сироватками, монорецепторними Н-сироватками чи розгорнуту (в пробірках) реакцію аглютинації Грубера з неадсорбованими діагностичними сироватками з метою вивчення антигенних властивостей.

Наступного дня враховують біохімічні властивості виділеної культури, результати розгорнутої реакції аглютинації. Збудники черевного тифу розщеплюють глюкозу і маніт до кислоти, лактозу й сахарозу не ферментують. Паратифозні мікроби розщеплюють ті ж вуглеводи, але глибше – до кислоти й газу. Білки розщеплюють до H_2S лише *S. typhi* й *S. par. B.*, індол не утворюється.

Якщо мікроби аглютинують до титру вказаного на ампулі з діагностичною неадсорбованою аглютинованою сироваткою чи хоча б до напівтитру, то враховуючи вивчені морфологічні, тінкторіальні, культуральні, біохімічні й антигенні властивостей роблять остаточний висновок про видову приналежність виділеної культури. Аналогічним чином виділяють й мієлокультуру. При цьому досліджують пунктат кісткового мозку.

Всі виділені штами збудника черевного тифу повинні підпадати типуванню за допомогою типових Vi-бактеріофагів, що допомагає виявити джерело інфекції.

Для вибору активних препаратів для лікування визначають чутливість виділеної культури мікробів до антибіотиків.

Виділення білікультури. Жовч, яку отримують шляхом зондування, висівають у флакон з 10% жовчним бульйоном (50 – 100 мл). Висіви поміщають у термостат при температурі 37°C на 18 – 24 г.

Наступного дня враховують ріст і роблять висіви на диференціально-діагностичні середовища Ендо, Плоскірева, вісмут-сульфіт агар. В подальшому виділення чистої культури мікробів та їх ідентифікацію здійснюють як і бактеріологічному дослідженні крові.

Виділення копро – і уринокультури. Це дослідження проводять як з метою діагностики захворювання, так і при обстеженні реконвалісцентів, виявленні носіїв бактерій. Фекалії, сечу висівають на середовище збагачення (селенітова, Мюлера). Висіви помішають у термостат (t 37°C). Через 18 – 24 годин роблять висів із середовища збагачення на диференціально – діагностичні середовища Ендо, Плоскірева, вісмут – сульфід агар. Подальше дослідження провадять так само, як при виділенні гемо – й білікультури.

Серологічний метод. З другого тижня захворювання можна виявити антитіла до збудників вказаних захворювань в реакції аглютинації Відаля, яку ставлять одночасно з роздільними O – й H-діагностикумами, а також з паратифозними A й B діагностикумами для виключення можливих помилок, пов'язаних зі щепленнями чи раніше перенесеним захворюванням. Досліджуються парні сироватки. При захворюванні у другій сироватці крові, взятій через 10 – 12 діб виявляється зростання титру антитіл.

Більш специфічною реакцією є РПГА. Для її постановки використовують еритроцитарний діагностикум сенсibilізований O чи Vi – антигеном.

РПГА з еритроцитарним Vi-діагностикумом використовується для попереднього відбору осіб з підозрою на черевнотифозне бактеріоносійство. Діагностичне значення має утворення гемаглютината у розведеннях сироватки, яка досліджується 1:40 й вище.

Харчові токсикоінфекції

Збудником є біпатогенні сальмонели: *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella anatum* та інші. Вони входять до родини Enterobacteriaceae, роду *Salmonella*.

Джерела інфекції. Тварини і птиці, хворі сальмонельозами, або здорові, в організмі яких, не завдаючи їм шкоди, знаходяться сальмонели.

Шляхи передачі. Зараження відбувається при вживанні м'яса, м'ясних продуктів, яєць, молока, молочних продуктів, інфікованих сальмонелами. Найбільш небезпечним є вживання їжі, в якій відбувається розмноження і загибель сальмонел і накопичення ендотоксину.

Патогенез. Потрапивши в організм через рот, сальмонели проникають в травний тракт. При цьому значна частина бактерій гине і звільняється ендотоксин, який може проникнути в кров. З'являються симптоми ураження шлунково-кишкового тракту і загального токсикозу. Захворювання триває не більше 4-5 днів; іноді перехворілі стають носіями сальмонел.

Імунітет нетривалий. У крові хворих і реконвалісцентів накопичуються різні антитіла: аглютиніни, преципітіни та ін. Сероварів сальмонел дуже багато, а імунітет специфічний, тобто є направлений тільки проти одного збудника, тому людина може повторно хворіти на сальмонельоз.

Профілактика. Постійний строгий ветеринарно-санітарний контроль за худобою, забоєм і обробленням туш, зберіганням і обробкою м'яса і м'ясних продуктів. Необхідно

суворе дотримання санітарно-гігієнічного режиму і особистої гігієни на підприємствах громадського харчування.

Специфічна профілактика. Людям, що знаходяться в осередках харчової токсикоінфекції, слід давати сальмонельозний полівалентний бактеріофаг.

Лікування. Основним терапевтичним засобом є дезинтоксикація організму - введення великої кількості рідини, промивання шлунка. Застосовують також антибіотики.

Мікробіологічна діагностика харчової токсикоінфекції сальмонельозної етіології

Матеріалом для дослідження служать блювотні маси, промивні води шлунку, випорожнення, жовч, спинномозкову рідину, пунктат кісткового мозку, кров, секційний матеріал. Матеріал для дослідження, який має щільну (густу) консистенцію розтирають у фарфорових ступках з фізіологічним розчином до отримання однорідної суспензії.

Мікробіологічну діагностику харчових токсикоінфекцій сальмонельозної етіології проводять наступними методами: бактеріологічним, біологічним, рідше серологічним.

Бактеріологічний метод є основним. Він включає в себе виділення чистої культури сальмонел та їх ідентифікацію.

Матеріал, який досліджують висівають на щільні поживні середовища: Ендо, Плоскірева, вісмут-сульфіт агар та рідке середовище накопичення (селективне чи магнієве) з якого через 6-10 годин роблять пересів на ті ж щільні поживні середовища. Висіви витримують у термостаті при t 37°C 18-20 годин. Наступного дня відбирають безбарвні колонії на середовищах Ендо та Плоскірева, чорні на вісмут-сульфіт агарі, готують з них мазки, фарбують за Грамом, ставлять реакцію аглютинації на склі з полівалентною адсорбованою сальмонельозною О-сироваткою, пересівають на середовище Ресселя чи Олькеницького для накопичення чистої культури мікробів та визначення ферментативної активності. Культуру, яка розщеплює лише глюкозу, вивчають далі: готують мазки, фарбують їх за Грамом, мікроскопують (перевірка на чистоту). Для вивчення біохімічних властивостей роблять висів на вуглеводні середовища Гіса й ставлять реакцію аглютинації на склі з полівалентною адсорбованою сальмонельозною О-сироваткою. У разі аглютинації культури полівалентною сироваткою, визначають групову приналежність мікробів в реакції аглютинації на склі з адсорбованими груповими монорецепторними О-сироватками (А, В, С, D, E).

Якщо відбулась реакція аглютинації з однією з групових сироваток, ставлять реакцію з монорецепторними Н-сироватками (неспецифічною чи специфічною фазами) для визначення виду й серовару бактерій. На четвертий день дослідження враховують зміни в середовищах Гісса. Сальмонели – збудники харчових токсикоінфекцій не ферментують лактозу и й агарозу, розщеплюють глюкозу, маніт, мальтозу з утворенням кислоти й газу, не утворюють індол, продукують H_2S .

Виділення сальмонел з блювотних мас, промивних вод шлунку, харчових продуктів є підтвердженням діагнозу харчової токсикоінфекції сальмонельозної етіології.

Біологічний метод. Сальмонели, які викликають харчові токсикоінфекції, на відміну від збудників черевного тифу паратифів А й В, є патогенними для білих мишей. Ця ознака використовується для диференціації моно - та біпатогених сальмонел. З цією метою дослідний матеріал вводять білим мишам. Через 1-2 доби миші гинуть від септицемії. При розтині знаходять різко збільшені селезінку, печінку. Під час бактеріологічного дослідження паренхіматозних органів, крові та серця виділяють чисту культуру сальмонел.

Серологічний метод. Для виявлення специфічних антитіл у сироватці крові обстежуваної особи використовують реакцію пасивної гемаглютинації та імуноферментний аналіз. Серологічний метод є методом ретроспективної діагностики, який використовують для підтвердження діагнозу в разі відсутності даних про виділення сальмонел від хворого.

Внутрішньолікарняна сальмонельозна інфекція

Збудником внутрішньолікарняної сальмонеллезної інфекції найчастіше є *S. typhimurim*. Відзначаються також "госпітальні" спалаху, викликані *S. heidelberg*, *S. derby* та ін. Хоча морфологічні та культуральні властивості цих збудників не відрізняються від властивостей інших сальмонел, є деякі біологічні особливості, характерні для них. Так, наприклад, збудники внутрішньолікарняних інфекцій відносяться до певних біовар, вони більш патогенні для білих мишей і т. П.

Джерела інфекції. Найчастіше бактеріоносій, рідше хворий.

Шляхи передачі. Переважає непрямий контакт (іграшки, білизну, предмети догляду за хворим). Рідше мають місце повітряно-пиловий і харчової шляхи передачі.

Патогенез. Захворювання розвивається на тлі ослаблення організму і зниження його імунної активності. Збудник потрапляє в організм перорально або через дихальні шляхи, що і визначає розвиток патологічного процесу: розлад функції шлунково-кишкового тракту з зневодненням або ураження органів дихання, бактеріємія, септичні ускладнення. Хворіють в першу чергу діти раннього віку.

Імунітет. Виробляється тільки по відношенню до одного серовару сальмонел.

Профілактика. Суворе дотримання санітарно-гігієнічного режиму в лікувальних установах.

Специфічна профілактика. При виникненні внутрішньолікарняної сальмонеллезної інфекції дітям, які контактували з хворим, слід давати сальмонельозний полівалентний бактеріофаг.

Лікування. Симптоматичне.

Теоретичні питання:

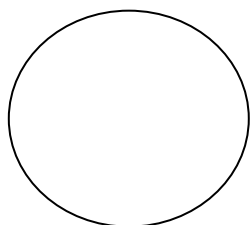
1. Рід сальмонел (*Salmonella*). Загальна характеристика роду.
2. Класифікація за біохімічними характеристиками та антигенній структурі (Кауфмана-Уайта).
3. Сальмонели – збудники генералізованої інфекції (черевної тиф та паратиф):
 - біологічні особливості
 - антигенна структура
 - патогенез та імуногенез захворювань, бактеріоносійство
 - мікробіологічна діагностика.
4. Сальмонели – збудники харчових токсикоінфекцій.
5. Біологічні властивості.
6. Антигенна структура, фактори патогенності.
7. Патогенез і імуногенез захворювання. Бактеріоносійство.
8. Методи мікробіологічної діагностики сальмонельозів.
9. Специфічна профілактика і лікування сальмонельозів.

Протокол № 5

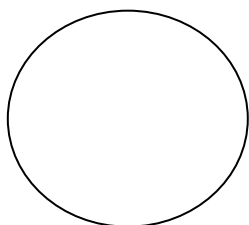
Тема: Мікробіологічна діагностика дизентерії.

Мета: Освоєння методів мікробіологічної діагностики, етіотропної терапії і профілактики шигельозів.

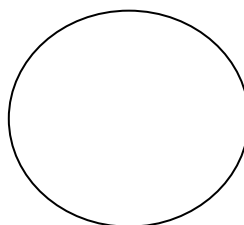
1. Мікроскопія і замалювання демонстраційних препаратів *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii*, *S. sonnei* у мазках із чистих культур.



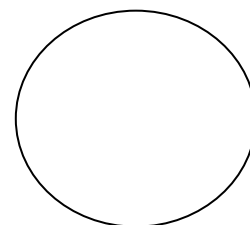
S. dysenteriae



S. flexneri



S. boydii



S. sonnei

(фарбування за Грамом)

2. Вивчення культурально-біохімічних властивостей шигел по колекції: ріст на МПБ та МПА _____

колонії на середовищі Ендо _____

ріст на середовищі Ресселя _____

проба на індол _____

проба на H₂S _____

Біохімічні властивості шигел

Види шигел	Ферментація вуглеводів					Утворення ідолу	Токсико-утворення
	Глюкоза	Маніт	Дульцит	Лактоза	Сахароза		
<i>S. dysenteriae</i>	+	-	-	-	-	-	+
<i>S. flexneri</i>	+	+	+	-	-	±	-
<i>S. boydii</i>	+	+	+	-	-	-	-
<i>S. sonnei</i>	+	+	-	+	+	±	-

3. Вивчення антигенів шигел.

Класифікація бактерій роду *Shigella*

Підгрупа	Вид	Серовар	Підсеровар
А	<i>S. dysenteriae</i>	1-10	-
В	<i>S. flexneri</i>	1	1a, 1b
		2	2a, 2b
		3	3a, 3b
		4	4a, 4b
		5	5a, 5b
		6	-

		X-варіант*	-
		Y-варіант**	-
C	<i>S. boydii</i>	1-15	-
D	<i>S. sonnei</i>	-	-

Примітка:* – видова належність чітко не установлена;** – позбавлені типових Ag (ідентифікують за груповими Ag);'-' – Ag відсутній, або неідентифікований.

4. Вивчення біологічних препаратів:
 - для постанови алергічної проби – дизентерин;
 - для серодіагностики – діагностикуми Флекснера і Зоне для реакції аглютинації і діагностикум для РНГА;
 - сироватки для ідентифікації шигел – аглютинуючі полівалентні сироватки, аглютинуючі видоспецифічні сироватки, аглютинуючі адсорбованні типові сироватки для визначення серотипів усередині виду;
 - для специфічної терапії і профілактики – полівалентний дизентерійний бактеріофаг.
5. Ознайомлення з колекцією антибіотиків і сульфаніламідних препаратів для лікування дизентерії: фторхінолони, ампіцилін, сульфаніаміди (Бісептол).
6. Самостійна робота студентів: посів 'фекалій хворого на холеру' на 1% пептонну лужну воду і на лужний агар у чашці Петрі.
7. Вивчення схеми лабораторної діагностики дизентерії.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Шигели

Відповідно до Міжнародної класифікації всі бактерії, що викликають дизентерію, в честь Шига об'єднані в один рід - шигели.

Збудники *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii*, *Shigella sonnei* входять до родини Enterobacteriaceae, роду *Shigella*.

Морфологія. Шигели - це невеликі (2-3 × 0,4-0,6 мкм) палички з закругленими кінцями. Відрізняються від інших представників сімейства Enterobacteriaceae відсутністю джгутиків. Вони не мають спор і капсул. Грамнегативні.

Культивування. Шигели - факультативні анаероби. Невибагливі до живильних середовищ. Розмножуються на МПА і МПБ при температурі 37°C і рН 7,2-7,4. Елективних і диференційно-діагностичними середовищами для них є середовища Плоскірева, Ендо, ЕМС. Ростуть у вигляді невеликих, напівпрозорих, сіруватих, круглих колоній, розміром 15-2 мм в S-формі. Винятком є шигели Зонне, які часто диссоціюють, утворюючи великі, плоскі, мутні, з порізнаними краями колонії R-форми. У рідких поживних середовищах шигели дають рівномірну каламуть, R-форми утворюють осад.

Ферментативні властивості. Ферментативні властивості шигел менш виражені, ніж у інших представників Enterobacteriaceae: вони розщеплюють вуглеводи без газоутворення, що не розщеплюють лактозу і сахарозу. Винятком є шигели Зонне, які на 2-3-й добі розщеплюють ці вуглеводи.

Протеолітичні властивості у шигелл мало виражені - освіту індолу і сірководню не постійно, молоко вони згортають, желатин не розріджують.

По відношенню до маніту все шигели діляться на розщеплюють і нерозщеплюваних маннит.

В даний час шигели Зонне ділять на чотири ферментативні типу. Розрізняються вони по можливості розщеплювати рамнозу і ксилозу.

Біоваріанти шигел Зонне

Біоваріант	розщеплення вуглеводів	
	рамноза	ксилоза
I	+	-
II	(+)	-
III	+	+
IV	+	(+)

Примітка. + розщеплення; (+) розщеплення через 3-5 днів; - не змінюється.

Токсинутворення. Шигели мають ендотоксинів. Винятком є шигели Шиги, сформованими незалежно від ендотоксину виділяють екзотоксин, який надає нейротоксическое дію.

Антигенна структура і класифікація. Шигели містять соматичні антигени, до яких відносяться групові та типові антигени. За Міжнародною класифікацією шигели поділяють на чотири групи, що позначаються латинськими великими буквами А, В, С, D.

Група А S. dysenteriae: 1 - Григор'єва - Шиги; 2 - Штутцер - Шмітца; 3-7 - Лардж - Сакса і 8-10 - провізорні. Представники цієї групи мають тільки типові антигени, що позначаються арабськими цифрами.

Група В S. flexneri. Мікроби цієї групи мають більш складну антигенну структуру - вони містять типові антигени, що позначаються римськими цифрами, і групові антигени, що позначаються арабськими цифрами. Шигели Флекснера мають 6 сероваріантів. Шигели Флекснер 6 раніше позначали як підвид *S. newcastle*.

Група С S. boydii. Має тільки типові антигени. У цій групі 15 серологічних типів.

Група D S. sonnei має свій видовий антиген.

При мікробіологічному дослідженні у відповідях вказують сероваріантів і подсероваріант виділеної культури. Наприклад, виділена культура шигел Флекснера 1а.

Стійкість до факторів навколишнього середовища. Температура 100°C вбиває шигели миттєво. Температура 60°C вбиває їх через 20-30 хв. До низьких температур шигели стійкі - в річковій воді вони зберігаються до 3 міс, на овочах і фруктах - до 10-15 міс. Сонячне світло вбиває їх через 2-3 год, а шигели Шиги - через 20 хв. Загальноживані концентрації дезінфікуючих розчинів гублять їх через 20-30 хв. Найменш стійкі до впливу зовнішніх факторів шигели групи А, а найбільш стійкі шигели Зонне.

Сприйнятливість тварин. Тварини не чутливі до збудників дизентерії, винятком є мавпи. Експериментальне зараження кроликів і білих мишей викликає у них інтоксикацію і загибель.

Джерела інфекції. Людина, яка хворіє на гостру і хронічну форму дизентерії, і бактеріоносій.

Шляхи передачі. Харчовий. Велике значення має водний шлях, овочі, фрукти, різні предмети, обсіменені шигеллами, і мухи.

Патогенез. Потрапивши з їжею в кишечник, шигели проникають в клітини епітелію слизової оболонки товстого кишечника, де розмножуються. Частково вони гинуть. Утворений при руйнуванні бактерій ендотоксин сенсibiliзує слизову оболонку, підвищується проникність кровоносних судин, і ендотоксин всмоктується в кров, викликаючи інтоксикацію. Поразка слизової оболонки супроводжується набряком, некрозами, геморагіями. Крім того, токсин впливає на центральну нервову систему, що призводить до трофічних розладів. Особливо важко протікає захворювання, викликане шигеллами Шиги, які глибоко проникають в слизову оболонку товстої кишки, викликаючи

різку гіперемію, набряк і кривавий пронос. Утворений ними екзотоксин викликає важку інтоксикацію.

Для виникнення захворювання має значення величина інфікувати дози.

Імунітет. У людини є природна резистентність до дизентерійної інфекції. Після перенесеного захворювання імунітет нестійкий, а після дизентерії Зонне практично відсутня. При захворюванні, викликаному шигеллами дизентерії 1 (Григор'єва - Шиги) виробляється більш стійкий антитоксичний імунітет.

Профілактика. Загальні санітарно-протиепідемічні заходи: ізоляція, рання діагностика, дезінфекція.

Специфічна профілактика не знайшла широкого застосування. Особам, хто був у контакті з хворими, дають полівалентний дизентерійний бактеріофаг.

Лікування. Комплексне, сульфаніламіді з антибіотиками. Специфічного лікування немає.

Мікробіологічна діагностика бактеріальної дизентерії

Основним матеріалом для мікробіологічної діагностики є випорожнення хворих, реконвалісцентів, носіїв. Рідше використовують блювотні маси й промивні води шлунка. Для виявлення специфічних антитіл досліджують кров.

При заборі матеріалу треба суворо дотримуватись наступних вимог:

1. Добір проб для мікробіологічного дослідження треба виконувати до вживання антимікробних препаратів
2. Відбирати проби калу треба безпосередньо з прямої кишки з допомогою тампону чи скляної оплавленої трубки
3. Висів на поживні середовища слід робити зразу ж після добору матеріалу
4. Якщо висів неможливо зробити терміново, то фекалії слід помістити у консервуючий розчин (гліцерина суміш) і якнайшвидше передати до лабораторії.

Мікробіологічну діагностику дизентерії проводять бактеріологічним та серологічним методами.

Бактеріологічний метод. Випорожнення висівають в чашки з середовищами Плоскірева, Ендо і в селенітове середовище, які затримують ріст супутньої флори, зокрема *E. coli*. Висіви поміщають в термостат при температурі 37°C. Через 18-24 годин вивчають чашки з висівами. На середовищах Плоскірева та Ендо шигели утворюють колонії S форми – круглі, опуклі, з рівним краєм, безколірні, дрібні чи середніх розмірів (1 – 3 мм). *S. Sonnei* можуть давати колонії R – форми – плоскі з зазубреним краєм.

Підозрілі колонії (не менше трьох) пересівають в пробірки з середовищами Реселя чи Олькеницького й поміщають їх в термостат.

Наступного дня враховують характер росту на середовищах Реселя чи Олькеницького, аналізують культури, які не ферментують лактозу й сечовину, але ферментують глюкозу з утворенням кислоти, готовлять мазок, фарбують за Грамом, мікроскопують. Якщо культура мікробів чиста, продовжують вивчати її біохімічні властивості. Культуру пересівають у строкатий ряд, що складається із напіврідких середовищ Гіса з глюкозою, лактозою, манітом, мальтозою, цукрозою, в 1% пептонну воду з індикаторними папірцями на сірководень та індол. Для вивчення рухливості мікробів їх висівають у пробірку з 0,2% поживним агаром. Випробовують виділену культуру мікробів на чутливість до полівалентного дизентерійного бактеріофагу.

Антигенні властивості штамів мікробів, які досліджуються, вивчають в реакції аглютинації на склі. Це спочатку виконують із сумішшю сироваток, які включають антитіла до шигел, що переважають у даній місцевості, а потім з монорецепторними видовими та типовими сироватками.

Через 18 – 24 годин аналізують результати висівів попереднього дня. Шигели, як правило, ферментують глюкозу до кислоти (за виключенням *S. flexneri* серовару 6). Ферментація лактози спостерігається на 2 – 3 добу тільки у штамів *S. sonnei*. Збудники дизентерії не ферментують цукрозу. На 1% пептонній воді не утворюють сірководень, а утворення індолу різне у різних видів шигел і сероваріантів в межах одного виду. Шигели нерухомі, лізуються полівалентним дизентерійним бактеріофагом.

Для визначення виду шигел може бути використана пряма РІФ.

Серологічний метод. Специфічні до шигел антитіла виявляють у сироватці крові в реакції аглютинації типу Відаля з дизентерійними діагностикумами, а також в реакції пасивної гемаглютинації (РПГА) з еритроцитарним дизентерійним діагностикумом (див. додаток). Серологічний метод в основному використовують для ретроспективної діагностики. Позитивний результат не звільняє від проведення бактеріологічного дослідження по повній схемі.

Теоретичні питання:

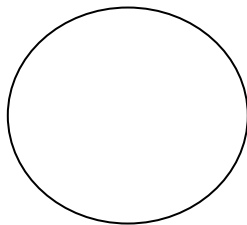
1. Характеристика збудників шигельозів. Біологічні властивості.
2. Класифікація шигел. Принципи, покладені в основу.
3. Епідеміологія, патогенез і клінічні особливості шигельозів.
4. Лабораторна діагностика.
5. Принципи лікування і профілактика шигельозів.

Протокол № 6

Тема: Мікробіологічна діагностика холери.

Мета: Освоїти методи лабораторної діагностики холери.

1. Мікроскопія і замалювання демонстраційного препарату холерного вібріону.



Vibrio cholera (фарбування за Грамом)

2. Вивчення рухомості в фазово-контрастному мікроскопі (демонструється вібріон Мечнікова).

3. Вивчення культуральних властивостей холерного вібріону по колекції:

ріст на 1% пептонній лужній воді _____

колонії на лужному агарі _____

ріст уколом у стовпець желатину _____

4. Вивчення біохімічних властивостей (тріада Хейберга) холерного вібріону, вібріона Ель-Тор і холероподібного вібріона Мечнікова (по колекції).

Розщеплення:

манози _____

цукрози _____

арабінози _____

5. Вивчення біологічних препаратів для діагностики холери:

- аглютинуючі діагностичні сироватки (полівалентна О-сироватка і адсорбуючі О-сироватки Інаба і Огава);

- холерна люмінісцируюча сироватка;

- холерні бактеріофаги: монофаг Ель-Тор і монофаг 'С'.

6. Вивчення диференціально-діагностичних ознак холерних вібріонів.

Диференціальні ознаки холерних вібріонів

Ознака	<i>V.cholerae</i> біовар <i>asiaticae</i>	<i>V.cholerae</i> біовар <i>eltor</i>	Серовар O139 (Бенгал)
Реакція Фогеса-Проскауера	± (частіше -)	± (частіше +)	± (частіше +)
Чутливість до поліміксину В	+	-	-
Гемоліз еритроцитів барана	-	+	-
Аглютинація курячих еритроцитів	-	± (частіше +)	± (частіше +)
Чутливість до класичного монофагу	+	-	-
Чутливість до монофагу Ель-Тор	-	+	-

Гексаміновий тест	-	+	-
-------------------	---	---	---

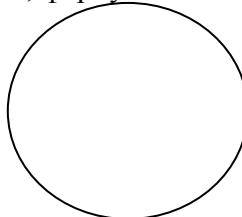
7. Вивчення препаратів для специфічної терапії (бактеріофаг холерний) і специфічної профілактики холери (холерна вакцина, холероген-анатоксин).

8. Вивчення антибіотиків і хіміопрепаратів для лікування холери (тетрацикліни, левоміцетін, ко-тримоксазол, фуразолідон).

9. Самостійна робота:

- вивчення посівів 'фекалій холерного хворого' на 1% пептонній лужній воді і лужному агарі, опис ознак росту

- приготування мазка із плівки і з колонії, фарбування за Грамом, мікроскопія, замалювання



- постановка реакції мікроаглютинації з O-холерною сироваткою.

Заключення:

10. Вивчення схеми лабораторної діагностики холери.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Збудники холери

Збудник *Vibrio cholerae* входить до родини *Vibrionaceae*, роду *Vibrio*. Найбільше значення в патології людини мають 2 біовари: *V. cholerae* и *V. eltor*.

Морфологія. Холерні вібріони - невеликі (1-3 × 0,2-0,4 мкм) злегка зігнуті палички, мають вигляд коми, дуже поліморфні. На штучних поживних середовищах, особливо в старих культурах, вони можуть мати вигляд куль, зерен, ниток, спіралей. Холерні вібріони дуже рухливі. Монотріхі - джгутик в кілька разів перевищує довжину клітини. Суперечка і капсул не утворюють. Грамнегативні. У забарвлених мазках розташовуються у вигляді зграї риб. При електронній мікроскопії встановлено, що між стінкою і цитоплазмою знаходяться вакуолі. Вважають, що в цих вакуолях синтезується екзотоксин.

Культивування. Холерні вібріони - факультативні анаероби. До живильних середовищ невибагливі. Щелочелюбиві. Розмножуються при температурі 37-39 ° С і рН 8-9. Добре ростуть на МПА і МПБ. Елективним середовищем є лужна 1% пептонна вода. На поверхні цього середовища вони утворюють ніжну блакитнувату плівку. На щільному середовищі ТВРС (тіосульфатцітратсахарозний агар з додаванням солей жовчі) утворюються колонії жовтого кольору на тлі блакитним середовища. Розмножуються швидко: в рідких поживних середовищах 6-8 ч, на щільних - 12-14 год (на лужних середовищах зростання холерних вібріонів випереджає зростання інших бактерій). Холерні вібріони диссоціюють з S- в R-форму. Цей процес супроводжується зміною антигенної структури.

Ферментативні властивості. Холерні вібріони біохімічно активні. Вони мають сахаролитическою, протеолітичними і диастатический властивостями. Сахаролитические властивості виражаються в розщепленні Сахаров до утворення кислоти. Ферментація глюкози, сахарози, манніта, манози і відсутність ферментації Арабіноза є важливою діагностичною ознакою. Протеолітичні властивості: холерні вібріони розріджують желатин, розкладають триптофан до освіти індолу, продукують оксидазу, відновлюють нітрати в нітрити, згортають молоко. Сірководень не утворюють. Диастатический властивості виражаються в розщепленні розчинної крохмалю. Холерний вібріон продукує ферменти патогенності: фібринолізин, плазмокоагулаза, гіалуронідазу, лецитиназу, колагеназу і ін.

Токсинутворення. Холерні вібріони продукують токсини трьох типів. Токсин I типу - ендотоксин, виділяється при руйнуванні мікробної клітини, термостабильн (ліпополісахарид). Вважають, що він сприяє розвитку антибактеріального імунітету. Токсин I типу - екзотоксин (холероген) термолабильн, володіє ентеротоксическімі дією і грає важливу роль в патогенезі холери (посилює функцію секреторних клітин тонкого кишечника, що призводить до зневоднення організму). Токсин III типу термостабильн, вважають, що він пригнічує активний транспорт натрію через епітелій кишечника.

Антигенна структура. Холерні вібріони мають термостабильний соматичний O-антиген і термолабильних H-антиген. H-антиген неспецифічний і є загальним для всього роду *Vibrio*. O-антиген має видовий і типовий специфічність. За O-антигену холерні вібріони поділяють на 54 групи. *Vibrio cholerae* і *Vibrio eltor* відносяться до O1 групи. У середині O1 групи розрізняють три компонента - A, B, C, по поєднанню яких виділяють три серовара. Поєднання АВ - серовар Огава, поєднання АС - серовар Інаба, поєднання АВС - серовар Гікокшіма.

Стійкість до факторів навколишнього середовища. При температурі 60°C холерні вібріони гинуть протягом 5 хв, при кип'ятінні - миттєво. Низькі температури вони переносять добре. В льоду зберігаються кілька місяців, в морській і річковій воді - кілька тижнів, в кишечнику мух - 4-5 днів. До висушування і сонячного світла холерні вібріони дуже чутливі. Загальноприйняті концентрації дезінфікуючих речовин вбивають їх швидко. Однак при роботі з збудником холери користуються дезінфікуючими розчинами більшої концентрації. Холерні вібріони чутливі до кислот (соляної кислоти і ін.). Вібріон холери Ель-Тор більш стійкий.

Сприйнятливність тварин. У природних умовах тварини не хворіють на холеру. В експериментальних умовах внутрішньоочеревинне введення холерних вібріонів кроликам і морським свинкам супроводжується вираженим токсикозом, який приводить їх до загибелі.

Джерела інфекції і шляхи передачі. Єдиним джерелом холери є людина, яка виділяє вібріон холери в зовнішнє середовище в період захворювання або носійства. При холері, викликаній вібріоном Ель-Тор, відзначається тривале носійство. Зараження людини відбувається через продукти (овочі, фрукти), воду та інші об'єкти зовнішнього середовища.

Холера - це давно відома інфекція, яка періодично поширювалася на багато країн і континенти і викликала загибель мільйонів людей. Відомі кілька пандемій холери. У 1917-1926 рр. було зареєстровано 6 пандемій холери. Ці пандемії викликалися класичним вібріоном Коха. У 60-х роках ХХ століття почав поширюватися збудник холери вібріон Ель-Тор.

Патогенез. Зараження відбувається через рот. Потрапивши в шлунок, частина холерних бактерій гине в кислому середовищі шлунка, а частина проникає в кишечник, де лужне середовище і велика кількість продуктів розпаду білків (зокрема, пептони) сприяють їх розмноженню.

На слизовій оболонці тонкої кишки накопичується велика кількість холерних вібріонів і токсину, що утворюється при їх руйнуванні. Токсин порушує функцію слизової оболонки, вона гіпереміро, збільшується проникність епітелію кишечника, порушується секреторна й усмоктувальна функція його. З'являються профузні проноси, повторні блювоти, які виводять з організму велику кількість води і солей (калію і натрію). Втрата великої кількості рідини і солей призводить до висушування тканини, згущення крові, порушення мінерального обміну, ураження центральної і вегетативної нервових систем і інших явищ інтоксикації. Від ступеня інтоксикації залежить форма холери, яка протікає у вигляді холерного ентериту, гастроентериту, альгідної і сухий форми.

Імунітет. Стійкий, носить антимікробний і антитоксичний характер, пов'язаний з наявністю аглютинінів, вібриолізінів, антитоксинів і інших антитіл. Крім того, в імунітеті велике значення надають факторам місцевого захисту.

Профілактика. Проведення загальних протиепідемічних заходів: раннє виявлення хворих, ізоляція і госпіталізація, дезінфекція, обсервація; охорона вододжерел, нагляд за харчовими продуктами, охорона кордонів при епідемічних спалахах і т. п. Для специфічної профілактики використовують вбиту холерну вакцину (холероген-анатоксин в поєднанні з О-антигеном холерного вібріона).

Лікування. Антибіотики тетрациклінового ряду, а також введення рідини і електролітів (солей калію і натрію).

Мікробіологічна діагностика холери

Матеріалом для дослідження від хворих є випорожнення та блювотні маси, а від вібрионосіїв – випорожнення осіб, що загинули від холери досліджують тонкий кшечник й жовчний міхур (секційний матеріал). З об'єктів довкілля вивчається вода відкритих водойм й води стоків.

В мікробіологічній діагностиці холери використовують експрес-метод, бактеріологічний та серологічний методи.

Експрес-метод діагностики. Дозволяє виявити холерний вібріон безпосередньо в матеріалі, який досліджується. Для цього використовують РІФ.

Для швидкого виявлення холерного вібріону використовують також РОПГА з антитільним еритроцитарним діагностикомом й ланцюгову полімеразну реакцію (ЛПР).

Бактеріологічний метод. Є основним методом діагностики холери. Виділення чистої культури вібріону й його ідентифікацію проводять цілодобово в спеціалізованій лабораторії. Остаточна відповідь має бути надана через 36 годин від початку дослідження.

При проведенні бактеріологічного методу діагностики необхідно дотримуватись наступних вимог.

1. Висів матеріалу краще виконувати біля ліжка хворого, оскільки холерний вібріон погано зберігається у випорожненнях хворих та носіїв.

2. Посуд, в який збирають дослідний матеріал, не повинен знезаражуватись хімічними речовинами, оскільки вібріон до них дуже чутливий.

3. Необхідно виключити можливість зараження оточуючих і забруднення об'єктів довкілля.

Висів випорожнень чи іншого матеріалу, який досліджується виконують біля ліжка хворого чи безпосередньо на місці добору матеріалу на 1% лужну пептонну воду (ПВ) й доставляють до спеціалізованої лабораторії з дотриманням всіх правил безпеки у супроводі медичного персоналу. Після 6 годинної інкубації висіву на 1% пептонній воді утворюється тендітна плівка з трохи блакитним відтінком, яка під час струшування пробірки легко руйнується й осідає на дно.

Виготовлений із плівки мазок фарбують за Грамом, мікроскопують. Крім того вміст плівки вивчають під мікроскопом в препараті «висяча» чи «розчавлена» крапля й ставлять з ним реакцію аглютинації на склі з О-холерною сироваткою. Збудники холери грамнегативні, мають паличкоподібну форму, злегка вигнуті, рухливі.

Незалежно від отриманого результату, дослідження продовжують за наступною схемою: вміст плівки пересівають на другу 1% лужну ПВ й лужний МПА чи середовище TCBS, яке є найкращим селективним середовищем для холерних вібріонів, оскільки супутня флора на ньому не росте. На тлі блакитно-сірого кольору цього середовища утворюються колонії холерних вібріонів з жовтим відтінком. Другу ПВ інкубують 6 годин при t37°C й проводять дослідження за тією ж схемою.

У разі виявлення у плівці грамнегативних рухливих паличок, які аглютинуються О-холерною сироваткою, роблять попередній висновок, що виявлено холерний вібріон, й продовжують дослідження далі. З другої ПВ роблять ще раз пересів на лужний МПА.

Підозрілими вважають дрібні, гладенькі, склоподібно-прозорі колонії з ледь помітним блакитним відтінком, які виростили за 12 годин на лужному МПА.

Чисту культуру виділяють на лактозо-цукрозному середовищі й культивують 12 годин при $t37^{\circ}\text{C}$. Відбирають колонії і ставлять пробу на оксидазу. При культивуванні на елективних середовищах проба на оксидазу не робиться.

Ідентифікація чистої культури проводиться за морфологічними, культуральними, біохімічними властивостями, рухливістю і остаточним типуванням з допомогою діагностичних аглютинуючих сироваток О, ОР, Інаба, Огава та бактеріофагів.

Остаточна відповідь про виявлення того чи іншого біовару холерного вібріона можлива при:

1. Виявленні рухливих грамнегативних трохи вигнутих паличок, які виростили в плівці через 6 годин інкубації на другій ПВ;
2. Виявленні дрібних, склоподібно-прозорих колоній, які виростили через 12 годин на лужному МПА й дають позитивну реакцію на оксидазу;
3. Зміні кольору лактозо-цукрозного середовища в нижній частині «стовпчика» без наявності пухирців газу;
4. Ферментації вуглеводів: цукрози (+), арабінози (-), манози (+).
5. Позитивному феномені аглютинації з О- и ОР- холерними сироватками Інаба й Огава.

Основні диференційно-діагностичні критерії *V. cholerae* та *V. eltor*

Вид вібріону	Лізис фагами	Гемоліз еритроцитів барана	Чутливість до поліміксину	Аглютинація курячих еритроцитів
<i>V. cholerae</i>	фаги IV групи	-	+	-
<i>V. eltor</i>	фаги Эль-Тор	+	-	+

Серологічний метод. Носить допоміжний характер. Виявляють специфічні антитіла в сироватці крові хворого в РА, РПГА, ІФА, РІФ (непряма). Токсиннейтралізуючі антитіла з'являються на 5-6 добу хвороби й досягають максимуму на 14-21 добу. Діагностичним титром в РПГА вважається розведення 1:160.

Теоретичні питання:

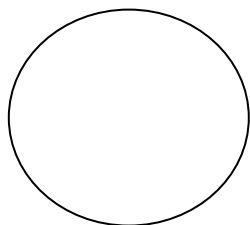
1. Характеристика роду *Vibrio*: морфологія, патогенні представники.
2. Культуральні особливості вібріонів.
3. Біохімічні особливості вібріонів. Диференціація патогенних і непатогенних вібріонів.
4. Антигенна структура. Класифікація вібріонів за антигенною структурою.
5. Токсиноутворення. Патогенність. Механізм дії екзотоксину.
6. Джерело інфекції. Шляхи зараження холерою. Патогенез. Матеріал для дослідження.
7. Лабораторна діагностика холери. Експрес-діагностика, виділення чистої культури.
8. Специфічна профілактика холери.
9. Лікування холери.

Протокол № 7

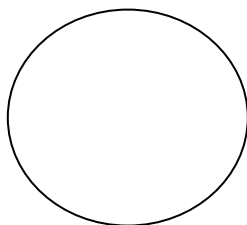
Тема: Мікробіологічна діагностика інфекцій, обумовлених клебсієлами, протеем та синьогнійною паличкою.

Мета: Вивчення методів мікробіологічної діагностики, терапії та профілактики захворювань, обумовлених клебсієлами, протеем та синьогнійною паличкою.

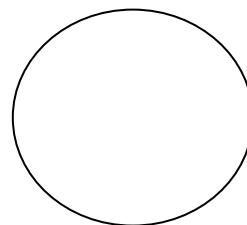
1. Мікроскопія і замалювання демонстраційних препаратів: мазків із чистої культури клебсієл, протее та синьогнійної палички.



Klebsiella pneumoniae
(фарбування за Грамом)



Proteus vulgaris
(фарбування за Грамом)



Pseudomonas aeruginosa
(фарбування за Грамом)

2. Вивчення колекції живильних середовищ:

- а) *P. aeruginosa*: ЦПХ агар (з ацетамідом або з N-цетілпіридоній хлоридом), кров'яний агар.
- б) *Proteus* spp.: середовище Ендо, середовище Проскірева, вісмут-сульфіт агар, агар з діамантовим зеленим, середа Ресселя, кров'яний агар.
- в) *Klebsiella* spp.: середовище Ендо, середовище Плоскірева, середовище Ресселя.

3. Вивчення колоній *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* і *P. vulgaris* на поживних середовищах.

4. Вивчення схем лабораторної діагностики інфекцій, обумовлених клебсієлами, протеем та синьогнійною паличкою.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Клебсієли

Захворювання, які, викликаються представниками роду *Klebsiella* називаються клебсієльозами й належать до антропонозних інфекцій. Збудниками є: *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaeanae* викликають смердючий нежить, *Klebsiella rhinoscleromatis* - риносклерому. Входять до сімейства Enterobacteriaceae, роду *Klebsiella*. Клебсієли можуть викликати пневмонії, гострі кишкові захворювання, ураження сечостатевого тракту, мозкових оболонок, сепсис.

Морфологія. Клебсієли - короткі товсті палички, розміром 0,6-6,0 × 0,3-1,5 мкм із закругленими кінцями. Нерухомі. Утворюють капсулу. В мазках розташовуються поодинокі, парно або короткими ланцюжками.

Культивування. Клебсієли - факультативні анаероби. Добре ростуть на простих поживних середовищах при 35-37°C. На щільних середовищах утворюють куполоподібні слизові колонії, на бульйоні - інтенсивне помутніння.

Ферментативні властивості. Ферментують лактозу, розщеплюють глюкозу і маніт з утворенням кислоти і газу, розкладають сечовину, не утворюють індолу і сірководню.

Токсинутворення. Мають ендотоксинів. Вірулентність їх залежить від наявності капсули - бескапсульних форми менш вірулентніші.

Антигенна структура. Клебсієли містять капсули К і соматичні О-антигени. Поєднання цих антигенів обумовлює приналежність культур до певних сероварів. В даний час відомо 80 К і 11 О-антигенів.

Стійкість до факторів навколишнього середовища. Завдяки наявності капсули клебсієли стійкі і тривало зберігаються в ґрунті, воді, на предметах побуту. При 65°C гинуть протягом години. Чутливі до дії розчинів дезінфікуючих речовин (хлораміну, фенолу та ін.). Відзначається висока резистентність до антибіотиків.

Сприйнятливість тварин. У природних умовах викликають захворювання різних тварин: корів, свиней, коней (мастит, пневмонію, септицемію).

Джерела інфекції. При екзогенної інфекції джерелом інфекції є хвора людина і здоровий носій.

Шляхи передачі. Контактно-побутовий (брудні руки, предмети побуту). У дитячих установах і лікарнях інфекція часто передається через білизну, інструментарій, іграшки.

Патогенез. Клебсієли розвиваються здебільшого як вторинна інфекція в осіб зі зниженою опірністю і у новонароджених (недоношених). Бактерії з верхніх дихальних шляхів і кишечника проникають в різні органи і кров і викликають гнійно-запальні процеси, сепсис, менінгіт.

Імунітет. Послеінфекційний імунітет нетривалий і розвивається тільки в відношенні одного певного збудника (серовар).

Профілактика. Дотримання санітарно-гігієнічного режиму в пологових будинках, лікарнях, дитячих установах. *Специфічна профілактика* відсутня.

Лікування утруднено у зв'язку з високою стійкістю клебсієл до антибіотиків. Найбільш ефективним є застосування гентаміцину, канаміцину, іноді ампіциліну.

Мікробіологічна діагностика клебсієльозу

В якості матеріалу для дослідження беруть: мокротиння, слиз із носа, шматочки тканини, випорожнення. Мікробіологічна діагностика проводиться: мікроскопічним, бактеріологічним, серологічним методами.

Мікроскопічний метод. З матеріалу, який досліджується, готують 2 мазка, фіксують в полум'ї пальника (газової чи спиртової горілки). Один фарбують за Грамом, другий – метиленовим синім (для виявлення капсули). Клебсієли в мазках схожі на короткі, товсті палички. Вони грамнегативні, мають виражену капсулу.

Мікроскопічний метод діагностики є орієнтовним і не виключає проведення бактеріологічного методу.

Бактеріологічний метод. Матеріал, який досліджується, висівають на диференціально-діагностичні середовища Ендо, К-2 (з сечовиною, рамнозою та індикатором бромтимол-синім), на МПА с наступною інкубацією у термостаті при t 37°C на протязі 18-24 годин. Із середовища Ендо відбирають слизові блискучі колонії середніх розмірів або малиново-червоного кольору (*K. pneumoniae*), або рожевого кольору через 48 годин інкубації (*K. ozaenae*), або безбарвні (*K. rhinoscleromatis*). На середовищі К-2 колір з'являються колонії з кольором від жовтого до блакитного. З підозрілих колоній готують мазки, фарбують за Грамом та метиленовим синім (для виявлення капсул) і відсівають на скошений агар чи середовище Ресселя для накопичення чистої культури. Диференціація різних видів клебсієл виконується за біохімічними ознаками.

Біохімічні ознаки представників роду Klebsiella

Вид клебсієл	Ферментація				Утворення уреаз	Утилізація цитрату
	Глюкози	Лактози	Дульциту	Сорбіту		
<i>K. pneumoniae</i>	КГ	К	К	+	+	+
<i>K. ozaenae</i>	Варіабільні реакції	Повільно К	-	-	Варіабельні реакції	Варіабельні реакції
<i>K. rhinoscleromatis</i>	-	-	-	-	-	-

КГ – кислота й газ, К – кислота

Серологічна ідентифікація виділених чистих культур виконується з допомогою стандартних сироваток, виготовлених із крові кроликів, імунізованих капсульними полісахаридними антигенами.

Серологічний метод. Специфічні антитіла у сироватці крові хворих виявляють у РЗК чи реакції аглютинації з О-антигеном клебсієл.

Діагностичне значення має чотирикратне наростання титру антитіл у сироватці крові хворого, яке встановлюється під час повторної постановки реакції.

На 7-8-й день хвороби при підозрі на захворювання риносклероми ставлять РЗК з сироваткою хворого в розведенні 1:100 - 1:1600 і склеромного діагностикумів з убитих клебсієл склероми. Наростання титру антитіл в динаміці захворювання є підтвердженням діагнозу.

Протей

Протеї належать до родини Enterobacteriaceae, роду Proteus. Представниками їх є види: *P. mirabilis*, *P. morganii*, *P. rettgeri*, *P. vulgaris*, *P. inconstans*, що відрізняються здатністю ферментувати багато поживних субстрати.

Морфологія. Бактерії всіх видів цього роду дрібні, поліморфні грамнегативні палички. Середній розмір 0,4-0,6 × 1,0-3,0 мкм. Рухливі, перитрихи. Суперечка і капсул не утворюють.

Культивування. Протеї - факультативні анаероби, добре ростуть на простих поживних середовищах при 20-37°C. Деякі види дають повзуче зростання на щільному живильному середовищі, а при посіві в конденсаційну воду скошеного агару - зростання по всій поверхні середовища (спосіб виділення чистої культури з Шукевичу) .

Ферментативні властивості. Мають сахаролитическою і протеолітичними ферментами.

Токсинутворення. Містять ендотоксин.

Антигенна структура. Протеї містять О-і Н-антигени. В даний час відомо більше 150 О-антигенів і близько 80 Н-антигенів. Поєднання О-і Н-антигенів в мікробної клітині визначає приналежність збудників до тієї чи іншої О-серогрупи або серовару.

Стійкість до факторів навколишнього середовища. Порівняно стійкі в зовнішньому середовищі. Переносять нагрівання до 60°C протягом години і вплив слабких розчинів дезінфікуючих речовин. Володіють стійкістю до багатьох антибіотиків.

Сприйнятливість тварин. Захворювання тварин, викликані протеєм, не описані.

Джерела інфекції. Протеї зазвичай потрапляють у зовнішнє середовище з випорожненнями людини. Таким чином, людина - джерело інфекції.

Шляхи передачі. Харчовий, контактнo-побутовий (брудні руки, білизна, предмети побуту, хірургічні інструменти).

Патогенез. Протей викликає різні форми інфекції. При попаданні в організм через рот, особливо з харчовими продуктами, в яких відбулося розмноження збудника, протей викликає

харчові токсикоінфекції. При потраплянні в організм через ранову і опікову поверхню розвиваються гнійно-запальні процеси в різних органах.

Профілактика. Дотримання санітарно-гігієнічного режиму на харчових підприємствах, в лікарнях і дитячих установах. Специфічна профілактика відсутня.

Лікування. Гентаміцин, карбеніцилін, канаміцин та ін. При ураженні сечостатевої області застосовують препарати нітрофуранового ряду: фурагин, 5-НОК і ін. Є протейний фаг, застосування якого дає хороший ефект.

Мікробіологічна діагностика захворювань, які викликаються протеями

Як матеріал для дослідження беруть випорожнення, кров, блювотні маси, жовч, дуоденальний вміст, сечу, секційний матеріал.

Мікробіологічну діагностику захворювань, що викликаються протеями, проводять бактеріологічним методом. В складних випадках для індикації збудника використовують фагодіагностику.

Бактеріологічний метод. Є основним і базується на виділенні й ідентифікації збудника.

Матеріал, який досліджується висівають на середовище Плоскирева, Ендо, Левіна, вісмут-сульфіт агар й інкубують в термостаті. На середовищі Плоскирева протеї утворюють жовтувато-рожеві колонії (в зоні росту середовище підзолується та жовтіє). На вісмут-сульфітному агарі через 48 годин утворюють сіро-брунатні колонії, з чорною редуційною зоною під ними. На Ендо утворюють безбарвні колонії. Такий ріст притаманний для О- форм, а Н – форми колоній дають суцільний ріст. Ріст супроводжується гнійним запахом. Під час ідентифікації бактерій роду *Proteus* їх легко розрізнити за здатністю давати «феномен роїння» на щільних живильних середовищах (утворення концентричних зон росту по периферії колонії).

Для отримання чистої культури частину колонії пересівають штрихом на поверхню й уколом у стовпчик в тривуглеводне середовище Олькеницького з сечовиною. Після культивування в термостаті визначають зміни середовища. За наявності протеїв воно жовтіє й має на дні чіткий осад (протеї ферментують сечовину й утворюють H_2S , не ферментують лактазу).

Під час бактеріоскопії мазків з чистої культури мікробів, фарбованих за Грамом, знаходять середніх розмірів поліморфні грамнегативні палички, які розташовуються попарно чи ланцюжками. Після оцінки чистоти виділеної культури проводять подальшу ідентифікацію шляхом вивчення біохімічних, антигенних властивостей, чутливості до специфічного бактеріофагу.

Антигенні властивості вивчають у реакції аглютинації з О- и Н- сироватками. Виділену чисту культуру мікробів перевіряють на здатність виробляти бактеріоцини й чутливість до антибіотиків.

Фагодіагностика. В складних випадках для індикації протеїв використовують реакцію наростання титру фагу. Ця реакція дозволяє визначити наявність протеїв до виділення їх в чистій культурі. Вона не виключає проведення класичного бактеріологічного методу діагностики.

Диференційно-діагностичні ознаки бактерії роду Proteus

Вид	Ферментація					Утворення				Розрідження желатини
	Глюкози	Мальтози	Маніту	Ксилози	Саліцину	Індолу	H ₂ S	Уреази	Орнітин-декарбоксілази	
<i>P. vulgaris</i>	+	+	-	±	±	+	+	+	-	+
<i>P. mirabilis</i>	+	-	-	+	±	-	+	+	+	+
<i>P. morganii</i>	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-
<i>P. rettgeri</i>	±	-	+	±	±	+	-	+	-	-
<i>P. inconstans</i>	±	-	-	-	-	+	-	-	-	-

Синьогнійна паличка

Збудник синьогнійної інфекції є *Pseudomonas aeruginosa* (синьогнійна паличка), яка відноситься до родини Pseudomonadaceae, роду *Pseudomonas*. Часто *Pseudomonas aeruginosa* виступає в якості шпитального штаму й викликає внутрішньолікарняні інфекції.

Морфологія. Дрібні грамнегативні палички. Середній розмір 1,5-3,0 × 0,5-0,8 мкм. Рухливі, лофотрихи. Суперечка не утворюють. Іноді утворюють капсулоподібної позаклітинне слиз.

Культивування. Суворі аероби. Добре ростуть на простих поживних середовищах. Оптимальна температура росту 37°C, але можуть рости і при 5-42°C. На МПА утворюють колонії розміром 2-5 мм, круглі, напівпрозорі, блакитно-сірі з перламутровим відтінком; на МПБ дають помутніння і утворюють плівку.

Характерною ознакою *P. aeruginosa* є пігменто- і ароматообразование. Більшість штамів утворює синьо-зелений пігмент - піоціанін, що забарвлює живильне середовище. Піоціанін розчинний у воді. Він володіє антагоністичними властивостями по відношенню до багатьох бактерій, але токсичний і тому не використовується з лікувальною метою. Майже всі штами *P. aeruginosa* мають характерний запах жасмину.

Ферментативні властивості. Ферментує лише один вуглевод - глюкозу. Протеолітична активність добре виражена: розріджує желатин і згорнуту сироватку, згортає молоко. Дає позитивну реакцію на цитохромоксидазу.

Токсинутворення. Утворює токсини, що володіють гемолітичним і цитотоксичною дією і лейкоцидін, лізуючий лейкоцити людини. Має ендотоксин.

Антигенна структура. *P. aeruginosa* має O-і H-антигенами. Належність виділеної культури до певної O-серогрупи встановлюють в реакції аглютинації за допомогою O-сироваток.

Стійкість до факторів навколишнього середовища. При 60°C гине протягом 15 хв. Витримує УФ-опромінення. 2% розчин фенолу губить синьогнійну паличку. Тривало зберігається в опікових скоринках і пилу приміщень (до 2 тижнів). Стійкий до більшості антибіотиків.

Сприйнятливість тварин. Кролики, білі миші і морські свинки чутливі до *P. aeruginosa*.

Джерела інфекції. Людина (хворий і носій).

Шляхи передачі. В основному непрямий контакт. Має значення і повітряно-пилевий шлях.

Патогенез. Синьогнійна паличка викликає гнійно-запальні процеси, локалізація яких залежить від вхідних воріт інфекції: опік, рана, дихальні шляхи та ін.

Захворювання зазвичай розвиваються у осіб зі зниженою опірністю, здебільшого в результаті внутрішньо лікарняного зараження: холецистити, цистити, пієлонефрити, гнійно-запальні ускладнення після оперативного втручання і опіків, сепсис та ін.

Імунітет. Малонапружений.

Профілактика. Дотримання санітарно-гігієнічного режиму в стаціонарах.

Лікування. Антибіотики (карбеніцилін, поліміксин, гентаміцин і ін.). Хороший ефект дає введення плазми донорів, вакцинованих проти *P. aeruginosa* і застосування бактеріофага (піофаг).

Мікробіологічна діагностика синьогнійної інфекції

Мікробіологічна діагностика синьогнійної інфекції заснована на *бактеріологічному методі* – виділенні чистої культури мікробів й вивченні комплексу їх біологічних властивостей.

Добір та доставка матеріалу для дослідження виконується за правилами загальними для всіх гнійно-септичних інфекцій. Матеріал для дослідження необхідно брати перед початком терапії антибактеріальними препаратами з дотриманням правил асептики. Гній, кров, кал, сечу, мокротиння тощо висівають на селективне середовище (ЦПХ - агар), МПА, 5% кров'яний агар, середовище Ендо. Селективний ЦПХ-агар містить селективний агент *N*-цетилпіридинія хлориду (*N*-ЦПХ) у концентрації 0,2%. Висіви сектором на селективному для псевдомонад середовищі поміщають при температурі 42°C у термостат на добу. Наявність росту бактерій на цьому середовищі вказує на належність до *P. aeruginosa*. Висіви на інших середовищах культивують при температурі 37°C.

Якщо на селективному середовищі ріст відсутній, враховують ріст на 5% кров'яному агарі, МПА, середовищі Ендо. Колонії псевдомонад плоскі, соковиті, в'язкої консистенції, спаяні з середовищем. Деякі штами дають колонії з перламутровим блиском.

У разі наявності унікального синьо-зеленого пігменту (піоціаніну), що виробляється псевдомонадами при їх культивуванні, можна розрізнити до 80% штамів синьогнійної палички. У разі відсутності пігменту ізольовану колонію пересівають на скошений МПА, культивують у термостаті й після визначення чистоти виділеної культури мікробів продовжують їх ідентифікацію за культуральними, біохімічними, антигенними й іншими властивостями. В мазках пофарбованих за Грамом *P. aeruginosa* мають вигляд дрібних грамнегативних паличок, які розташовуються поодинокі, парами чи короткими ланцюжками. У разі росту на живильних середовищах синьогнійні палички дають специфічні пахощі жасмину.

Проба на цитохромоксидазу виконується з 1% водним розчином диметилпарафенілендіаміну. На поверхню скла наносять краплю реактиву, а поруч поміщають культуру мікробів, яку досліджують. Скляною паличкою переміщують реактив на культуру мікробів. Через 1 хвилину при наявності цитохромоксидази бактерії забарвлюються у червоний колір.

Проба на каталазу. В 3% розчин перекису водню вносять культуру мікробів. Визначення проводиться через 5 хвилин за виділенням пухирців кисню.

Диференційні ознаки P.aeruginosai та інших найбільш розповсюджених псевдомонад

Тести	Культури мікробів		
	P. aeruginosa	P. putida	P. fluorescens
Ріст на ЦПХ-агарі при 42°C	+	-	-
Ріст на ЦПХ-агарі при 37°C	+	+	-
Окислення глюкози на середовищі Хью-Лейфсона	+	+	+
Цитохромоксидаза	+	+	+
Каталаза	+	-	-
Піюціонін	+	-	-
Флуоресцеїн	+	-	-
Желатиназа	+	-	+
Ацетатамідне середовище	+	-	-

Визначення окислення й ферментації глюкози. Враховують результат: поява жовтого забарвлення в пробірці без вазеліну вказує на окислення глюкози; поява жовтого забарвлення середовища під вазелиновим маслом вказує на ферментацію глюкози. Для визначення піюціаніна проводять висів бактеріальної культури на середовище Кінга А, а для виявлення флуоресцеїну на середовище Кінга В. Перевіряють здатність росту на ацетатамідному агарі. Синьогнійні палички на ньому не ростуть. Культуру, яка досліджується, висівають уколом у 2 пробірки з середовищем Хью-Лейфсона. В одну з пробірок вносять стерильне вазелинове масло. Через 24 години інкубації при 37⁰С визначають чутливість виділених штамів мікробів до антибіотиків в зв'язку з природною стійкістю даного виду мікробів до багатьох препаратів. Проводять внутрішньовидову диференціацію виділених культур шляхом фаготипування.

Серологічний метод. Використовують не часто. Специфічні антитіла визначають у сироватці хворого у РА, РПГА. Наростання титрів антитіл, що виявляється при повторній постановці реакцій дозволяє встановити діагноз.

Теоретичні питання:

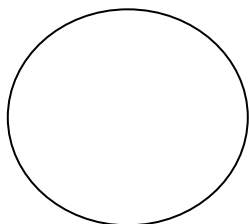
1. Збудник.
 - властивості, резистентність.
 - патогенність для людини і тварини, фактори патогенності, токсини.
2. Патогенез захворювання у людей, імунітет.
3. Мікробіологічна діагностика.
4. Специфічна профілактика і лікування.

Протокол № 8

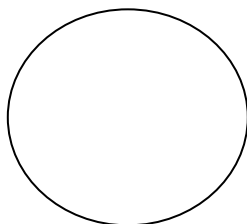
Тема: Мікробіологічна діагностика дифтерії.

Мета: Вивчення групи коринебактерій і лабораторної діагностики дифтерії.

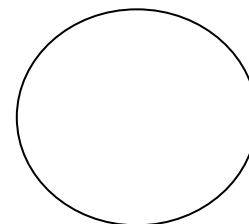
1. Мікроскопія і замальовання демонстраційних препаратів дифтерійних бактерій у мазках із чистої культури.



Corynebacterium diphtheriae
(фарбування за Грамом)



Corynebacterium diphtheriae
(фарбування за Нейссером)



Corynebacterium diphtheriae
(фарбування метиленовим синім)

2. Вивчення культуральних властивостей дифтерійних бактерій по колекції:
ріст на середовищі Ру _____
колонії на середовищі Тинсдаля-Садикової _____
ріст на сироватковому агарі _____

3. Вивчення порівняльної характеристики бактерій *Corynebacterium diphtheriae*:

Властивості	Біовар		
	gravis	intermedius	mitis
Ріст на середовищах з телуритом	Крупні сухі матові сіро-чорні колонії, з радіальною смугастістю (маргаритки) і неровними краями	Дрібні сухі матові сіро-чорні колонії з більш прозорою периферією, піднятим центром і неровними краями	Дрібні гладкі блискучі напівпрозорі чорні колонії з рівними краями
Ріст на бульйоні	Плівка, помутніння, крошкоподібний або крупнозернистий осад	Помутніння з наступним проясненням і утворенням дрібнозернистого осаду	Рівномірне помутніння и порошкоподібний осад
Гемоліз на кров'яних середовищах	±	+	+



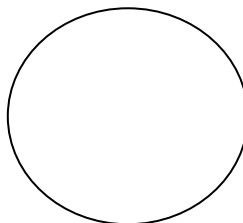
Підписати типи колоній: _____

4. Вивчення біохімічних властивостей дифтерійної палички у порівнянні з псевдодифтерійними бактеріями і дифтероїдами:

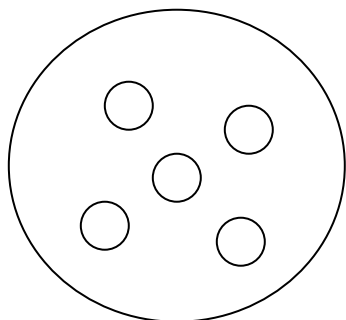
Проби	Corynebacterium diphtheriae		Corynebacterium pseudodiphthericum (псевдодифтерійна паличка Гофманна)	Corynebacterium xerosis (та ін. дифтероїди)
	gravis	mitis		
Глюкоза	к	к	-	к
Сахароза	-	-	-	к
Крахмал	к	-	-	-
Проба з цистеїном на наявність цистинази	Почервоніння середовища за ходом уколу, навкруги темне облачко		-	-
Проби з сечовиною на наявність уреазы	-	-	+ почервоніння	

5. Самостійна робота:

- фарбування готових фіксованих мазків із культури дифтерійних бактерій за Грамом, мікроскопія, замалювання;



- облік і замалювання результатів визначення токсигенності культур дифтерійної палички у реакції преципітації у агарі за Оухтерлоні:



Заключення: _____

6. Вивчення біопрепаратів для специфічної терапії і профілактика дифтерії:

- протидифтерійна антитоксична сироватка;
- дифтерійний анатоксин;
- АДП-анатоксин;
- АДП-анатоксин зі зменшеним вмістом антигена;
- АКДП-адсорбована кашлюково-дифтерійно-правцева вакцина;

7. Вивчення схеми лабораторної діагностики дифтерії.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Збудник дифтерії

Збудник *Corynebacterium diphtheriae* входить до родини *Corynebacteriaceae* (від лат. *coryna* - булава, *diphthera* - плівка), роду *Corynebacterium*.

Бактерії мають булавоподібні потовщення на кінцях. До цього роду відносяться патогенні для людини дифтерійні палички і непатогенні види - ложнодифтерійної палички і дифтеріоди, які виявляються на слизових оболонках і шкірних покривах.

Морфологія. Збудники дифтерії злегка зігнуті, тонкі палички, розміром $3-6 \times 0,3-0,5$ мкм, на кінцях яких є потовщення. У цих стовщеннях є зерна волютини (зерна Бабеша - Ернста). Бактерії дифтерії нерухомі, не мають спор і капсул. Грамположительні. Вони добре фарбуються основними аніліновими барвниками, при цьому волютинними зернами забарвлюються інтенсивніше. Для забарвлення зазвичай застосовують лужний метиленовий синій або кристалічний фіолетовий. Особливістю коринебактерій дифтерії є їх поліморфність; в одній културі зустрічаються різні за формою і розмірами палички: вигнуті, прямі, довгі, короткі, товсті, іноді коккобактерії. Характерно розташування бактерій в мазках - вони зазвичай розташовуються попарно під гострим або тупим кутом, у вигляді розчепірих пальців та ін. Розташування в мазках і наявність зерен волютини є диференційно-діагностичною ознакою при мікроскопічному дослідженні. Непатогенні представники роду коринебактерій - ложнодифтерійної палички і дифтеріоди частіше розташовуються у вигляді частоколу, зерна волютини у них можуть бути відсутні або бути на одному кінці.

Культивування. Коринебактерій дифтерії - факультативні анаероби. Ростуть при температурі $35-37^{\circ}\text{C}$, рН середовища 7,4-7,8. Вони не розмножуються на звичайних поживних середовищах. Культивують їх на середовищах, що містять кров або сироватку.

В кінці XIX століття французький вчений Е. Ру для культивування бактерій дифтерії запропонував використовувати згорнуту бичачу або кінську сироватку, а Ф. Леффлер рекомендував додавати до неї бульйон (25%) і 1% глюкозу. На цих середовищах коринебактерій ростуть швидко, протягом 14-18 год утворюють несливаючіся опуклі колонії кремового кольору (зростання на скошеної середовищі нагадує шагреневу шкіру). Однак отдифференцировать на цих середовищах дифтерійні палички від ложнодифтерійної неможливо.

В даний час основними середовищами для вирощування є середовищем Клауберга (містить сироватку крові і телурит калію), хінозольная середу Буніна, середа Тінсдаля та ін. На підставі культуральних і ферментативних властивостей коринебактерій дифтерії ділять на три біовара: гравіс (*gravis*), мітіс (*mitis*), інтермедіус (*intermedins*). Біовар гравіс зазвичай знаходиться в R-формі. На середовищі Клауберга бактерії цього біовара ростуть у вигляді великих колоній 2-3 мм, сірувато-чорного кольору (так як відновлюють телурит в телур), мають порізані краю, що надає їм вигляду розетки. При дотику до колонії петлею вона як би розсипається. На бульйоні бактерії цього біовара утворюють кришаться плівку і зернистий осад.

Коринебактерії біовара *Mitic (mitis)* на середовищі Клауберга ростуть у вигляді невеликих, гладких колоній (S-форма) чорного кольору. На бульйоні вони дають рівномірне помутніння.

Коринебактерії біовара інтермедіус (*intermedins*) є проміжними. На середовищі Клауберга бактерії цього біовара частіше ростуть у вигляді блискучих, дрібних, чорних колоній (цей біовар зустрічається рідко).

Ферментативні властивості. Всі три біовара дифтерійних бактерій володіють ферментом цистиназу, що розщеплює цистин з утворенням сірководню. Ці властивості

використовуються для диференціації збудників дифтерії від непатогенних представників цього роду.

Властивості збудників дифтерії і близьких до них коринебактерій

Коринебактерії	Тест				
	цистин	сечовина	глюкоза	сахароза	крохмаль
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>					
- <i>gravis</i>	+	-	+	-	+
- <i>mitis</i>	+	-	+	-	-
- <i>intermedians</i>	+	-	+	-	-
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriae</i>	-	+	-	-	-
<i>Corynebacterium xerosis</i>	-	±	+	+	-

Примітка. + Позитивна реакція (розщеплює); - негативна реакція (не розщеплюється).

Збудники всіх трьох биоварів розщеплюють глюкозу і мальтозу до утворення кислоти. *C. gravis* розщеплюють крохмаль. Це властивість відрізняє його від двох інших биоварів. Коринебактерії дифтерії відновлюють нітрати в нітрити, не утворюють індол, розкладають сечовину.

Коринебактерії дифтерії утворюють нейраминидазу, гіалуронидазу та інші ферменти патогенності.

Токсинування. Вірулентні штами збудників дифтерії продукують екзотоксин. Хімічно він являє собою термолабільних білок, що складається з двох фракцій. Фракція В фіксує токсин на чутливих до нього тканинах організму. Фракція А відповідальна за токсичну дію. Силу токсину дифтерійних культур можна встановлювати "in vivo" на чутливих до цього токсину морських свинках. Дім дифтерійного екзотоксину - мінімальна смертельна доза, це мінімальна кількість отрути, вбиває морську свинку масою 250 г на 4-й день.

Наявність екзотоксину можна виявити також "in vitro" - на щільному живильному середовищі. Цей метод широко використовується в практичній роботі. Дифтерійний екзотоксин малоустойчив. Він швидко руйнується під впливом температури, світла і кисню повітря. Після додавання до токсину формаліну (0,3-0,4%) і витримування його при температурі 37-38 ° С протягом декількох тижнів він переходить в анатоксин, який втрачає отруйність, але зберігає антигенні властивості токсину. Токсини, що утворюються різними штамми, не розрізняються між собою і можуть бути нейтралізовані дифтерійним антитоксином. В даний час встановлено, що всі біовари коринебактерій можуть бути токсигенними і нетоксигенними.

Антигенна структура. У бактерій дифтерії є поверхневий термолабільних білковий антиген і типоспецифічний полісахаридних О-антиген. Крім цього, серед коринебактерій розрізняють 19 фаговарів, які враховуються при ідентифікації культур. За допомогою фаговарів виявляють джерело захворювання.

Стійкість до факторів навколишнього середовища. Збудники дифтерії порівняно стійкі. Температура 60 ° С вбиває їх через 10-15 хв, 100°C - через хвилину. У плівці вони витримують нагрівання до 90°C. На згорнутої сироватці при кімнатній температурі зберігаються до 2 міс, на дитячих іграшках - кілька діб. Низькі температури коринебактерій переносять добре. До висушування збудники дифтерії досить стійкі. Дезінфікуючі речовини (3% розчин фенолу, 1% розчин сулеми, 10% розчин перекису водню) вбивають ці бактерії протягом декількох хвилин.

Сприйнятливість тварин. У природних умовах тварини на дифтерію не хворіють. З експериментальних тварин найбільш сприйнятливі морські свинки і кролики. При внутрікожном або підшкірному зараженні у них розвивається картина токсикоінфекції з утворенням на місці введення запалення, набряку, некрозу. У надниркових залозах спостерігаються крововиливи.

Джерела захворювання. Хворі люди і бактеріоносії.

Шляхи передачі. Повітряно-крапельний шлях, контактано-побутовий (через посуд, іграшки, книги, рушники та ін.).

Захворювання у людини: 1) дифтерія зіву; 2) дифтерія носа.

Рідше виникає дифтерія трахеї, бронхів, очей, вуха, піхви і дифтерія пошкодженої шкіри.

Патогенез. Вхідними воротами є слизові оболонки дихальних шляхів і пошкоджена шкіра. Потрапивши на слизову оболонку, збудники дифтерії розмножуються в місці проникнення і викликають некроз тканини. Утворюється плівка, тісно пов'язана з підлеглими тканинами. На поверхні слизової з'являються брудно-сірі або жовтуваті нальоти, що складаються зі зруйнованого епітелію, фібрину, лейкоцитів і коринебактерій дифтерії. При знятті плівки ватним тампоном або шпателем поверхню слизової може кровоточити.

У процесі розмноження коринебактерій дифтерії в некротичних ділянках накопичується екзотоксин, який може призвести до набряку слизової оболонки і клітковини. З слизової оболонки набряк може поширюватися на гортань, бронхи і викликати явища асфіксії. Токсин, що циркулює в крові, вибірково вражає серцевий м'яз, надниркові залози і клітини нервової тканини.

Дифтерія - це токсикоінфекція. Тяжкість процесу залежить від ступеня токсигенності штаму і від захисних сил організму.

Імунітет. Несприйнятливість обумовлюється антитоксическим і антибактеріальним імунітетом. Грудні діти не хворіють, так як у них є пасивний імунітет, переданий від матері.

Про наявність антитоксичну імунітету судять по реакції Шика. Для постановки реакції 1/40 DIm (летальної дози токсину для морської свинки), що міститься в 0,2 мл ізотонічного розчину натрію хлориду, вводять під шкіру в області передпліччя. При відсутності в крові антитоксинів в місці введення через 24-48 год з'являється почервоніння і припухлість (до 2 см в діаметрі). При наявності антитоксина припухлості і почервоніння немає (наявний в крові антитоксин нейтралізував введений токсин).

Перенесене захворювання залишає імунітет. Однак в 6-7% випадків спостерігаються повторні захворювання.

Профілактика. Рання діагностика. Ізоляція. Дезінфекція. Виявлення носіїв токсигенної дифтерійної палички.

Специфічна профілактика здійснюється введенням анатоксину. В Україні проводять обов'язкову вакцинацію дітей вакциною АКДП - це комплексна вакцина, в яку входять дифтерійний і правцевий анатоксин і суспензія вбитих кашлюкових паличок. Вакцинують дітей з 5-6 місяців з подальшою ревакцинацією. Для ревакцинації вводять вакцину без кашлюкових паличок.

Специфічне лікування. Застосовують противодифтерійну антитоксичну сироватку. Доза і кратність визначається лікуючим лікарем, вводять також антимікробні препарати.

Мікробіологічна діагностика дифтерії

Матеріалом для дослідження є плівки з мигдалин, слиз із зіву й носа, відокремлюване уражених ділянок шкіри й слизових.

Відбирають матеріал двома стерильними ватними тампонами й негайно, не пізніше ніж через 3 години, доставляють до лабораторії.

Мікробіологічну діагностику дифтерії проводять трьома методами: мікроскопічним, бактеріологічним, серологічним.

Мікроскопічний метод. З матеріалу який досліджують, взятого одним тампоном, готують 2 мазки й фарбують їх за Грамом та Нейссером. При фарбуванні за Нейссером в мазках виявляють мікроби паличкоподібної форми, що розташовуються у вигляді римської п'ятірки (V). Палички мають солом'яно-жовтий, а зерна волютини (Бабеша-Ернста) на кінцях - темно-синій колір. Цей спосіб фарбування дозволяє відрізнити *Corynebacterium diphtheriae* від *pseudodiphtheriticum*, у яких не виявляються зерна Бабеша-Ернста. Ці результати мікроскопічного дослідження розглядаються як орієнтовні, тому що в препараті можуть бути й інші зернисті мікробні клітини.

При фарбуванні за Грамом зерна волютину не виявляються, але грампозитивне забарвлення й характер розташування дифтерійних паличок, дозволяє побічно відрізнити їх від непатогенних коринебактерій, що розташовуються у вигляді паркану, тобто паралельно одна одній.

Бактеріологічний метод. Є основним методом діагностики дифтерії. Він включає виділення чистої культури мікробів, ідентифікацію їх, обов'язкову перевірку здатності виділеної культури коринебактерій виробляти екзотоксин.

Матеріал, який досліджується, взятий другим тампоном, висівають на телуритові сироваткові чи кров'яні середовища в чашках Петрі й поміщають у термостат. В залежності від біовару на кров'яному телуритовому агарі можуть вирости великі колонії сірваточорного кольору, плоскі, шорсткуваті, радіально розкреслені, з зубчастими краями (*gravis*), дрібні опуклі блискучі чорні колонії з гладенькою поверхнею та рівними краями (*mitis*), дрібні плоскі колонії з більш темним центром, іноді з нерівними краями (*intermedius*).

Для одержання чистої культури мікробів частину підозрілої колонії пересівають на скошену згорнуту сироватку (середовище РУ, Леффлера). Після інкубації в термостаті на сироватковому агарі спостерігається ріст дифтерійної палички у вигляді «шагреневої шкіри» (колонії мікроорганізмів зливаються, але центр їх залишається підвищеним). Визначивши під мікроскопом чистоту виділеної культури, ідентифікують мікроорганізми шляхом вивчення біохімічних властивостей для чого їх висівають у середовище Гісса (глюкоза, лактоза, маніт, мальтоза, цукроза), у середовище з крохмалем, глікогеном.

Для виявлення цистинази дифтерійних паличок роблять висів у спеціальне середовище з цистином й оцтовокислим свинцем. Відзначають почорніння середовища по ходу висіву.

Для визначення здатності мікроба розщеплювати сечовину роблять висів у бульйон з 1% сечовини й індикатором крезолрот. Почервоніння середовища не відзначають, оскільки збудники дифтерії не мають уреазної активності.

Токсигенність дифтерійної палички можна виявити як *in vivo*, так і *in vitro*.

In vivo. Морським свинкам внутрішньошкірно вводять фільтрат бульйонної культури дифтерійних бактерій. Якщо мікроби виробляють екзотоксин, то в місці введення культури утвориться некроз тканини.

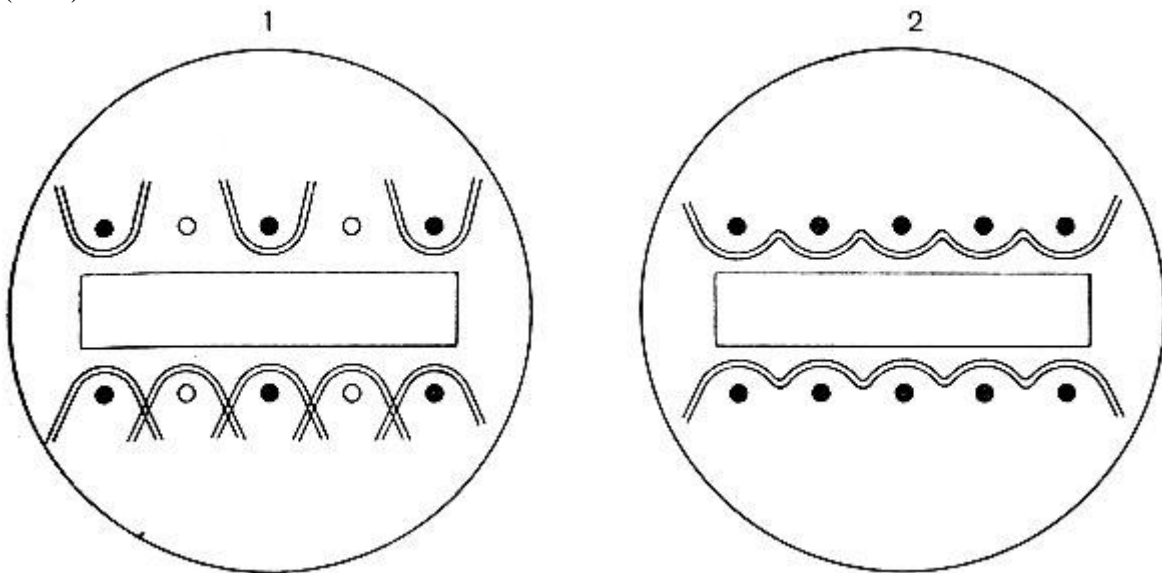
Найбільше поширення отримали досліди *in vitro*. При цьому використовують реакцію преципітації в гелі. На поверхню живильного середовища в центрі чашки Петрі розміщують смужку фільтрувального паперу, просякненого антитоксичною протидифтерійною сироваткою. Культури мікробів, які досліджуються, висівають бляшками з обох боків смужки. Контролем є відомий токсигенний штам дифтерійної палички. Чашки з висівами інкубують при $t\ 37^{\circ}\text{C}$, результати враховують через 24-48 годин. Якщо дифтерійні палички продукують екзотоксин, то він дифундує в агар і зустрічаючись з антитоксином, утворює чітку лінію преципітату, що зливається з лінією преципітату токсигенного (контрольного) штаму.

Вивчення перерахованих вище властивостей виділеної культури дозволяє відрізнити дифтерійну паличку від інших коринебактерій (дифтероїдів і псевдодифтерійних).

Визначення екзотоксину. Проводять методом дифузійної преципітації в гелі. Метод заснований на взаємодії токсину з антитоксином. У тих ділянках агару, де ці компоненти взаємодіють, утворюється преципітат у вигляді закруглених ліній.

Методика визначення: у чашки Петрі розливають розтоплений і охолоджений до 50°C агар Мартена рН 7,8 (на агарі Мартена краще продукується екзотоксин). Кількість агару в чашці повинно бути не більше 12-15 мл, щоб зберегти прозорість, - в товстому шарі лінії преципітації погано видно. Після застигання агару накладають смужку стерильної фільтрувального паперу, змоченою протидифтерійної антитоксичної сироваткою.

Випробувану культуру засівають "бляшками". Посів роблять петлею. Діаметр бляшок 0,8-1,0 см. Відстань бляшок від краю смужок паперу 0,5-0,7 см, між двома бляшками випробуваної культури засівають бляшки свідомо токсигенного штаму. Випробувану культуру вважають токсигенною, якщо лінії преципітації чотки і зливаються з лініями преципітації контрольного (токсигенного) штаму. Якщо лінії преципітації перехрещуються з лініями контрольного штаму або відсутні, виділену культуру вважають нетоксигенним (мал.).



• - токсигенна культура, о - досліджувана культура

Мал. Виявлення екзотоксину *S. diphtheriae* методом дифузійної преципітації в агарі.

1 - бляшки нетоксигенним штаму (лінії преципітації перехрещуються);

2 - бляшки токсигенного штаму (лінії преципітації з'єднуються)

Приготування смужок паперу. З фільтрувального паперу нарізають смужки розміром 1,5×8 см, загортають по кілька штук в папір і стерилізують в автоклаві при температурі 120°C протягом 30 хв. Перед постановкою досвіду стерильним пінцетом виймають одну смужку, укладають її в стерильну чашку Петрі і змочують протидифтерійної антитоксичної сироваткою. Попередньо сироватку розводять так, щоб в 1 мл містилося 500 АЕ (антитоксичних одиниць). Папірець змочують 0,25 мл сироватки (125 АЕ) і поміщають на поверхню середовища. Потім роблять посіви зазначеним вище способом. Всі посіви ставлять в термостат. Облік результатів проводять через 18-24 і 48 ч.

Серологічний метод є допоміжним. Застосовують реакцію аглютинації (див. додаток). Сироватки хворих розводять 3% розчином натрію хлориду в співвідношенні 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600. До розведень сироватки додають спеціально виготовлений

діагностикум (дифтерійна культура, змита 3% розчином натрію хлориду й вбита 0,2% розчином формаліну). Реакцію вважають позитивною при розведенні сироватки не менш 1:100. Використовується також реакція пасивної гемаглютинації з еритроцитарним бактеріальним діагностикумом. Діагностичним вважають титр 1:8 й вище, якщо він реєструється на другому тижні від початку хвороби.

Теоретичні питання:

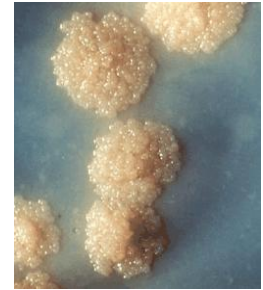
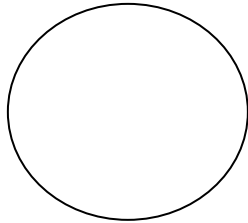
1. Характеристика групи коринебактерій (особливості морфології).
2. Видовий склад групи коринебактерій і їх роль у житті людини.
3. Морфологічні ознаки справжніх і несправжніх коринебактерій.
4. Біологічні типи коринебактерій.
5. Обґрунтування бактеріологічної діагностики дифтерії.
6. Мікробіологічна діагностика дифтерії.
7. Особливості і характер імунітету.
8. Властивості дифтерійного токсину.
9. Одержання і титрування антитоксичної сироватки.

Протокол № 9

Тема: Мікробіологічна діагностика туберкульозу.

Мета: Освоєння методів мікробіологічної діагностики туберкульозу.

1. Мікроскопія і замальовання демонстраційного препарату: мазок із мокротіння хворого, фарбування за Цілем-Нільсенем.



Mycobacterium tuberculosis
фарбування за Цілем-Нільсенем

Колонії *M. tuberculosis*

2. Вивчення колекції живильних середовищ для культивування туберкульозної палички:

- гліцериновий бульйон;
- середовище Левенштейна-Йнсена;
- картопляно-гліцеринове середовище;
- синтетичне середовище Сотона;
- середовище Петран'яні.

3. Вивчення біологічних препаратів для алергенної діагностики і специфічної профілактики туберкульозу:

- туберкулін сухий очищений;
- вакцина BCG.

4. Вивчення антибіотиків і хіміопрепаратів для лікування туберкульозу:

І ряду (основні препарати):

- похідні гідразида ізоніотинової кислоти (ізоніазид, фтівазид);
- похідні параміносаліцилової кислоти (ПАСК);
- похідні тіоаміда ізоніотинової кислоти (етіонамід);
- антибіотики (стрептоміцин, рифампіцин).

II ряду (резервні препарати):

- антибіотики (ломефлораксацин, циклосерін, віоміцин, капреоміцин);
- препарати різних хімічних груп (етамбутол, піразинамід, тіоцетазол).

5. Вивчення схеми лабораторної діагностики туберкульозу.

6. Посів ґрунту на середовищі Кітт-Тароцці і молоко під олією для виділення облігатних анаеробів.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Збудники туберкульозу

Представники сімейства мікобактерій *Mycobacteriaceae* мають вигляд тонких, іноді гіллястих паличок, ніж нагадують гриб. Повільне зростання на поживних середовищах також зближує їх з грибами. Ці особливості пояснюють назву сімейства, роду - *Mycobacterium*.

Збудники захворювання: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum* входять до родини *Mycobacteriaceae*.

Мікобактерій кислото-щелоче- і спиртостійкі, що обумовлюється наявністю в оболонках їх клітин жиривоскових речовин.

Рід мікобактерій включає патогенних і непатогенних представників. Патогенними для людини є збудники туберкульозу і збудник лепри.

Туберкульоз широко поширений серед тварин, птахів, гризунів.

Існують кілька видів туберкульозних паличок:

1. Людський - *Mycobacterium tuberculosis*
2. Бичачий - *Mycobacterium bovis*
3. Пташиний - *Mycobacterium avium*
4. Мишачий - *Mycobacterium murium*

5. Зустрічаються мікобактерій, що викликають захворювання у холонокровних. До них відноситься особлива група атипівих мікобактерій.

В даний час атипіві мікобактерій набувають особливого значення. Їх ділять по ряду ознак на 4 групи: I, II, III, IV (по Раньон). Вони відрізняються від мікобактерій туберкульозу меншою вимогливістю до живильних середовищ. Між собою вони різняться по відношенню до живильних середовищ, швидкості росту, за здатністю утворювати пігмент, а також по каталазній і пероксидазною активності. Викликають захворювання у людини представники груп I і III.

Морфологія. Збудники туберкульозу були відкриті р. Кохом в 1882 р Це тонкі палички величиною $1,5-4 \times 0,3-0,5$ мкм. Вони дуже поліморфні: зустрічаються прямі, вигнуті, колбовидні. Як результат мінливості бактерій, є кіслотоподатливі форми і дуже дрібні, так звані зерна Муха. Різноманітність форм нерідко залежить від складу середовища, впливу на них антибіотиків і хіміотерапевтичних засобів. Бактерії туберкульозу нерухомі, не мають спор і капсул. Грамположительні, однак вони погано сприймають анілінові фарби. Добре фарбуються в червоний колір за методом Ціля- Нільсена, де використовуються концентровані фарби і протруювання.

Культивування. Збудники туберкульозу - аероби. Ростуть при температурі $37-38^{\circ}\text{C}$ і рН середовища 5,8-7,0, Відмінними культуральними особливостями туберкульозної палички є повільне зростання і вимогливість до живильних середовищ. Первинно вони ростуть тільки на спеціальних середовищах: середовищі Петраньяні, Петрова, Левенштейна - Йенсена. Їх можна вирощувати на гліцериновому бульйоні, гліцериновому агарі, гліцериновому картоплі. Гліцерин стимулює ріст мікобактерій. *M. bovis* не потребують гліцерині. Найбільшого поширення отримано середовище Левенштейна - Йенсена, яка рекомендована ВООЗ в якості стандартної середовища для вирощування туберкульозних паличок. В даний час користуються також середовищем Фінна II, яка відрізняється від середовища Левенштейна - Йенсена тим, що замість аспарагіна в ній використовується глютамин натрію. На цьому середовищі мікобактерій туберкулезарастут трохи швидше, ніж на середовищі Левенштейна - Йенсена, і відсоток виділення культур вище. Туберкульозні палички можна культивувати і на синтетичних середовищах, наприклад середовищі Сотона.

Мікобактерій туберкульозу зустрічаються в R- і S-формі. Більш вирулентної є R-форма (*M. bovis* частіше зустрічається в R-формі). На щільних поживних середовищах збудники туберкульозу утворюють сухі зморшкуваті колонії кремового кольору з трохи піднятим центром і порізнаними краями. У рідких поживних середовищах мікобактерій туберкульозу виростають на 10-15-й день у вигляді плівки, яка поступово потовщується, стає грубою, зморшкуватою, ламкою та в силу тяжкості іноді падає на дно. Бульйон під плівкою залишається прозорим.

Ферментативні властивості. Збудники туберкульозу біохімічно мало активні. У них виявлено протеолітичний фермент, який в певних умовах (кисла і лужна среда) розщеплює

білок. Вони розщеплюють також деякі вуглеводи, утворюють уреазу. Але властивості ці непостійні. Тому вивчення ферментів не має діагностичного значення.

Токсинутворення. Збудники туберкульозу утворюють ендотоксин - це білкова речовина вперше виділив Р. Кох (1890) і назвав його туберкуліном. "Старий" туберкулін - це культуральна рідина, отримана при зростанні культури в гліцериновому бульйоні і випарена при 70°C до 1/10 свого початкового об'єму. "Новий" туберкулін - очищений білковий дериват туберкуліну.

Туберкулін має властивості алергену. Він не має токсичної дії на здоровий організм. Його дія проявляється тільки в зараженому організмі. Тому введення туберкуліну використовують з діагностичною метою, в постановках алергічних проб (Пірке або Манту). Для цієї мети туберкулін готують з бичачого типу мікобактерій туберкульозу.

Вірулентні штами збудників туберкульозу містять особливий ліпід корд-фактор, який сприяє склеюванню мікобактерій і зростання їх у вигляді кіс і тяжів.

Антигенна структура. Мікобактерій туберкульозу містять антиген, в який входять білкові, ліпоїдні і полісахаридні чинники. Цей антиген викликає в організмі вироблення антитіл (аглютининів, преципітинів, комплементсвязиваючих речовин та ін.). Однак ці антитіла виявляються в малих концентраціях, тому практично з метою діагностики мало використовуються.

Стійкість до факторів навколишнього середовища. Мікобактерій туберкульозу найстійкіші з неспорозосних форм бактерій (стійкість обумовлюється наявністю в їх оболонці ліпідів). Температуру 100°C вони переносять протягом 5 хв. УФ-промені викликають їх загибель лише через кілька годин.

У висохлої мокроті вони живуть до 10 міс. При низьких температурах мікобактерій туберкульозу тривало зберігаються.

Дезінфікуючі розчини: сулема (1:1000), карболова кислота (5%) гублять їх тільки через добу. Найбільш чутливі вони до хлораміну і хлорного вапна.

Сприйнятливність тварин. До *M. tuberculosis* людина дуже чутливий, тварини і птахи малочутливі. З експериментальних тварин до нього високочутливі морські свинки, у яких інфекція протікає генералізовано і закінчується зазвичай загибеллю тварини.

До *M. bovis* чутливі велика і дрібна худоба і домашні тварини (людина малочувствителен, але діти можуть заражатися при використанні молока хворих тварин).

З експериментальних тварин найбільш чутливі кролики, у яких інфекція протікає генералізовано. *M. avium* викликає захворювання у птахів: курей, голубів, фазанів та ін. Однак можуть хворіти і деякі тварини (людина рідко заражається).

З експериментальних тварин чутливі кролики. Інфекція протікає у них гостро.

Мишачий вид патогенних головним чином для полівок. У кроликів і морських свинок захворювання протікає в хронічній формі.

Джерела інфекції. Людина. Рідше тварини.

Шляхи передачі. Найбільш часті шляхи передачі - повітряно-крапельний і повітряно-пилловий; рідше харчової. Можливо внутрішньоутробне інфікування через плаценту.

Захворювання у людини і патогенез. Захворювання на туберкульоз характеризується різноманіттям клінічних форм. Розрізняють легеневу (найбільш часто зустрічається) і позалегенові форми: туберкульоз шлунка і кишечника, нирок, мозкових оболонок, кісток і інших органів.

Кожна з цих форм може закінчитися генералізацією процесу. При повітряно-крапельному і повітряно-пилловій зараженні первинний осередок виникає в легені. В ураженому органі утворюється горбок - tubercul. Горбок являє собою скупчення лейкоцитів і гігантських клітин, всередині яких знаходяться мікобактерій туберкульозу. При гарній опірності організму сполучна тканина оточує горбок, він обизвествляється і бактерії,

залишаючись життєздатними, не виходять за межі горбка. Такий "вогнище Гона" - звапнінням, невелике вогнище на місці первинного впровадження туберкульозної палички (закритий процес).

При закритому процесі палички туберкульозу не виділяються з мокротою, сечею і ін.

Таким чином, навіть при доброякісному перебігу процесу організм не звільняється від збудників туберкульозу. Вважають, що 80% людей інфіковані туберкульозними бактеріями. Однак клінічно вони здорові. Коли організм потрапляє в несприятливі умови, захисні функції його знижуються, горбок піддається некрозу, бактерії вивільняються і втягують в процес нові ділянки, настає загострення, утворюються каверни - відкритий процес. Іноді може бути генералізація процесу, яка призводить організм до загибелі. Найчастіше туберкульоз протікає в хронічній формі (закритий процес). Велике значення при загостренні мають умови праці та побуту.

Імунітет. Людина має певну резистентність, тобто при зараженні не завжди виникає захворювання, а утворюється інфекційний (нестерильний) імунітет, який обумовлюється комплексом захисних факторів: гуморальних, клітинних, а також резистентністю органів і тканин.

Профілактика. Рання діагностика, ізоляція й ін. Для специфічної профілактики використовується жива вакцина БЦЖ (BCG), отримана французькими вченими Кальметт і Герен. Цю вакцину вводять новонародженим одноразово, під шкіру в зовнішню поверхню плеча. Ревакцинацію проводять через 7-12 років, а потім через кожні 5-6 років до 30 років.

Лікування. Антибактеріальні препарати: стрептоміцин, рифампіцин, ПАСК, фтівазид та ін.

Мікробіологічна діагностика туберкульозу

В залежності від клінічної форми захворювання досліджують: мокротиння, промивні води бронхів, гній, сечу, випорожнення, спинномозкову рідину, асцитичну рідину, кров, пунктати лімфовузлів й закритих набряків, шматочки тканини, які було взято під час операції.

Мікробіологічну діагностику туберкульозу проводять мікроскопічним, бактеріологічним, біологічним, серологічним, алергологічним методами.

Мікроскопічний метод. Матеріалом для мікроскопічного дослідження найчастіше буває мокротиння. Перевага надається ранковій порції. При недостатній кількості її збирають протягом доби. Більш цінним матеріалом при відсутності мокротиння є промивні води бронхів.

Мокротиння виливають у чашку Петрі, вибирають жовто-зелені гнійні грудочки, переносять на предметне скло, готують мазок і фарбують за Цілем-Нільсеном. Під час мікроскопії мазка на синьому тлі (сторонній матеріал: лейкоцити, слиз, інші мікроби фарбуються в синій колір) видні пофарбовані фуксином у рубіново-чевоний колір мікобактерії у вигляді тонких, коротких чи довгих, прямих чи злегка вигнутих паличок, іноді розташованих під кутом, часто купками чи невеликими скупченнями. Цей спосіб фарбування дозволяє виявити кислотостійкі мікроорганізми. Позитивний висновок роблять при виявленні мікобактерій туберкульозу в препараті після перегляду не менш 100 полів зору. Гній досліджують так як і мокротиння. Під час дослідженні сечі, промивних вод бронхів, пунктатів тощо матеріал центрифугують й готують мазок з осаду. Препарат з осаду сечі знебарвлюють не тільки кислотою, але й спиртом, для диференціації від *M. Smegmatis*, які можуть знаходитись в сечі здорових людей.

Спинномозкову рідину відстоюють у холодильнику і готують мазок з ніжної плівки фібрину. Необхідно враховувати, що вміст мікобактерій у матеріалі, який досліджується, може бути незначним, виділення їх епізодичним, і в ньому можуть бути змінені варіанти збудника, в тому числі L-форми. Тому для підвищення ймовірності виявлення мікобактерій

туберкульозу використовують фазово-контрастну і люмінесцентну мікроскопію (РІФ). Для РІФ використовують діагностичні сироватки, що містять мічені флюорохромом антитіла до антигенів L-форм.

Застосовують методи накопичення (гомогенізації і флотації), що дозволяють сконцентрувати туберкульозні мікобактерії.

Метод гомогенізації. До добового об'єму мокротиння додають рівний об'єм 1% їдкого натру, щільно закривають склянку і струшують її 15 хвилин до повної гомогенізації мокротиння, центрифугують, зливають рідку частину (надосад), осад нейтралізують 1-2 краплями 10% розчину соляної кислоти. З осаду, у якому сконцентровані туберкульозні мікобактерії готують мазок, фарбують за Цілем-Нільсеном і мікроскопують.

Метод флотації. Після обробки їдким натром, як зазначено вище, гомогенізоване мокротиння поміщають у колбу з гумовою пробкою. Колбу прогрівають на водяній бані при 55°C 30 хвилин, додають 1-2 мл ксилолу, толуолу чи бензину, після чого розводять дистильованою водою до горлечка колби. Суміш 10-15 хвилин струшують, після цього відстоюють протягом 15-20 хвилин. Обережно відбирають й переносять піпеткою на предметне скло утворений вершковоподібний шар. Скло кладуть на закриту водяну баню. На висохлий мазок нашаровують нову порцію матеріалу й знову підсушують. Нашарування з наступним висушуванням проводять 5-6 раз. Сухий препарат кілька раз промивають ефіром, мазок фіксують та фарбують за Цілем-Нільсеном. Флотація підвищує виявлення мікобактерій у патологічному матеріалі на 10%. Негативний результат мікроскопії не може свідчити на 100 відсотків про відсутність мікобактерій у матеріалі, який досліджували, тому результат мікроскопічного дослідження є лише орієнтовним.

Бактеріологічний метод. Цей метод є більш вірогідним й застосовується в тих випадках, коли мікроскопічне дослідження не дало позитивних результатів. Він дозволяє виділити чисту культуру мікробів з наступною диференціацією мікобактерій з урахуванням швидкості їх росту й ряду біохімічних властивостей.

Диференційні ознаки деяких мікобактерій

Вид мікобактерій	Час росту при виділенні (доба)	Ознака				Відновлення нітратів
		Втрати каталазної активності після прогрівання 30 хв. при 68°C	Наявність ферментів			
			Уреази	Нікотин-амідази	Ніацинази	
M. tuberculosis	12-15	+	+	+	+	+
M. bovis	24-40	+	+	-	-	-
M. africanum	31-42	+	+	+	-	-

В матеріалі, який досліджується перед посівом на поживні середовища мають бути знищені сторонні бактерії. Для цього патологічний матеріал обробляють слабким розчином сірчаної кислоти (6-12%), що вбиває всі бактерії, крім кислотостійких. Після обробки кислотою мокротиння струшують і центрифугують. Отриманий осад відмивають від сірчаної кислоти шляхом 20-30 хвилинного центрифугування у стерильному фізіологічному розчині. Відмитий осад засівають на середовища Левенштейна-Йенсена, Фінн-2. Після висіву пробірки з середовищами заливають розплавленим парафіном і поміщають у термостат на 3-4 тижні.

Висіви переглядають раз на тиждень. Ріст мікобактерій туберкульозу звичайно виявляється на 3-4-му тижні, але іноді й через 2,5-3 місяці. Мікобактерії туберкульозу дають, як правило, сухі, зморшкуваті, грубі (нагадують бородавки) колонії, звичайно R-форми. Колонії погано знімаються з середовища, а при прожарюванні бактеріологічної петлі в полум'ї дають характерний тріск. S-форма колоній з пігментацією жовтого чи жовтогарячого кольору властива й іншим мікобактеріям. У мазках, виготовлених з колоній та пофарбованих за Цілем-Нільсеном, реєструються скупчення типових мікобактерій. В молодих культурах, виділених від хворих, яких лікували антибактеріальними препаратами, можна знайти мікроорганізми зміненої форми у вигляді коротких паличок чи куль. Для більшшвидкого виділення туберкульозних мікобактерій запропоновані прискорені методи культивування.

Метод мікрокультур Прайса. Матеріал від хворого центрифугують. Виділений осад наносять товстим шаром на стерильне предметне скло. Висушений препарат занурюють на 5 хвилин у 5% сірчану кислоту для знищення сторонньої мікрофлори, а потім у стерильний фізіологічний розчин для видалення кислоти. Після цього препарат занурюють у склянку з живильним середовищем (живильним середовищем за цим методом є цитратна кров, розведена дистильованою водою 1:4) й поміщають у термостат. Ріст туберкульозних мікобактерій виявляють під мікроскопом вже через 48-72 години. Препарати фарбують за Цілем-Нільсеном й мікроскопують. Мікроколонії збудника туберкульозу виглядають як коси, джгути чи масивні скупчення. Даний спосіб дозволяє бачити ріст туберкульозних бактерій на тій стадії, коли макроскопічно його знайти не вдається, але метод мікрокультур не дає можливості вивчати властивості бактеріальних культур.

Глибинний метод посіву за Школьніковою. Матеріал, який досліджується, центрифугують й до осаду доливають рівний об'єм 2% сірчаної кислоти. Перемішують і центрифугують 15-20 хвилин. Осад промивають стерильним фізіологічним розчином. 2-3 краплі осаду засівають у глибину середовища (цитратна кров, розведена дистильованою водою 1:4), розлитого по 5 мл в 3 пробірки. Висіви поміщають у термостат. Визначення мікробного росту виконують на десяту добу. Готують мазки, фарбують за Цілем-Нільсеном і мікроскопують. При позитивному результаті висіву у мазку виявляють мікроскопічні колонії бактерій туберкульозу, що мають вигляд кіс чи джгутів.

Біологічний метод. Цей метод є найбільш чутливим й дає позитивні результати при введенні морській свинці навіть одиничних туберкульозних мікобактерій. Матеріал, який досліджують, обробляють сірчаною кислотою, звільняючи від сторонньої мікрофлори, й вводять підшкірно двом морським свинкам масою 250-300 гр. в область паху. При наявності туберкульозних мікобактерій через 6-10 днів на місці введення патологічного матеріалу з'являється ущільнення (інфільтрат) на поверхні якого утворюється виразка. З гною виразки роблять мазки, фарбують за Цілем-Нільсеном. При позитивному результаті тварина втрачає вагу і через 4-6 тижнів гине. Під час розтину трупа виявляють туберкульозні горбки в органах. У мазках з горбків знаходять туберкульозні мікобактерії. При малій кількості матеріалу, який досліджують, тварин інфікують внутрішньочеревинно чи інтратестикулярно. Такий спосіб зараження підвищує чутливість методу, особливо в тих випадках, коли в матеріалі містяться маловірулентні стійкі до ізоніазиду мікобактерії туберкульозу. Останнім часом все ширше практикується інтрацеребральне зараження білих мишей. Основна відмінність *M. bovis* від *M. tuberculosis* полягає в їх патогенності для кроликів. У разі внутрішньовенного зараження кролика культурою *M. bovis* кролик гине від генералізованого туберкульозу через 3-6 тижнів. До зараження *M. tuberculosis* кролики резистентні.

Серологічний метод є допоміжним. Запропоновано різні реакції, що дозволяють виявити антитіла до антигенів мікобактерій, наприклад, РЗК, РПГА. Однак ці реакції або недостатньо специфічні, або вимагають диференційної діагностики при псевдопозитивних результатах.

Алергологічний метод. Застосовують головним чином для визначення інфікованості населення туберкульозними мікобактеріями. Внутрішньшкірну туберкулінову пробу Манту застосовують для діагностики туберкульозу у дітей й перед ревакцинацією. Для постановки проби беруть «туберкуліновий» шприц об'ємом 1 мл й голки з коротким зрізом. У шкіру середньої третини внутрішньої поверхні передпліччя вводять 0,1 мл очищеного туберкуліну в стандартному розведенні. Результати проби Манту оцінюють через 48-72 години. Величину папули вимірюють за допомогою прозорої міліметрової лінійки. Реєструють поперечний (стосовно осі руки) діаметр папули. Зону гіперемії при цьому не враховують.

При величині папули від 0 до 1 мм у діаметрі реакція вважається негативною, від 2 до 4 мм – сумнівною, а 5 мм і більш – позитивною.

Теоретичні питання:

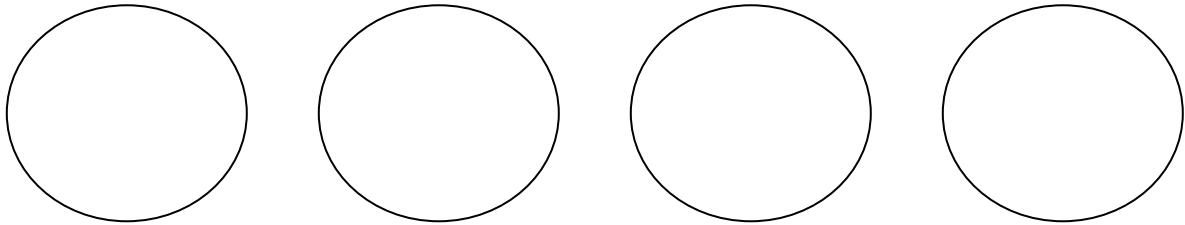
1. Таксономія збудника туберкульозу. Патогенні представники.
2. Культуральні особливості *Mycobacterium tuberculosis*.
3. Джерело інфекції. Шляхи зараження туберкульозом. Патогенез. Матеріали для дослідження.
4. Методи лабораторної діагностики туберкульозу.
5. Імунітет при туберкульозі та його особливості.
6. Специфічна профілактика і лікування туберкульозу.

Протокол № 10

Тема: Мікробіологічна діагностика бордетеліозів і гемофільної інфекції.

Мета: Вивчення методів мікробіологічної діагностики, терапії і профілактики кашлюку і захворювань, викликаних гемофільними бактеріями.

1. Мікроскопія і замалювання демонстраційних препаратів: мазків із чистої культури кашлюкових і паракашлюкових бактерій, із суміші стафілокока і кашлюкової палички, із культури *Haemophilus influenzae* (фарбування за методом Граму).



Bordetella pertussis

Bordetella parapertussis

Суміш *S. aureus* і
B. pertussis

Haemophilus influenzae

2. Вивчення колекції живильних середовищ:

а) середовище КВА (казеїново-вугільний агар);

б) середовище Борде-Жангу (гліцеринно-картопляно-кров'яний агар).

3. Вивчення біологічних препаратів для лабораторної діагностики і специфічної профілактики кашлюку і гемофільної інфекції:

- агглютинируючі адсорбовані (факторні) сироватки;

- кашлюкова моновакцина;

- АКДП-вакцина;

- імуноглобулін нормальний людський;

- кон'югована вакцина *Haemophilus influenzae* типу b (капсульний антиген+ дифтерійний або правцевий анатоксин).

4. Вивчення схем лабораторної діагностики кашлюку і гемофільної інфекції.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Збудники кашлюку та паракашлюку

Збудники цих захворювань відносяться до роду *Bordetella*.

1. *Bordetella pertussis* - збудник кашлюку, описаний Борде і Жангу в 1906 р.

2. *Bordetella parapertussis* - збудник паракашлюку, описаний Елдерінг і Кондрік в 1937р.

3. *Bordetella bronchiseptica* - викликає захворювання у тварин. У людини ці бактерії викликають бронхопневмонію з кашлюкоподібним кашлем. Вперше у людини це захворювання описано Брауном в 1926 р (зустрічається частіше у тварин й дуже рідко в людей).

Морфологія. Бактерії кашлюку - дрібні палички овоїдної форми, $0,3-0,5 \times 1-1,5$ мкм. Збудник пара-коклюшу кілька більшої величини. Обидва мікроба не мають спор, нерухомі. При спеціальній забарвленні видно капсула. Грамнегативні. Більш інтенсивно забарвлюються по полюсах.

На ультрасрезах видно капсулоподібної оболонка, зерна валютін, в нуклеїдов - вакуолі.

Культивування. Збудники кашлюку та паракашлюку - аероби. Вибагливі до живильних середовищ. Для їх вирощування застосовують середу Борде-Жангу (гліцеринового-картопляний агар з кров'ю). В даний час користуються середовищем КВА (казеїново-вугільний агар) - це напівсинтетичні середовища без крові. Джерелом амінокислот тут є гідролізат казеїну. Середа КВА відрізняється від середовища Борде - Жангу більш простим і доступним методом виготовлення.

Для пригнічення росту сторонньої флори до середовища додають пеніцилін по 0,25 - 0,5 МЕ на 1 мл середовища або метицилін - 2,5-4 мкг на 1 мл. Пеніцилін можна наносити на поверхню середовища в чашках.

Засіяні середовища інкубують в термостаті при температурі 35-36 ° С, рН середовища 6,8-7,4. Посіви необхідно оберігати від висихання, для цього в термостат ставлять посудину з водою.

Колонії *B. pertussis* з'являються через 48-72 год, а *B. parapertussis* - через 24-48 год.

На середовищі КВА колонії *B. pertussis* дрібні 1-2 мм в діаметрі, *B. parapertussis* декілька більше. Колонії обох мікробів блискучі, сірувато-кремового кольору (на казеїново-вугільному агарі вони нагадують крапельки ртуті). При знятті колоній залишається в'язкий, сметанообразний слід. При вивченні колоній в стереоскопічному мікроскопі видно світловий конус (колонії відкидають тінь). Коли змінюється положення світлового джерела (електролампочки) тінь змінює становищем. Наявність світлового конуса (хвостика) має діагностичне значення.

B. parapertussis утворює фермент тирозинази, тому в середовищах, що містять тирозин, відбувається його розщеплення і середовище забарвлюється в коричневий колір. Зміна кольору середовища є диференційно-діагностичною ознакою.

У рідкому середовищі бактерії коклюшу і паракашлюку утворюють рівномірну каламуть і придонний осад. На агарі з кров'ю вони дають зону гемолізу.

Свежевиделенние культури найчастіше мають гладку S-форму (I фаза). При культивуванні в несприятливих умовах або в матеріалі, взятому в пізні терміни захворювання, можуть з'явитися диссоційовані форми (II-IV фази).

Ферментативні властивості. Збудники кашлюку не розщеплюється вуглеводи і не ферментують білки. Бактерії паракашлюку утворюють ферменти уреазу і тирозиназу. Бактерії коклюшу і паракашлюку продукують ферменти патогенності: гиалуронидазу, плазмокоагулаза і лецитиназу.

Токсинутворення. У дослідах на тваринах у кашлюку палички були виявлені чотири типи токсину білкової природи: 1) термолабільних дермонекротическій токсин; 2) термостабільний ендотоксин; 3) лейкоцитозостимулюючий фактор (стимулюючий лейкоцитоз); парентеральне введення його викликало загибель експериментальних тварин; 4) гістамінсенсібілізуючий фактор - при введенні його мишам у них підвищувалася чутливість до гістаміну.

Перші два типи токсину властиві і збудника паракашлюку.

Диференціальні ознаки бактерій роду Bordetella

Властивості	<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Bordetella parapertussis</i>	<i>Bordetella bronchiseptica</i>
Рост на МПА	-	±	+
Тривалість росту на КВА	48-72 год	24-48 год	18-24 год
Коричневий пігмент	-	+	-

(утворення тирозинази)			
Утворення уреаз	-	+	+
Гемолиз еритроцитів	+	+	+
Утворення оксидази	+	-	+
Рухливість	-	-	+

Антигенна структура. У бактерій роду *Bordetella* складна антигенна структура. Найбільш важливими антигенами для лабораторної діагностики є агглютиногени. Родовим агглютиногеном є 7. видоспецифічний агглютиногеном для бордетел коклюшу є 1, для бордетел паракашлюку - 14, для бордетел бронхосептіка - 12.

Моноспецифічної сироватки 1, 14, 12 використовуються для диференціації видів (сироватки випускає Інститут епідеміології та мікробіології ім. М. Ф. Гамалії).

Крім видоспецифічних антигенів, у представників *Bordetella* є і інші агглютиногени, різний поєднання яких визначає серовар.

Схема складу агглютиногенного роду бордетел

Аглютиногенні фактори	Вид мікробів		
	<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Bordetella parapertussis</i>	<i>Bordetella bronchiseptica</i>
Загальний для роду	7	7	7
Специфічний для виду	1	14	12
Окремі серовари	2,3,4,5,6,13	8,9,10	13,8,9,10,11

За поєднанням трьох головних агглютиногенів 1,2,3, визначених в реакції аглютинації з моноспецифічними сироватками, *B. pertussis* розрізняють три серовара: 1,2,3; 1,2,0; 1,0,3.

Стійкість до факторів навколишнього середовища. Збудники кашлюку та паракашлюку мало стійкі. При температурі 56°C вони гинуть через 20-30 хв. Низькі температури також згубно на них діють. Пряме сонячне світло вбиває їх через 1-2 год; УФ-промені - через кілька хвилин. У сухий мокроті ці бактерії зберігаються протягом декількох годин. Звичайні розчини дезінфікуючих речовин гублять їх швидко.

Обидва види мікробів мало чутливі до антибіотиків, не чутливі до пеніциліну.

Сприйнятливість тварин. У природних умовах тварини не сприйнятливі до збудників цього роду. В експериментальних умовах вдається відтворити коклюш у мавп і молодих собак, викликати загибель мишей.

Джерела інфекції. Хвора людина. Особливо заразні хворі в катаральному періоді.

Шляхи передачі. Повітряно-крапельний шлях. Роль різних предметів мало ймовірна через нестійкості кашлюкових бактерій у зовнішньому середовищі.

Патогенез. Збудники кашлюку та паракашлюку викликають гостре захворювання, що супроводжується конвульсивним кашлем. Потрапивши на слизову оболонку верхніх дихальних шляхів, бактерії розмножуються там і частково руйнуються. Що виділився токсин діє на центральну нервову систему, подразнює нервові рецептори слизової оболонки верхніх дихальних шляхів, що призводить в дію кашльовий рефлекс. В результаті виникають напади судомного кашлю. В процесі захворювання спостерігається кілька періодів: катаральний, спазматичного кашлю і дозволу процесу.

Імунітет. Після перенесеного захворювання виробляється стійкий імунітет, який обумовлюється гуморальними і клітинними факторами.

Профілактика. Виявлення та ізоляція хворих. Ослабленим дітям, які перебували в контакті з хворим на кашлюк, вводять імуноглобулін. Основні заходи специфічної

профілактики - імунізація дітей АКДП (кашлюково-дифтерійно-правцевий вакциною). Вакцину вводять триразово у віці до 6 міс з наступною ревакцинацією.

Лікування. У ранніх стадіях захворювання застосовують протівококлюшний імуноглобулін. Для лікування використовують еритроміцин і ампіцилін.

Мікробіологічна діагностика

Через велику кількість стертих форм і подібності клінічних симптомів цих захворювань особливого значення набувають мікробіологічні методи діагностики.

Використовують бактеріологічний, серологічний, експрес методи.

Бактеріологічний метод. Це основний метод мікробіологічної діагностики кашлюку. Матеріалом для дослідження є слиз з верхніх дихальних шляхів, із задньої стінки глотки, відокремлюване слизової оболонки носоглотки, мокротиння хворих.

Для взяття матеріалу використовують метод «кашлевих пластинок» при наявності кашлю, чи використовують задньоглотковий тампон. У разі негайного висіву можна застосувати сухий тампон, при відсутності такої можливості – тампон змочений у алгінаті кальцію або у 0,9% розчині NaCl. Тампон вводять у задні відділи ротової порожнини, уникаючи дотику до слизової оболонки щік, язика й мигдалин і проводять 2-3 рази по задній стінці глотки. Отриманий матеріал доставляють у лабораторію протягом 2-4 годин, зберігаючи при температурі від 4 до 27⁰С.

Виділення збудника кашлюку передбачає висів матеріалу на щільні середовища: картопляно-гліцеринний агар (середовище Борде-Жангу), казеїново-вугільний агар (КВА). Додатково в середовище вносять антибіотик пеніцилін (біцилін). Для одержання ізольованих колоній посів проводять шляхом втирання тампона по периферії чашки, а потім Z –подібним штрихом у центрі. На 2-5 добу після інкубації посіву матеріалу, який досліджують, на казеїново-вугільному агарі з'являються типові дрібні опуклі вологі блискучі колонії сірого кольору, які нагадують краплі ртуті (останнє характерно для *B. pertussis*). Колонії паракашлюкових бордетел трохи крупніші. З колоній роблять мазки й фарбують за Грамом. Збудник кашлюку – грамнегативні дрібні овоподібні палички (кокобактерії). Для накопичення чистої бактеріальної культури частину колонії пересівають на скошений КВА й ідентифікують далі за рядом ознак (табл.).

Вивчення морфологічних, тінкторіальних, культуральних, біохімічних властивостей, позитивна реакція аглютинації з сироваткою проти 1 антигену дозволяє ідентифікувати виділену культуру з *B. pertussis* й поставити бактеріологічний діагноз «кашлюк».

Ідентифікація збудника кашлюку

Вид бордетел	Ріст на агарі			Зміна кольору		Розщеплення сечовини	Утилізація цитрату	Антигени	
	МПА	з тиро-зином	КУА	Кров'яний агар				1	12
<i>B. pertussis</i>	–	–	Не змінює	Не змінює	–	–	+	–	–
<i>B. parapertussis</i>	+	+	Брунатне	Потемніння	+	–	–	–	+
<i>B. bronchiseptica</i>	+	+	Не змінює	Не змінює	+	+	–	+	–

Серологічний метод. Використовують при відсутності бактеріологічного підтвердження, а також для ретроспективної діагностики. Визначають специфічні антитіла в парних сироватках, використовуючи РА та РЗК, де як антиген застосовують суспензію живих

культур бордетел. Більш чутливою й зручною є РПГА. За наростанням титру антитіл ставлять серологічний діагноз. Можна використовувати ІФА.

Еспрес-метод. Для виявлення збудника в матеріалі від хворого використовують також РІФ. Для виявлення збудника можна використовувати реакцію, зворотню пасивній гемаглютинації, де в якості діагностикуму виступають еритроцити, сенсibilізовані імуною сироваткою до кашлюку. З її допомогою можна знайти до 150-160 тис. мікроорганізмів у 1мл. Для оцінки імунологічної перебудови організму дітей, вакцинованих АКДП – вакциною, ставлять реакцію затримки пасивної гемаглютинації з еритроцитарним антигенним діагностикумом до кашлюку. Ця реакція більш чутлива, ніж реакція аглютинації.

Гемофільні інфекції.

Збудники захворювання: *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus ducreyi* входять до роду *Haemophilus* родини Pasteurellaceae.

У групу гемофільних бактерій об'єднані дубі, грамнегативні бактерії, які здатні рости тільки на збагачених поживних середовищах, які містять цілісну або лізовану кров або її похідні в якості факторів росту. У назві роду *Haemophilus* відображена залежність цих бактерій від крові при рості на штучних поживних середовищах. Багато мікроорганізмів цього роду в нормі мешкають на слизових оболонках дихальних шляхів людини.

Найбільш важливими патогенами для людини є *H. influenzae*, переважно типу b, який обумовлює інфекції з респіраторним механізмом ураження (менінгіти, синусити, бронхіти та ін.), а також збудник м'якого шанкру *H. ducreyi*.

Морфологічні та тинкторіальні властивості. Гемофіли – це дрібні грамнегативні сферичні, овоїдні або паличкоподібні бактерії, іноді утворюють пари, короткі ланцюжки або нитки. Ця властивість мікроорганізмів називається плеоморфізмом. Морфологія цих бактерій залежить від віку чистої культури або від типу поживного середовища.

Гемофільні бактерії нерухомі, спор не утворюють, мають пілі (фімбрії). Утворення капсули є непостійною ознакою, її виявлення може бути маркером вірулентності штаму.

Культуральні властивості: Гемофільні бактерії є факультативними анаеробами, однак краще ростуть в аеробних умовах. Практично всі види потребують готові фактори росту, які є в крові: X-фактор (протопорфірин ІХ в складі гематина або геміна), а також V-фактор (нікотинамідаденіндинуклеотид – НАД). Це пов'язано з тим, що гемофіли не здатні синтезувати гем, який входить в склад ферментів дихального ланцюга, та/або НАД, який є кофактором окисно-відновних ферментів.

Для культивування гемофільних бактерій використовують шоколадний агар – поживне середовище коричневого кольору, яке отримують шляхом прогрівання кров'яного агару при 80°C протягом 15 хвилин. Внаслідок прогрівання відбувається гемоліз і вивільнення із еритроцитів геміна і НАД. Оптимальна температура росту бактерій 35-37°C. Колонії з'являються через 36-48 годин. Для *H. influenzae* характерна здатність до утворення R-, S-колоній. Слизові, більш крупніші (3-4 мм в діаметрі), радужні S-форми колоній характерні для капсульних штамів. Слабко вірулентні безкапсульні варіанти гемофільних бактерій утворюють R-колонії – більш мілкі (1 мм в діаметрі), дрібнозернисті, з нерівним краєм.

Для гемофільних бактерій характерний «феномен кормушки» або «феномен сателіта», який проявляється в їх здатності рости на кров'яному агарі навколо колоній стафілококів або інших бактерій, які продукують НАД або викликають α -гемоліз. Для самих гемофільних паличок здатність визивати гемоліз не характерна. Таким чином, мілкі радужні колонії гемофільних бактерій можуть бути виявлені на кров'яному агарі в зоні гемолізу, утвореного *S.aureus*.

Ідентифікація гемофільних паличок заснована на їх потребі до факторів росту та деяких біохімічних тестах.

Ферментативні властивості. Гемофільні бактерії – хемоорганотрофи. Утилізують глюкозу до кислоти, відновлюють нітрати до нітритів, інші вуглеводи ферментують погано. *H. influenzae* розділяють на 8 біоварів, в залежності від їх здатності продукувати індол, уреазу, орнітин декарбоксилазу. Крім того, вид *H. influenzae* включає біовар *aegyptius*. Каталазна та оксидазна активність у різних видів гемофільних бактерій – варіабельна ознака.

Антигенні властивості. *H. influenzae* має соматичний О-антиген і капсульний полісахаридний К-антиген. Розрізняють 6 серотипів *H. influenzae* (a,b,c,d,e,f) в залежності від особливостей будови капсульного антигену. Капсульні варіанти гемофілів можуть бути типовані за допомогою тесту «набухання капсули» або за допомогою РІФ зі специфічними сироватками.

Більшість варіантів *H. influenzae*, представники нормальної мікрофлори верхніх відділів респіраторного тракту, являються безкапсульними формами, які прийнято називати «нетиповані».

Фактори патогенності: Провідний фактор вірулентності *H. influenzae* є капсула, яка захищає бактерії від фагоцитозу, забезпечує виживання бактерій в організмі та сприяє розповсюдженню інфекції.

Гемофільні палички можуть продукувати IgA-протеазу, здатну інактивувати секреторні антитіла. Пілі і IgA-протеаза збудника грають провідну роль в прикріпленні мікроорганізмів до епітелію респіраторного тракту та його колонізації.

ЛПС зовнішньої мембрани грають роль ендотоксина, приймаючи участь також в процесах адгезії та інвазії гемофільної палички. Ендотоксин може також визивати параліч вій миготливого епітелію респіраторного тракту людини, сприяє мікробній колонізації верхніх дихальних шляхів.

Резистентність. Бактерії малостійкі в навколишньому середовищі: швидко гинуть, знаходячись поза організмом людини. Гемофіли досить чутливі до нагрівання і звичайних дезінфікуючих засобів. У *H. influenzae* виявлена здатність до продукції β-лактамаз, що обумовлює їх високу стійкість до деяких β-лактамних антибіотиків.

Епідеміологія. *H. influenzae* патогенні тільки для людини.

Джерело інфекції – людина, хвора або носій. Безкапсульні мало вірулентні штами здатні в нормі колонізувати слизові оболонки верхніх дихальних шляхів здорових дітей (близько 60-90%) та дорослих (близько 35%), штами *H. influenzae* типу b, що мають капсулу, виділяються з носоглотки у 2% безсимптомних носіїв.

Провідний механізм ураження гемофільної інфекції – респіраторний, шлях передачі – повітряно-крапельний (при кашлі, розмові, чиханні).

Найбільш схильні до гемофільної інфекції діти віком від 2 місяців до 6 років. Однак менінгіти та септицемії, обумовлені *H. influenzae* типу b, частіше зустрічаються серед дітей від 6 місяців до 2 років. Пневмонії, синусити та інші інфекції дихальних шляхів можуть бути і серед людей похилого віку, пацієнтів з хронічною легеневою патологією, зі зниженим імунітетом, а також у тих що курять.

Проникаючи через верхні дихальні шляхи *H. influenzae* прикріплюється до миготливого епітелію та колонізує його.

Патогенез і клінічна картина. Безкапсульні варіанти гемофільних бактерій часто залишаються у вхідних воротах інфекції, не викликаючи симптомів захворювання (безсимптомне носійство). У людей зі зниженим імунітетом вони здатні проникати в підслизовий шар та за допомогою ендотоксину викликати місцеві гнійно-запальні захворювання – середні отити (ураження середнього вуха), синусити (запалення додаткових пазух носа), ларинготрехеїти, бронхіти, пневмонії.

H. influenzae переважно типу b, може розповсюджуватися в організмі гематогенно, викликаючи септицемію, септичний артрит, ендокардит. Після проникнення через

гематоенцефалічний бар'єр капсульні варіанти гемофільної палички викликають гнійні менінгіти. *H. influenzae* типу b є також збудником гострого бактеріального епіглотиту серед дітей 2-5 років, який приводить до порушення прохідності дихальних шляхів та асфіксії. Нерідко у дітей після виздоровлення залишаються стійкі неврологічні зміни.

За даними всесвітньої статистики гемофільна інфекція займає одно з перших місць серед причин дитячої смертності.

Імунітет. Протягом перших 3-6 місяців життя діти захищені від інфекції материнськими IgG, тому в цьому віці захворювання зустрічаються дуже рідко. Частіше хворіють діти від 6 місяців до 2-х років. Відомо, що до 5-6 років в сироватці крові багатьох дітей, навіть у неімунізованих і не переохворілих, є природні набуті проєктивні антитіла проти капсульного антигену *H. influenzae* типу b.

Мікробіологічна діагностика. Матеріал для дослідження: мазок з носоглотки, кров, мокротиння або ліквор, гнійне відокремлювання з вуха, суглобна рідина.

Мікроскопічне дослідження малоінформативне, однак застосовують при гнійному менінгіті (мазки з цереброспінальної рідини, забарвлені за Грамом).

Для прискореної діагностики і диференціації гемофільної палички від інших збудників менінгіту використовують серологічні тести з метою виявлення капсульного антигену *H. influenzae*: зустрічний імуоелектрофорез, РІФ або реакцію латекс-аглютинації з анти-b-антитілами. За високої концентрації збудника в досліджуваному матеріалі можлива також постановка «тесту набухання капсули».

Бактеріологічний метод заснований на посіві на шоколадний, кров'яний агар або на агар з серцево-мозковою витяжкою та інкубації протягом 24-48 годин. Типові колонії пересівають, виявляють наявність капсули (реакція імуного набухання Нойфельда) і досліджують біохімічні властивості. Антигени бактерій виявляють за допомогою РІФ а агарі. *H. influenzae* диференціюють від інших близькоспоріднених грамнегативних паличок за їх потребою в X- та V-факторах росту, відсутності гемолізу на кров'яному агарі та інших тестах.

Профілактика. Для створення штучного набутого активного імунітету проти *H. influenzae* типу b використовують субкорпускулярну вакцину, яка має очищений капсульний антиген. Однак зважаючи на низьку імуногенність цього препарату його назначають дітям старшим 1,5 років. Запропоновані кон'юговані вакцини із капсульного антигену, фосфату рибітолу та різними білковими анатоксинами (наприклад, дифтерійним чи правцевим). Використання вакцини не захищає від носійства гемофільних паличок.

Пасивна імунізація за допомогою донорських сироваткових препаратів, які мають високі концентрації IgM, може бути назначена дітям зі слабкою імунною відповіддю на вакцину та з імунодефіцитом.

Лікування. Антибактеріальна терапія. Препарати вибору: цефалоспорини III покоління (цефтріаксон, цефотаксим), β -лактамі антибіотики з інгібіторами β -лактамази.

Теоретичні питання:

1. Збудник.

- Властивості. Резистентність.
- Патогенність для людини і тварини. Фактори патогенності, токсини.
- Патогенез захворювання у людей, імунітет.
- Мікробіологічна діагностика.
- Специфічна профілактика і лікування.

Протокол № 11

Тема: Підсумкове заняття № 4. Спеціальна мікробіологія (частина I).

Питання для самопідготовки студентів медичного і стоматологічного факультетів

1. Еволюція коккових бактерій, їх загальна характеристика. Стафілококи, біологічні властивості. Класифікація, практичне значення.
2. Роль стафілококів в патології людини, патогенез спричинених ними процесів. Характеристика токсинів і ферментів патогенності. Роль у розвитку внутрішньолікарняних інфекцій.
3. Методи мікробіологічної діагностики стафілококових процесів та їх оцінка. Імунітет при стафілококових захворюваннях. Препарати для специфічної профілактики і терапії, оцінка.
4. Стрептококи, біологічні властивості, класифікація. Токсини, ферменти патогенності.
5. Стрептококи пневмонії, біологічні властивості. Патогенність для людини і худоби. Лабораторна діагностика пневмококових захворювань.
6. Стрептококи. Роль в патології людини. Патогенез стрептококових захворювань. Токсини і ферменти патогенності стрептококів. Імунітет. Методи мікробіологічної діагностики стрептококових захворювань.
7. Менінгококи, біологічні властивості, класифікація. Патогенез і мікробіологічна діагностика менінгокової захворювань і бактеріоносійство. Диференціація менінгококів і грам-негативних диплококов носоглотки.
8. Гонококки. Біологічні властивості, патогенез і мікробіологічна діагностика захворювань. Профілактика і специфічна терапія гонореї і бленореї.
9. Ентеробактерії. Їх еволюція і значення в патології людини. Мікро-біологічна діагностика коли-ентеритів. Ешерихії, їх властивості. Патогенні серовари ешерихії, їх диференціація. Лабораторна діагностика коли-ентеритів.
10. Патогенетичні основи мікробіологічної діагностики черевного тифу і паратифів А і В. Методи мікробіологічної діагностики та їх оцінка.
11. Сальмонели - збудники черевного тифу і паратифів А і В. Біологічні властивості, антигенну будову. Патогенез захворювань. Імунітет. Специфічна профілактика і терапія.
12. Сальмонели - збудники гострих гастроентеритів, їх властивості. Принципи класифікації. Патогенез харчових токсикоінфекцій сальмонеллезной етіології. Лабораторна діагностика.
13. Рід шигел, біологічні властивості, класифікація. Патогенез дизентерії.
14. Шигели. Роль в патології людини. Патогенез дизентерії, роль токсинів і ферментів патогенності. Імунітет. Методи мікробіологічної діагностики дизентерії, їх оцінка.
15. Холерні вібріони, біологічні властивості, біовари. Патогенез і імунітет при холері. Методи мікробіологічної діагностики холери і їх оцінка. Специфічна профілактика і терапія холери.
16. Клебсієли, їх роль в патології людини. Характеристика клебсієл пневмонії, озени, риносклероми. Лабораторна діагностика, специфічна профілактика.
17. Протей, його роль в патології людини. Збудник: властивості, резистентність, патогенність для людини і тварини, фактори патогенності, токсини. Мікробіологічна діагностика. Специфічна профілактика і лікування.

18. Синьогнійна паличка, її роль в патології людини. Збудник: властивості, резистентність, патогенність для людини і тварини, фактори патогенності, токсини. Мікробіологічна діагностика. Специфічна профілактика і лікування.

19. Корнебактерії, характеристика. Еволюція коринбактерій, біовари дифтерійних паличок. Токсинуотворення, генетичні детермінанти токсигенності. Методи вимірювання сили токсину.

20. Етапи розвитку вчення про збудників дифтерії. Теоретичні основи специфічної профілактики дифтерії. Протидифтерійна препарати.

21. Патогенез дифтерії, імунітет. Лабораторна діагностика бакте-ріоносительства. Диференціація збудника дифтерії і сапрофітних коринбактерій.

22. Збудники дифтерії, біологічні властивості. Характеристика екзотоксину. Специфічна профілактика і терапія дифтерії. Визначення напруженості антитоксичну імунітету.

23. Патогенні мікобактерії, роль в патології людини. Збудники туберкульозу, властивості. Види туберкульозних бактерій. Патогенез і мікробіологічна діагностика туберкульозу.

24. Лабораторна діагностика туберкульозу. Імунітет при туберкульозі. Специфічна профілактика і терапія туберкульозу. Збудники лепри і їх біологічні властивості.

25. Мікобактерії туберкульозу, властивості. Види туберкульозних бактерій. Тинкторіальні і культуральні властивості. Диференціація збудників туберкульозу. Атипові мікобактерії. Значення в патології людини.

26. Бордетелли, їх властивості. Збудник коклюшу, морфологічні, культуральні, антигенні властивості. Лабораторна діагностика та специфічна профілактика коклюшу.

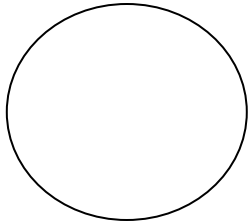
27. Гемофільні інфекції. Морфологія і біологічні властивості. Класифікація. Антигенна структура. Стійкість до чинників навколишнього середовища. Значення в патології людини. Основи патогенезу, клінічні форми. Імунітет. Правила взяття матеріалу, доставка його до лабораторії. Лабораторна діагностика. Специфічна профілактика та лікування захворювання.

Протокол № 12

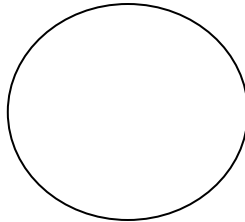
Тема: Мікробіологічна діагностика анаеробної інфекції.

Мета: Вивчення методів мікробіологічної діагностики, терапії і профілактики правця, ботулізму і газової гангрені.

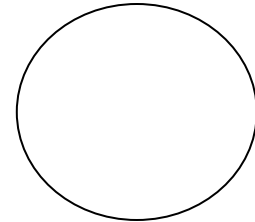
1. Мікроскопія і замалювання демонстраційних препаратів із чистих культур правцевої, ботулінічної палички і збудника газової гангрені.



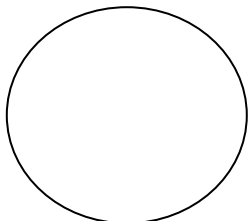
C. tetani
(фарбування за Грамом)



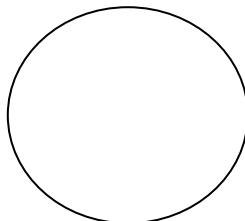
C. botulinum
(фарбування за Грамом)



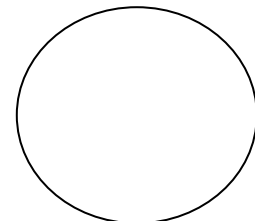
C. perfringens
(фарбування за Грамом)



C. septicum
(фарбування за Грамом)



C. histolyticum
(фарбування за Грамом)

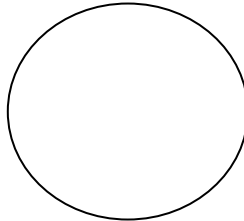


C. novyi
(фарбування за Грамом)

2. Демонстрація живильних середовищ і приборів для культивування анаеробів:

- а) анаеростат, ексікатор, чашка Петрі, засіяна за методом Фортнера;
- б) середовище Кітт-Тароцці, середовище Вільсон-Блера, молоко під олією;
- в) агар стовпчиком у пробірці і агар у трубці Він'яля.

3. Вивчення власних посівів ґрунту на середовищі Кітт-Тароцці і молоці під олією: описання росту і приготування мазків (фарбування за Грамом), мікроскопія.



Заключення про наявність анаеробів: _____


4. Вивчення біопрепаратів для профілактики і лікування правця, ботулізму і раневої анаеробної інфекції:

а) протиправцева сироватка, імуноглобулін людський протиправцевий, протиботулінові антитоксичні моно- і полівалентні сироватки, протигангренозні моно- і полівалентні сироватки; противогангренозні моно- і полівалентні сироватки.

б) вакцини – правцевий анатоксин, дифтерійно-правцевий анатоксин, АКДП – кашлюково-дифтерійно-правцева вакцина, секстаанатоксин.

5. Вивчення схем лабораторної діагностики правця, ботулізму і газової гангрені.

6. Вивчення схеми постанови реакції нейтралізації (РН) на тваринах з метою ідентифікації типу ботулінічного екзотоксина:

Інгредієнти	№ дослідної пробірки				Контроль
	1	2	3	4	5
Дослідний матеріал, що містить ботулотоксин (мл)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Протиботулінічна сироватка типу А (100-200 МО/мл)	1,0	-	-	-	-
Протиботулінічна сироватка типу В (100-200 МО/мл)	-	1,0	-	-	-
Протиботулінічна сироватка типу С (100-200 МО/мл)	-	-	1,0	-	-
Протиботулінічна сироватка типу Е (100-200 МО/мл)	-	-	-	1,0	-
Нормальна сироватка (мл)	-	-	-	-	1,0
Інкубація в термостаті при 37 °С протягом 30 хв					
По 1 мл суміші з кожної пробірки вводять внутрішньочеревинно (кров) або підшкірно (інші біоматеріали) п'яти парам білих мишей					
Спостереження за тваринами протягом 4-5 діб					
Облік					

Заключення _____

Ситуаційне завдання:

При проведенні реакції нейтралізації по визначенню типу ботулотоксину усі тварини загинули. Ваша дія?

Заклучення: _____

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Патогенні анаероби

Патогенні анаероби відносяться до сімейства Bacillaceae, роду Clostridium. Анаероби - велика група мікроорганізмів, серед яких патогенні для людини: 1) клостридії правця; 2) клостридії газової гангрені (полімікробна інфекція); 3) клостридії ботулізму.

Патогенні анаероби є постійними мешканцями кишечника тварин і людини, з випорожненнями яких виділяються в зовнішнє середовище. У вигляді спор вони довго зберігаються в ґрунті, морській і прісній воді.

Патогенні клостридії - великі палички розміром 4-9 × 0,6-1,2 мк, Молоді культури грамположительні, старі втрачають здатність забарвлюватися по Граму. Все клостридії утворюють суперечки овальної або круглої форми, що розташовуються термінально, субтермінально або центрально. Більшість анаеробів рухливі. Джгутики розташовуються перитрихально. Клостридії продукують екзотоксини високою біологічною активністю.

Методи культивування

Культивують анаероби в безкисневих умовах. Існує кілька способів видалення кисню при їх культивуванні: фізичні та біологічні.

Фізичні методи. Видалення кисню механічним шляхом. Видалення повітря здійснюється в анаеростатах - герметично закривається приладі з пристроєм для відкачування повітря. Портативний (переносний) анаеростат - невеликий циліндр з герметично закривається кришкою і краном для відкачування повітря. Посіви встановлюють в анаеростатах, створюють вакуум в апараті і ставлять в термостат. Цей апарат може бути замінений Ексикатор.

Культивування в атмосфері інертного газу. Повітря в анаеростатах заміщається азотом, сумішшю азоту з вуглекислим газом або воднем.

Культивування в високому стовпчику агару з глюкозою. Мікроорганізми ростуть на дні, захищені від повітря високим шаром середовища.

Метод Вільяма - Вейона. Посів роблять у пробірку з розплавленим і охолодженим до 45°C агаром. Вміст пробірки перемішують і насмокчують в пастерівську піпетку, заповнюючи її до верху. Треба стежити, щоб в піпетку не були бульбашки повітря. Тонкий кінець піпетки запаюють, опускають в пробірку з ватою на дні і переносять в термостат. У товщі агару виростають ізольовані колонії. Розпилявши капіляр піпетки, їх витягають.

Біологічні методи. Спільне вирощування анаеробів і аеробів. У чашку Петрі наливають товстим шаром агар з 5% крові. По діаметру чашки роблять в агарі жолобок, щоб культури не змішувалися. На одну половину засівають культуру аероби, на іншу - анаероба. Краї чашки заливають парафіном. Посіви поміщають в термостат. Спочатку виростають аероби, після того як вони поглинають весь кисень, що знаходиться в чашці, починають рости анаероби.

Додавання в середу редуруючих (окислюють) речовин. Використовують середу Кітт - Тароцці, що містить в якості речовин, що редукують 0,5% розчин глюкози і шматочки м'яса. Перед посівом середу кип'ятять 20 хв на водяній бані - видаляють розчинений в ній кисень. Швидко остиджують до 45 ° С і засівають, не давши середовищу знову насититися киснем. Відразу після посіву в пробірку на поверхню середовища наливають стерильне масло шаром 1-1,5 см, щоб захистити посів від повітря. Посіви вирощують в термостаті.

Живильні середовища

Середовищі Кітта-Тароцці. Кров'яний агар. Серед Вільсона - Блера.

Стійкість до факторів навколишнього середовища

Вегетативні форми анаеробів мало стійкі. Спори дуже стійкі до фізичних і хімічних факторів: вони переносять кип'ятіння від 15-20 хв до декількох годин в залежності від виду, типу та штаму бацил. Стійкі також до низьких температур і висушування.

Звичайні розчини дезінфікуючих речовин гублять їх тільки після тривалої експозиції (12-14 год). Особливо стійкі спори збудників ботулізму.

Токсини анаеробів, як і більшість екзотоксинів, чутливі до високих температур, дії прямих сонячних променів і дезінфікуючих речовин. Екзотоксин *C. botulinum* має високу стійкість - руйнується тільки при 15-20-хвилинному кип'ятінні.

Збудник правця

Збудник *Clostridium tetani* входить до родини *Bacillaceae*, роду *Clostridium*.

Морфологія. *C. tetani* - палички розміром $4-8 \times 0,4-1$ мкм із закругленими кінцями. Рухливі. Джгутики розташовуються перитрихально. Капсул не утворюють. Утворюють суперечки кулястої форми, розташовані термінально, що надає бацилу вид барабанної палички. Грамположительні. Старі культури іноді втрачають здатність забарвлюватися по трам. Спори при фарбуванні по трам або метиленовим синім мають вигляд кілець.

Культивування. Збудник правця - строгий анаероб. Високочутливий до кисню. Тому палички добре розмножуються в глибині високого стовпчика агару. Спеціальними середовищами для їх вирощування служать: середа Вейнберга в модифікації ЦЕМ, середа Вілліса і Хоббса, середа Китта-Тароцці і ін. Рідкі середовища заливають шаром вазелінового масла для створення анаеробних умов. Перед посівом з середовища видаляють кисень шляхом кип'ятіння в водяній бані і швидкого охолодження до температури $40-50^{\circ}\text{C}$. Збудники правця ростуть при температурі $35-37^{\circ}\text{C}$ і рН середовища 6,8-7,4. На щільних поживних середовищах зростання з'являється на 3-4-й день. Виросли колонії сіруватого кольору, іноді прозорі з нерівною зернистою поверхнею і витягнутими кінцями - R-форма. У високому стовпчику агару *C. tetani* утворюють колонії у вигляді пушинок, іноді колонії бувають темні і нагадують сочевичним зерна. На кров'яних середовищах навколо колоній відзначається зона гемолізу. При посіві збудників правця на середу Китт - Тароцці середу мутніє. Зростання на середовищі Вільсона-Блера характеризується почорнінням середовища. Посіви на чашках ставлять в анаеростатах.

Ферментативні властивості. *C. tetani* мають слабку ферментативну активність. Вуглеводи не розщеплюються (зустрічаються штамми, що розщеплюють глюкозу). Протеолітичні властивості виражаються у відновленні нітратів в нітрити, повільному згортанні молока і повільному розрідженні желатину.

C. tetani утворює фібрілізін.

Токсинутворення. *C. tetani* виробляють сильний екзотоксин, що складається з двох компонентів: Тетаноспазмін і тетанолізіна. Тетаноспазмін (нейротоксин) вражає рухові клітини нервової тканини, що призводить до спазматичні скорочення м'язів. Тетанолізін гемолізує еритроцити. Токсин, отриманий з бульонної культури в дозі 0,0000005, вбиває білу миша масою 20 г.

Антигенна структура. Клостридії правця ділять на 10 сероварів. Поділ на серовар виробляють по Н-антигену, а на серогрупи - по О-антигену, Збудники всіх сероварів продукують токсин, який нейтралізується антитоксической сироваткою будь-якого типу.

Стійкість до факторів навколишнього середовища. Вегетативні форми *C. tetani* при температурі $60-70^{\circ}\text{C}$ гинуть через 20-30 хв. Спори мають великий сталістю, вони витримують кип'ятіння протягом 1-1,5 год. У ґрунті і на інших предметах суперечки тривало зберігаються. Пряме сонячне світло вбиває їх через кілька годин.

Дезінфікуючі розчини: 5% розчин фенолу, 1% розчин формаліну губить їх через 5-6 ч.

Сприйнятливість тварин. У природних умовах на правець хворіють коні і дрібну рогату худобу. З експериментальних тварин до правцевого токсину високо чутливі білі миші, кролики, щури. Захворювання у них протікає по типу висхідного правця. Починається воно з скорочень поперечно-смугастих м'язів задніх кінцівок, потім втягуються м'язи тулуба та ін. Загибель настає від паралічу серцевого м'яза.

Джерела інфекції. Збудники правця широко поширені в природі. Багато тварин є носіями цих мікроорганізмів, тому *C. tetani* виявляють в ґрунті, куди вони потрапляють з кишечника тварин і людини. Захворювання на правець частіше спостерігаються в сільській місцевості, особливо в районах з розвиненим тваринництвом. Спори можуть розноситися з пилом, потрапляючи на одяг і інші предмети.

Шляхи передачі та входні ворота. Вхідними воротами є пошкоджена шкіра і слизові оболонки. Правець є рановий інфекцією і захворюваність пов'язана з травматизмом (особливо у воєнний час). Небезпечні поранення з глибокої травматизацією тканин, в які заноситься земля, сторонні тіла та ін. Однак для виникнення захворювання іноді досить проникнення невеликий занози.

Патогенез. Проникнувши в глибину тканини, суперечки на місці впровадження починають проростати в вегетативні форми. Розмножуючись, правцева паличка виділяє екзотоксин. Правцевий токсин вибірково діє на клітини центральної нервової системи і обумовлює спазм рухових м'язів. У людини спостерігається спадний правець. Найбільш ранніми ознаками є судоми жувальних м'язів (тризм), потім починається спазм лицьової і потиличної мускулатури. З'являється "сардонічна посмішка". Потім скорочуються м'язи живота і нижніх кінцівок. Смерть настає від асфіксії внаслідок спазму дихальної мускулатури.

Імунітет. Постинфекційного імунітету немає, так як результат цього захворювання часто смертельний.

Штучний імунітет досягається шляхом введення анатоксину. Імунітет антитоксичний.

Специфічна профілактика. Заснована на імунізації анатоксином, що є компонентом АКДС. Щеплення вакциною АКДП проводять всім дітям у віці від 5-6 місяців до 12 років з подальшою ревакцинацією, а також працівникам сільського господарства, будівельникам і ін.

Специфічне лікування. Вводять внутрішньом'язово протиправцеву сироватку. Хороший результат дає імуноглобулін, отриманий з крові донорів, імунізованих проти правця. Крім цього, вводять антибіотики тетрациклін ряду і пеніцилін.

Мікробіологічна діагностика правцю

Матеріалом для дослідження є відокремлюване рани, шматочки тканини, виділення з піхви й матки (за наявності правцевя після пологів чи абортів), виділення з пупочного канатика (за наявності правця немовлят), ексудат, стороннє тіло, перев'язний і шовний хірургічний матеріал, зразки ґрунту, повітря, пил. У деяких випадках досліджують слиз з носа, глотки, бронхів, наліт з мигдалин.

Мікробіологічну діагностику правця проводять з метою підтвердження клінічного діагнозу хвороби, хоча до цього вдаються не часто в зв'язку з типовістю клінічної картини захворювання.

В основному виявлення збудника правця і його спор проводять для перевірки стерильності перев'язного матеріалу і препаратів для парентерального введення, а також для визначення поширення спор збудника в об'єктах навколишнього середовища.

Мікробіологічну діагностику правця проводять мікроскопічним, бактеріологічним, біологічним методами.

Мікроскопічний метод. З матеріалу, який досліджують, готують мазок і фарбують за Грамом. Щільний матеріал розтирають у ступці із стерильним кварцовим піском і фізіологічним розчином й роблять мазок за загальноприйнятою методикою.

Під час мікроскопії препарату, фарбованого за Грамом, виявляють грампозитивні великі прямі палички з заокругленими кінцями, що розташовуються поодинокі, невеликими групами чи у вигляді коротких ланцюжків. Наявність типових бацил у вигляді барабанних паличок з термінальними круглими спорами, що перевищують товщину бактерії, змушує наполегливо шукати підтвердження ймовірного діагнозу бактеріологічним методом.

Застосовують також фазовоконтрастну та люмінесцентну мікроскопію. Для РІФ мазки на предметних скельцях обробляють протиправцевою флуоресцеюючою сироваткою й мікроскопують за допомогою люмінесцентного мікроскопу.

Бактеріологічний метод. Класичним методом виявлення збудника правця і його токсину є виділення чистої культури *S. tetani* з наступним підтвердженням специфічності

токсину. Досліджуваний матеріал, отриманий від хворого чи з трупа, після розтирання фільтрують через паперовий фільтр і роблять посів у пробірки із середовищем Кітта-Тароцці. Для знищення сторонньої не спороносною мікрофлори, частину матеріалу, що досліджується, після посіву прогривають на водяній бані при температурі 85°C на протязі 20 хвилин.

Посіви культивують в анаеробних умовах при температурі 37°C протягом 2 діб в термостаті. При обліку результатів росту посіву, враховують як позитивні у відношенні наявності клостридій такі явища, як помутніння середовища Кіта-Тароцці з утворенням газу та появу своєрідного запаху «вигрібною ями».

З пророслого живильного середовища готують мазок, фарбують за Грамом і мікроскопують. Наявність типових мікробів дозволяє зробити висів на чашки з кров'яним агаром і в стовпчик агару в пробірках. Поверхню кров'яного агару в одній з чашок змочують антитоксичною сироваткою без консерванту. Посіви поміщають у термостат при температурі 37°C й інкубують у вакуумі протягом доби. На кров'яному агарі без антитоксичної сироватки виростають прозорі колонії у вигляді крапельок роси з зоною гемолізу. На кров'яному агарі з антитоксичною сироваткою гемоліз не спостерігається (нейтралізація гемолізу антитоксином).

У глибині стовпчика агару колонії правцевих клостридій мають вигляд ніжних грудочок вати. З колоній, які виростили, готують мазок, фарбують його за Грамом та мікроскопують.

Пророслий бульйон середовища Кіта-Тароцці досліджують на наявність правцевого токсину за допомогою біологічної проби в реакції нейтралізації. З цією метою фільтрат культури, яку досліджують, ділять на дві частини. Одна з них, що є фільтратом виділеної культури мікробів становить контроль, а іншу змішують з антитоксичною протиправцевою сироваткою й залишають на 1 годину при кімнатній температурі (дослід). Білих мишей заражають контрольним та дослідним фільтратом отриманої ймовірної культури правця. За тваринами спостерігають 1-2 доби. Контрольні миші гинуть, дослідні залишаються живими.

Наявність правцевого токсину можна виявити за допомогою реакції зворотньої пасивної гемаглютинації з використанням еритроцитарного антитільного діагностикуму.

Біологічний метод. Матеріал, який досліджують, емульгують у фізіологічному розчині, фільтрують і вводять білим мишам 0,5 мл під шкіру чи в м'яз біля кореня хвоста. Контрольним тваринам вводять фільтрат змішаний з антитоксичною сироваткою.

При наявності в матеріалі правцевих паличок чи їх токсину у заражених мишей протягом 1-2 діб з'являються характерні ознаки – непохитний хвіст («хвіст трубою»), настовбурчення шерсті, а потім типові спазми, що починаються з м'язів у місці введення матеріалу і далі переходять на всі м'язи. При цій характерній картині тварини гинуть. Контрольні тварини залишаються живими.

Збудник ботулізму

Збудник – *Clostridium botulinum* входить до родини Bacillaceae, роду *Clostridium*.

Clostridium botulinum (від лат. botulus - ковбаса) були відкриті Ван-Ерменгеном в 1896 р. Виділені вони були з шинки, що послужила причиною масового отруєння.

Морфологія. Збудники ботулізму - палички розміром 4-9 × 0,6-1 мкм із закругленими кінцями. Палички поліморфні: зустрічаються короткі форми і довгі нитки. Збудники ботулізму утворюють спори, що розташовуються субтермінально. Спори ширше палички і тому паличка зі спору мають вигляд тенісної ракетки. *C. botulinum* не мають капсул. Рухливі - перитрихи. Молоді культури забарвлюються грампозитивною.

Культивування. *C. botulinum* - строга анаероби. Ростуть при температурі 25-37°C і рН середовища 7,3-7,6. Культивують їх на казеїнових, м'ясних та інших середовищах. На глюкозокров'яном агарі мікроби дають неправильної форми колонії з ниткоподібними

відростками. В агарі стовпчиком колонії нагадують грудочки вати, іноді колонії мають вигляд чечевиці зерен. На кров'яному агарі в чашках Петрі виростають колонії у вигляді росинок з блискучою поверхнею і рівними або порізнаними краями (R-форма). На печеночному бульйоні кластридії ростуть з утворенням каламуті і подальшим випаданням осаду, при цьому бульйон прояснюється.

Ферментативні властивості. Сахаролитические властивості: розщеплюють лактозу, глюкозу, мальтозу і гліцерин з утворенням кислоти і газу. Протеолітичні властивості: розплавляють шматочки печінки, розщеплюють яєчний білок, розріджують желатин, пептонізують молоко, утворюють сірководень і аміак.

Токсинутворення. *C. Botulinum* продукують отрута, найсильніший з усіх біологічних токсинів (в 1 мкг ботулінічного токсину міститься 100000000 смертельних доз для білої миші). Токсин складається з двох компонентів: нейротоксин і гемаглютиніну.

Антигенна структура. За антигенними властивостями нейротоксин всі штами ділять на сім сероварів: А, В, С, D, E, F і G. Кожен серовар характеризується специфічною імуногенністю. Найбільш частою причиною захворювання на ботулізм є токсини сероварів А, В і Е, рідше зустрічаються захворювання, викликані сероварами С, D і F. Токсини серовара G мало вивчені.

Стійкість до факторів навколишнього середовища. Вегетативні форми *C. botulinum* гинуть при 80°C через 30 хв. Спори стійкі. Вони витримують кип'ятіння протягом кількох годин (до 5 год). У великих шматках м'яса, консервних банках великої місткості суперечки зберігаються навіть після автоклавування. У 5% розчині фенолу суперечки зберігаються добу. Ботулінічний екзотоксин витримує кип'ятіння протягом 10 хв. Він стійкий до дії сонячного світла, низьких температур і до дезінфікуючих речовин.

Сприйнятливість тварин. До збудників ботулізму чутливі дрібна та велика рогата худоба, коні, гризуни і птиці. З експериментальних тварин чутливі білі миші, морські свинки, кролики, кішки.

Джерела інфекції. Збудники ботулізму широко поширені в природі: ґрунті, воді, куди вони потрапляють з фекаліями тварин і риб. У ґрунті *C. botulinum* живуть і розмножуються. Людина заражається при вживанні продуктів, що містять збудників і екзотоксин.

Шляхи передачі. Харчовий (при вживанні в їжу заражених м'ясних, овочевих і рибних консервів, грибів, осетрових риб та ін.). Особливо небезпечні консервовані продукти, приготовлені в домашніх умовах.

Патогенез. Вхідні ворота - слизова оболонка кишкового тракту. Нейротоксин, що утворюється при розмноженні вегетативних форм збудників ботулізму, не чутливий до протеолітичних ферментів шлунково-кишкового тракту. Патологічний процес обумовлюється нейротоксином, який через кишечник всмоктується в кров, розноситься по всьому організму, вражаючи центральну нервову систему. В основному уражаються: клітини (ядра) довгастого мозку, серцево-судинна система. У хворих відзначають зміни з боку органів зору, розлад дихальних і ковтальних функцій.

Імунітет. Природної резистентності немає. Людина високочутливий до токсину *C. botulinum*. Перенесене захворювання не залишає імунітету.

Профілактика. Попередження можливості забруднення харчових продуктів, правильна технологія виробництва виготовлення консервів та інших продуктів. Профілактика ботулізму в побуті: продукти домашнього консервування перед вживанням слід кип'ятити на водяній бані (або каструлі) протягом 15-20 хв.

Специфічна профілактика і лікування. Людям, які вживали продукти, де можливо міститься збудник ботулізму або ботулінічний токсин, вводять протівоботулінічної поливалентною антитоксичну сироватку типів А, В, Е. Після встановлення типу токсину вводять протівоботулінічної сироватку того типу, який відповідає типу виділеного штаму.

Мікробіологічна діагностика ботулізму

Матеріалом для мікробіологічного дослідження є блювотні маси, промивні води шлунка, кал, кров, сеча, залишки харчових продуктів. У летальному випадку досліджують вміст шлунка, кишечника, лімфатичні вузли, головний та спинний мозок.

Використовують методи мікробіологічної діагностики: бактеріологічний, біологічний (для виявлення ботулінічного токсину в матеріалі, який досліджують).

З метою виявлення ботулінічного токсину можна використовувати також РПГА з антитільним діагностикомом (еритроцити сенсibiliзовані антитоксинами відповідних типів) й визначення активності фагоцитів (ботулінічний токсин здатний пригнічувати активність фагоцитів, що відновлюється в присутності відповідної антитоксичної сироватки).

Бактеріологічний метод. Матеріал, який досліджується, розтирають у стерильній ступці з ізотонічним розчином хлориду натрію.

Висів матеріалу виконують на спеціальні поживні середовища, наприклад, середовище Кітта-Тароцці.

Одну пробу засівають у 4 пробірки, дві з яких прогривають при температурі 60°C 15 хв. (для селекції *C. botulinum* типу E), іншу – при температурі 80°C 20 хв. Накопичення культур клостридій типу E и F відбувається при температурі 28°C, типу A, B, C – при 35°C протягом 48 годин.

Через 24-48 годин витримування висівів у термостаті, відзначають характер росту на середовищі Кітта-Тароцці: помутніння, газоутворення. Готують мазки, фарбують за Грамом. У разі виявленні типових клостридій з термінально розташованими спорами овальної форми у вигляді «тенісної ракетки» роблять пересівання на щільне живильне середовище (кров'яний цукровий агар) для одержання окремих колоній і виділення чистої культури.

Для ідентифікації чистої культури збудника визначають цукролітичні й протеолітичні властивості. Антигенні властивості вивчають в реакції аглютинації з типовими сироватками. Одночасно з вивченням ферментативних властивостей збудника виявляють ботулотоксин у фільтраті бульйонної культури і визначають його тип в реакції нейтралізації.

Біологічний метод. Виявлення ботулінічного токсину й визначення його типу за допомогою реакції нейтралізації має важливе значення для призначення специфічної терапії. Для проведення реакції нейтралізації використовують сухі діагностичні антитоксичні сироватки типів A, B, C, E, F, які розводять фізіологічним розчином до 100-200 МЕ/мл, що забезпечує нейтралізацію гомологічного токсину в пробі, яка досліджується.

Реакцію нейтралізації проводять або із сумішшю сироваток (попередня реакція), або з моновалентними сироватками для виявлення типу токсину.

Підготовлений для дослідження матеріал (у вигляді фільтрату, центрифугату чи крові) розливають по 1 мл у 6 пробірок. В перші п'ять пробірок додають по 1 мл протиботулінічної сироватки типів A, B, C, E, F відповідно, а в останню – 1 мл нормальної сироватки. Пробірки інкубують у термостаті протягом 30 хв. Через 30 хв. шістьом парам білих мишей вводять по 1 мл суміші з кожної пробірки (кров – внутрішньочеревно, інші матеріали – підшкірно). Захворювання й смерть тварин можуть реєструватися протягом 1-4. Захворювання характеризується появою прискороного дихання, розслабленням м'язів, западанням м'язів черевної стінки («осина талія»), судомами, паралічем, смертю тварини. Миші, яким був введений центрифугат з протиботулінічною сироваткою, залишаються живими.

Якщо в матеріалі, який досліджують є ботулінічний токсин, виживає лише одна пара мишей у яких відбулася нейтралізації ботулінічного токсину антитоксичною сироваткою відповідного типу.

Цукролітичні й протеолітичні властивості Clostridium botulinum типів a, b, c, d, e, f

Назва субстрату	Тип Clostridium botulinum					
	A	B	C	D	E	F
Желатин	+	+	(+)	(+)	(+)	+
Білок	+	+	-	-	-	+
Лакмусове молоко	+	+	-	-	-	+?
Глюкоза	КГ	КГ	(К)	К	КГ	КГ
Галактоза	-	-	(КГ)	(К)	-	-
Лактоза	-	-	-	К	-	-
Левульоза	КГ	КГ	-	К	КГ	КГ
Мальтоза	КГ	КГ	(КГ)	(К)	КГ	
Маніт	-	-	-	-	-	
Дульцит	-	-	-	К	-	КГ
Фруктоза	КГ	КГ	(КГ)	К	КГ	(КГ)
Гліцерин	(КГ)	(КГ)	(КГ)	К	(КГ)	(КГ)
Саліцин	(КГ)	(КГ)	-	-	(КГ)	(КГ)
Декстрин	(КГ)	(КГ)	(КГ)	(К)	-	+
Сірководень	+	+	-	+	(+)	

Умовні позначки: КГ – утворюють кислоту й газ, (КГ) - кислота і газ не у всіх штамів, + - розрідження чи кептонізація, позитивна реакція, (+) – повільна реакція чи не завжди.

Визначення фагоцитарного показника. Ботулінічний токсин пригнічує фагоцитарну активність лейкоцитів. Цю властивість використовують для виявлення його в крові хворих й у харчових продуктах. Дослідження проводять у такий спосіб: кров хворого змішують у пробірці з 3% розчином цитрату натрію в співвідношенні 2:1. Дослід виконують у двох пробірках при використанні полівалентної протиботулінічної сироватки. Якщо використовують типові сироватки А, В, С, Е, F, відповідно кількість пробірок для дослідження збільшується. Після змішування взятих інгредієнтів, пробірки поміщають у термостат на 30 хвилин для нейтралізації токсину. У пробірки вносять по одному об'єму 2 млрд. суспензії *Staphylococcus aureus* й пробірки знову поміщають у термостат для завершення фагоцитозу на 20 хвилин. Після цього з вмісту кожної пробірки готують мазок, фіксують, фарбують азуреозином й визначають фагоцитарний показник (фагоцитарний показник – кількість стафілококів, поглинутих в середньому одним лейкоцитом. Для його визначення підраховують мікроорганізми в 50 лейкоцитах й отримане число ділять на 50).

Якщо в крові хворого міститься ботулінічний токсин, фагоцитарний показник крові буде низьким, за винятком фагоцитарного показника тієї порції, в якій тип токсину відповідає типу доданої в неї сироватки, тобто відбудеться реакція нейтралізації токсину відповідними антитілами, і фагоцитарний показник буде значно вищим

РПГА з антитільним еритроцитарним діагностиком. Сутність реакції полягає в тому, що еритроцити сенсibiliзуються специфічними антитілами, і гемаглютинація відбувається за наявності в дослідному матеріалі антигену. Її висока чутливість і специфічність дозволяє знайти в досліджуваному матеріалі мікро кількість токсинів. Діагностичний титр 1:10. Постановку РПГА.

Збудники газової гангрен

Газова гангрена - це полімікробна інфекція, тобто викликається групою мікроорганізмів. Вони відносяться до сімейства Bacillaceae, роду Clostridium.

Основні представники: *C. perfringens*, *C. novyi*, *C. septicum*, *C. histolyticum*, *C. Sordellii*, *C. difficile* та ін.. Зазвичай захворювання виникає в результаті попадання в рану одного або декількох представників роду *Clostridium* і часто в поєднанні з аеробами - стафілококами і стрептококами.

Clostridium perfringens

C. perfringens відкритий в 1892 р Уелчем і Неттолмом.

Морфологія. *C. perfringens* - великі поліморфні палички в середньому $3-9 \times 0,9-1,2$ мкм. Нерухомі. Свежевиделення з організму культури мають капсулу. При попаданні в несприятливі умови утворюють суперечки овальної форми, розташовані центрально або субтермінально. Грамположительні. Старі культури втрачають здатність забарвлюватися по Граму.

Культивування. *C. perfringens* - анаероби, але не дуже чутливі до кисню повітря. Вони добре і швидко ростуть на поживних середовищах, приготованих з гідролізатів м'яса або казеїну: 3-8 ч при температурі 37-42°C і рН середовища 7,2-7,4. Зростання супроводжується бурхливим газоутворенням і зниженням рН в кислу сторону. На щільних поживних середовищах *C. perfringens* утворюють шорсткі R, гладкі S і слизові M колонії. У деяких умовах з'являються колонії змішаного O-варіанту. У глибині агару стовпчиком колонії мають вигляд чечевиці зерен. У рідких середовищах зростання характеризується рівномірним помутнінням і газоутворенням. На кров'яних середовищах *C. perfringens* утворюють зону гемолізу.

Ферментативні властивості - *C. perfringens* зброджують лактозу, глюкозу, сахарозу, мальтозу з утворенням кислоти і газу. Протеолітичні властивості - згортають молоко, повільно (2-7 днів) розріджують желатин. Згортають лакмусове молоко з утворенням згустку цегляного кольору і повного прояснення молочної сироватки. Відновлюють нітрати в нітрити, індол не утворюють.

C. perfringens продукують лецитиназу, гіалуронідазу, желатинази, колагеназу і інші ферменти патогенності.

Токсинутворення. *C. perfringens* виділяють складний токсичний комплекс, що складається з декількох токсинів, які позначаються грецькими буквами α , θ , β і ін. Крім того, вони утворюють ентеротоксин. Основним токсичним комплексом є α -токсин, що володіє великою і всебічною біологічною активністю.

Антигенна структура. *C. perfringens* поділяють на п'ять сероварів, які позначаються великими латинськими літерами A, B, C, D і E. Ці серовар відрізняються один від одного за антигенними і біохімічними властивостями своїх токсинів.

Серовар A є мешканцем кишечника в природних умовах, але може викликати харчові токсикоінфекції у людей. Серовар B викликає кишкові явища у ягнят. Серовар C викликає некротичний ентерит у людей і захворювання у великої рогатої худоби. Серовар D викликає ентеротоксемію у тварин.

Стійкість до факторів навколишнього середовища. Вегетативні форми *C. perfringens* не надто стійкі: на них згубно діють дезинфікуючі речовини в звичайних, що застосовуються в лабораторіях концентраціях.

Спори деяких штамів витримують кип'ятіння протягом кількох хвилин. Найбільш стійкі мікроби серовара A.

Сприйнятливність тварин. У природних умовах *C. perfringens* викликають захворювання у домашніх тварин. З експериментальних тварин до них чутливі морські свинки, кролики, голуби, миші. У заражених тварин на місці введення токсину виникає некроз тканини. У крові можуть перебувати клостридії.

Clostridium novyi

С. novyi виявлений Нові в 1884 р

Морфологія. С. novyi - великі, прямі або злегка зігнуті палички $4-22 \times 1,4-1,6$ мкм. Часто розташовуються ланцюжками. Рухливі - перитрихи. У зовнішньому середовищі утворюють овальні суперечки, розташовані субтермінально (ширина суперечка може бути трохи ширше клітини). Капсул не мають. Грамположительні. Старі культури можуть бути грамнегативними.

Культивування. С. novyi - строгі анаероби. Високочутливі до кисню повітря. Ростуть на казеїнових, вуглеводних і мясопептонних середовищах при температурі $37-43^{\circ}\text{C}$ і рН середовища $7,4-7,6$. На щільних поживних середовищах через 48 год виростають круглі, напівпрозорі колонії з зернистою поверхнею і торочкуватими краями. У агаровому стовпчику вони утворюють пухкі, у вигляді грудки колонії з компактним центром. На рідких поживних середовищах ростуть з накопиченням газу і випаданням плівок в осад. На кров'яному агарі навколо колоній спостерігається зона гемолізу.

Ферментативні властивості. С. novyi менш активні, ніж С. perfringens. Вони зброджують тільки глюкозу і мальтозу з утворенням кислоти і газу. Протеолітичні властивості: молоко повільно згортають, желатин повільно розріджують. Індол і сірководень не утворюють. З ферментів патогенності виявлена фосфолипаза.

Антигенна структура. С. novyi поділяють на чотири серовара: А, В, С, D, що розрізняються за антигенними властивостями і синтезованих ними токсинів.

Токсинування. С. novyi синтезують кілька токсинів, які охоплюють грецькими буквами α , β , γ і ін.

Екзотоксини володіють некротичним, гемолітичним і летальним діями. Крім того, вони порушують проникність стінок кровоносних судин, що призводить до утворення желеобразного набряку.

Стійкість до факторів навколишнього середовища. Вегетативні форми С. novyi малостійкі. Спори зберігаються в зовнішньому середовищі протягом багатьох (25-30) років. Кип'ятіння вбиває їх через 40-60 хв, прямі сонячні промені - через добу. Звичайні концентрації дезінфікуючих розчинів гублять їх через 15-20 хв.

Сприйнятливості тварин. До С. novyi чутливі ссавці і птиці (голуби). З експериментальних тварин: морські свинки, кролики, миші. При підшкірному введенні культури С. novyi у них виникає драглистий желеподібний набряк, іноді з газоутворенням. Тварина гине через 24 год.

Clostridium septicum

Clostridium septicum виявлені Л. Пастером в 1877 р.

Морфологія. С. septicum - поліморфна паличка величиною $3-4 \times 1,1-1,6$ мкм (зустрічаються ниткоподібні форми до 50 мкм в довжину). Палички рухливі - перитрихи. Спори розташовуються субтермінально, іноді центрально. Капсулу не утворюють. Грамположительні. Старі культури можуть фарбуватися грамнегативні.

Культивування. С. septicum - строгі анаероби. Добре ростуть на м'ясних і казеїнових середовищах з додаванням 0,5% глюкози при температурі $37-43^{\circ}\text{C}$ і рН середовища $7,4-7,6$. На глюкозокров'яному агарі утворюють колонії у вигляді переплетених ниток, навколо яких є невелика зона гемолізу. В глибині стовпчика цукрового агару - колонії з ущільненим центром і відходять від країв нитками. У МПБ утворюють рівномірне помутніння з подальшим випаданням пухкого осаду і газоутворення.

Ферментативні властивості. С. septicum мають сахаролітичеські властивостями: розщеплюють глюкозу, лактозу, мальтозу з утворенням кислоти і газу. Чи не ферментують маніт і гліцерин. Протеолітичні властивості: розріджують желатин, молоко згортають

повільно. Переводять нітрати в нітрити, розщеплюють білки з виділенням сірководню та аміаку. Не утворюють індол.

Антигенна структура. *C. septicum* мають O-і H-антигени. За H-антигенів за допомогою реакції аглютинації у них встановлено 6 сероварів.

Токсинутворення. Екзотоксин *C. septicum* складається з декількох субстанцій: β , θ , γ і ін. Основна субстанція - α -токсин володіє летальним, некротическим і гемолитическим властивістю. Крім того, в фільтратах культур *C. septicum* виявлений фібринолизин і колагеназа. Всі ці фактори відіграють велику роль в патогенезі.

Стійкість до факторів навколишнього середовища. Вегетативні форми швидко гинуть у присутності кисню повітря. Спори менш стійкі, ніж суперечки інших клостридій. Сприйнятливість тварин. У природних умовах хворіють домашні тварини: велика і дрібна рогата худоба.

З експериментальних тварин хворіють морські свинки. Після внутрішньом'язового введення в лапку культури *C. septicum* на місці ін'єкції розвивається інтенсивний набряк, який розповсюджується по всій передній стінці живота і тварина через 24-48 год гине. З ураженої тканини при натисканні виділяється кров'янисті-піниста рідина.

Clostridium histolyticum

C. histolyticum виділено Вейнберг в 1916 р.

Морфологія. Невеликі палички $1,6-3,1 \times 0,6-1$ мкм. Рухливі - перитрихи. Утворюють суперечки, розташовані субтермінально. Грамположительні.

Культивування. *C. histolyticum* - факультативні анаероби. Ростуть на м'ясних і казеїнових середовищах. На кров'яному агарі вони утворюють невеликі блискучі колонії з рівними краями. Навколо колоній невелика зона гемолізу.

Ферментативні властивості. *C. histolyticum* не володіють сахаролитической властивостями. Протеолітичні властивості виражені: розріджують желатин, лизирують шматочки м'яса, поміщені в рідку живильне середовище, при цьому утворюється сірководень.

Токсинутворення. У фільтратах *C. histolyticum* виявляють α -токсин, що володіє летальним і некротичних властивостями. Крім того, в фільтратах виявлений β -фактор, що руйнує колаген (колагеназа). Цей токсин вибірково діє на клітини підшлункової залози. Значення *C. histolyticum* в патології людини остаточно не з'ясовано.

(Нижчевикладений матеріал відноситься до всіх розглянутих представників роду Clostridium.)

Шляхи передачі та вхідні ворота. При пошкодженні тканин, особливо при великих рваних ранах, і попаданні в рану грудок землі, обривків одягу, осколків снарядів може розвинути захворювання. У мирний час газова гангрена може виникнути після операції, ін'єкцій ліків, позалікарняних абортів та ін.

Патогенез. Потрапили в рану суперечки або вегетативні форми клітин розмножуються і виділяють екзотоксин. У процесі розмноження клостридії некротизуючим здорову тканину. Особливо інтенсивно процес розвивається в м'язовій тканині, так як там знаходиться велика кількість глікогену, який є хорошим середовищем для розвитку анаеробів. Найбільш часто інфекція виникає при глибоких ранах, коли утворюються "сліпі кишені", які погано забезпечуються киснем і створюються сприятливі умови для розвитку клостридії. Виділяються екзотоксини викликають явища інтоксикації.

Клостридії часто бувають в асоціації: спільна дія токсинів *C. perfringens* і *C. novyi* викликає більш важку реакцію, ніж дія роздільних токсинів. У патогенезі анаеробної інфекції велике значення має супутня флора (стафілококи, стрептококи та ін.), А також реактивність макроорганізму.

Імунітет. Антитоксичний і антибактеріальний, однак провідна роль належить антитоксин. У людини є природний імунітет, який виникає в результаті наявності в кишечнику клостридії. Після перенесеного захворювання залишається неміцний імунітет. Більш стійкий імунітет створюється при імунізації анатоксином.

Профілактика здійснюється хірургічною обробкою рани (висічення, розрізи). Для специфічної профілактики використовують адсорбований поліанатоксин, що містить анатоксини всіх представників газової гангрени. Для серопротекції при пораненнях (частіше у воєнний час) вводять протигангренозну сироватку: по 10000 МЕ *C. perfringens*, *C. novyi*, *C. septicum*, тобто всього 30000 МЕ. Використовують також суміш анаеробних фагів.

Лікування. Для специфічного лікування застосовують антитоксичну сироватку по 50000 МЕ кожного з клостридії, тобто всього 150000 МЕ. Сироватку вводять внутрішньовенно. Використовують також антибіотики: пеніцилін і сульфамідні препарати і оксигенотерапію.

Мікробіологічна діагностика анаеробної інфекції рани

Матеріалом для дослідження є шматочки ураженої і некротизованої тканини, рідина набряків, кров. При харчових токсикоінфекціях, викликаних клостридіями, досліджують блювотні маси, промивні води шлунку, кал.

Використовують мікроскопічний, бактеріологічний і біологічний методи дослідження.

Мікроскопічний метод. Готують мази – відбитки з патологічного матеріалу, фарбують за Грамом та Бурі–Гінсом. При виявленні в мазках великої кількості грампозитивних грубих чи поліморфних паличок, а при фарбуванні капсул за Бурі–Гінсом можна припустити, що у хворого газова анаеробна інфекція. Використовують також люмінесцентну мікроскопію. Мазок-відбиток обробляють імунофлуоресцентною видоспецифічною сироваткою і вивчають в люмінесцентному мікроскопі. Навколо мікробних клітин знаходять жовто-зелене світіння.

Бактеріологічний метод. Патологічний матеріал розтирають в ступці з кварцовим піском і готують 10% гомогенат на фізіологічному розчині. Ділять його на 2 частини. 1 частину гомогенату прогривають на водяній бані при температурі 80°C протягом 20-30 хвилин для знищення вегетативної мікрофлори. Рідину з набряку і кров центрифугують 30 хвилин при 3000 об. хв. Для висіву використовують осад.

Матеріал, який досліджують, висівають на наступні живильні середовища: кров'яний агар Цейслера, жовточний агар, в глибину стовпчика вісмут – сульфат агару, на бензидиновий агар, середовище Вілліса-Хоббса, СКС, в 5 пробірок з середовищем Кітта-Тароцці, 4 з яких перед висівом кип'ятять протягом 20 хвилин, а потім швидко охолоджують. 1 пробірка залишається без прогрівання. Доцільно висівати матеріал для дослідження в м'ясо-пептонний агар і цукровий агар, якими заповнюють пастерівські піпетки. Висіви поміщають в анаеростат і щодня спостерігають ріст на щільних живильних середовищах. Висіви в рідких живильних середовищах вирощують в звичних умовах в термостаті протягом 15 діб.

Наприклад на кров'яному агарі Цейслера *C. perfringens* виростають у вигляді пласких колоній з підвищенням у центрі та зоною повного гемолізу. Цей вид збудника схильний до повзучого росту. У стовпчику агару утворюють дископодібні колонії. На жовточному агарі навколо колонії *C. perfringens* утворюється кільце білого кольору (*C. perfringens* виробляють лецитиназу-С). Колонії, що вирости, мікроскопують й за наявності в мазках грампозитивних поліморфних грубих паличок пересівають на середовище Кітта-Тароцці для накопичення чистої культури. Мікроскопують також матеріал з рідких живильних середовищ, де спостерігається помутніння середовища і виділення пухирців газу, і пересівають його на вказані вище щільні середовища для отримання росту окремих ізольованих колоній і виділення чистих культур.

Чисту культуру анаеробних мікробів ідентифікують на основі 1) морфологічних, тінкторіальних властивостей (готують мазки, фарбують за Грамом для виявлення грубих або поліморфних грампозитивних паличок, серед яких можуть зустрічатися спорові форми); 2) рухливості (готують препарат «висяча крапля»); 3) біохімічних властивостей (висівають в середовища Гісса з глюкозою, лактозою, манітом, мальтозою, цукрозою, гліцерином, саліцином, а також лакмусове молоко, желатину, згорнуту сироватку, вивчають лецитиназну активність на жовточному агарі, ставлять пробу на каталазу; 4) аеротолерантності (висівають чисту культуру на сектор кров'яного агару і культивують 24-48 годин при 37°C в аеробних умовах).

Вид виділеного збудника раневої анаеробної інфекції визначають за допомогою біопроби на мишах шляхом нейтралізації токсинів специфічними протигангренозними сироватками. З цією метою беруть центрифугат 24 годинної культури, що виросла на середовищі Кітта-Тароцці, змішують з антитоксичними сироватками, витримують 40 хвилин при 20°C в темному місці для нейтралізації токсину і вводять 2 мишам по 0,5 мл внутрішньовенно. Результати біологічної проби враховують через 3 доби за дією гомологічної антитоксичної сироватки, яка нейтралізує токсин і не викликає загибель тварин.

Виділену культуру мікробів вивчають шляхом люмінесцентної мікроскопії на здатність продукувати токсин. На предметному склі на мікробів наносять краплю акридинового помаранчевого, накривають покривним скельцем і досліджують в імерсійній системі люмінесцентного мікроскопа. Якщо культура токсигенна – палички зеленого кольору. Червоного кольору палички або зелені з червоними ділянками вказують на слабку токсигенність або відсутність її.

Біологічний метод. Досліджуваний матеріал, взятий від хворого з підозрою на раневу газову анаеробну інфекцію, вводять внутрішньом'язово або внутрішньочеревинно білим мишам чи морським свинкам. У заражених тварин за наявності анаеробів розвивається картина анаеробної інфекції.

Теоретичні питання:

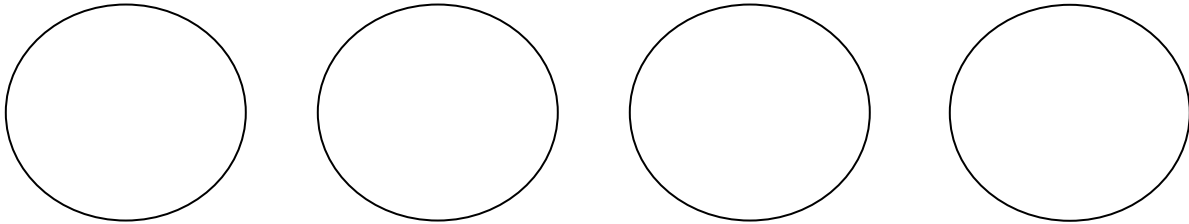
1. Характеристика збудників анаеробної інфекції. Біологічні властивості.
2. Класифікація анаеробів.
3. Властивості клостридій.
4. Резистентність до факторів оточуючого середовища.
5. Генетичний контроль токсиноутворення.
6. Епідеміологія. Патогенез і клінічні особливості анаеробної інфекції.
7. Мікробіологічна діагностика анаеробних інфекцій, правця, ботулізму.
8. Специфічна терапія, профілактика анаеробних інфекцій.

Протокол № 13

Тема: Мікробіологічна діагностика чуми та туляремії.

Мета: Вивчення методів мікробіологічної діагностики, терапії і профілактики чуми та туляремії.

1. Мікроскопія і замальовування демонстраційних препаратів: препарат-відбиток із органу експериментальної тварини, пофарбований метиленовим синім, мазок із чистої культури, пофарбований за Грамом, мазок-відбиток із органу експериментальної тварини, пофарбований за Романовським-Гімзою.



Yersinia pestis
(фарбування метиленовим синім)

Yersinia pestis
(фарб. за Романовським-Гімзою)

Francisella tularensis
(фарб. за Романовським-Гімзою)

Francisella tularensis
(фарбування за Грамом)

2. Вивчення біологічних препаратів для діагностики, специфічної терапії і профілактики чуми та туляремії:

- протичумний бактеріофаг;
- протичумна кінська сироватка;
- чумна жива вакцина;
- туляремійний діагностикум для реакції аглютинації;
- туляремійна люмінесцируюча сироватка;
- тулярін;
- туляремійна жива суха на шкірну вакцина.

3. Вивчення схеми постанови і обліку результатів реакції аглютинації з сироваткою крові хворого на туляремію.

Схема ставлення розвернутої реакції аглютинації для діагностики туляремії

Інгредієнти, мл	№ пробірки						
	1	2	3	4	5	6	7
Ізотонічний розчин NaCl	-	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Сироватка хворого (1:25)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	-	0,5
Діагностикум	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	-
Розведення сироватки	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	-	1:50
Інкубація 2 години в термостаті при 37°C, потім при кімнатній температурі 18-20 годин							
Облік							

4. Постанова кров'яно-крапельної реакції на склі.



Заключення: _____

5. Вивчення схем лабораторної діагностики чуми та туляремії:

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Збудник чуми

Збудник *Yersinia pestis* входить до родини Enterobacteriaceae, роду *Yersinia*.

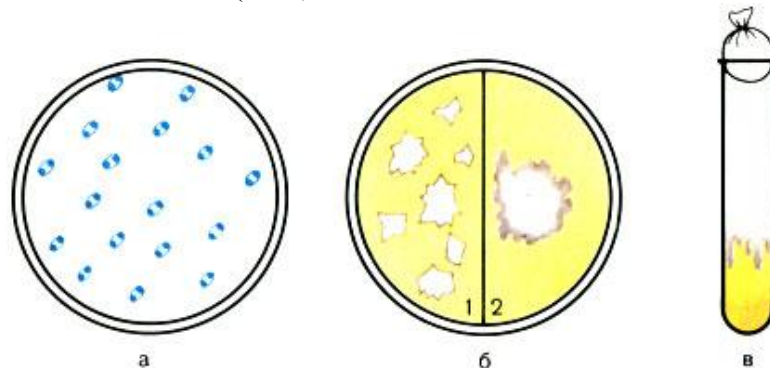
Бактерії чуми відкриті були Йерсеном в Гонконзі в 1894 р і в честь нього весь рід був названий йерсиніями. Великий внесок у вивчення чуми внесли російські вчені Д.К. Заболотний, Н.К. Клоднічкі, І.А. Лебединський, М.Ф. Гамалія і індійські вчені, які запропонували для лікування чуми стрептоміцин.

До роду йерсиній відносяться три види бактерій:

1. *Yersinia pestis* - збудники чуми.
2. *Yersinia pseudotuberculosis* - збудники псевдотуберкульозу.
3. *Yersinia enterocolitica* - збудники кишкових інфекцій.

Всі представники цього роду грамнегативні палички, що мають частіше овоїдну форму і величину $0,4-0,7 \times 1-2$ мкм. Суперечка не утворюють. У збудників псевдотуберкульозу і йерсиній ентероколітіка є джгутики. Все йерсиній невибагливі до живильних середовищ. Ферментативно вони активні: розщеплюють ряд вуглеводів з утворенням кислоти.

Морфологія. Збудник чуми - бовідная паличка, середній розмір $0,3-0,6 \times 1-2$ мкм. Вони дуже поліморфні. В мазках з щільного поживного середовища палички бувають подовженими, ниткоподібними, описані також фільтруються форми. Бактерії чуми не мають спор, джгутиків, утворюють ніжну капсулу. Грамнегативні. З огляду на нерівномірний розподіл цитоплазми кінці паличок фарбуються інтенсивніше. Така біполярність добре видно при фарбуванні їх метиленовим синім (мал.).



Мал. Морфологічні та культуральні властивості збудника чуми (*Yersinia pestis*).

а - бактерії чуми (забарвлення синім Леффлера); б - зростання на МПА: 1 - через 24 год у вигляді битого скла; 2 - через 48 год у вигляді мереживного хусточки; в - зростання на МПБ - 'сталактитовий'

Культивування. Збудники чуми - факультативні анаероби. Чи не вибагливі, ростуть на звичайних поживних середовищах при температурі 28-30°C, рН середовища 7,0-7,2. Зростання з'являється через 12-14 ч. Для прискорення зростання застосовують стимулятори (екстракти деяких бактерій, наприклад сарцин, свежегемолізовану кров, сульфат натрію і ін.). Елективних середовищами для вирощування збудників чуми є казеїнові середовища і гідролізат кров'яних згустків. Виросли колонії через 18-24 год інкубації мають вигляд дрібних грудочок з нерівними краями, через 48 ч краю колоній набувають фестончастий вид і нагадують "мереживний хустинку" (див. мал.).

На скошеному агарі культура росте у вигляді вузького нальоту; на НПБ - у вигляді пухких пластівців, зважених в прозорій рідині. При більш тривалому зростанні з поверхні середовища спускаються пухкі нитки: "сталактитовий зростання". Бактерії чуми ростуть в R-формі, яка є вирулентної. Однак вони легко дисоціюють під впливом ряду факторів, наприклад бактеріофага і через O-форму переходять в S-авірулентніе форму.

Ферментативні властивості. У чумних бактерій виражена сахаролитической активність - вони розщеплюють сахарозу, мальтозу, арабінозу, рамнозу, глюкозу (не завжди) і маніт з утворенням кислоти. Розрізняють два варіанти бактерій чуми - розкладають і не розкладають гліцерин. Протеолітичні властивості виражені слабо: вони не розріджують желатину, не згортають молоко, утворюють сірководень.

Бактерії чуми продукують фібринолизин, гемолізин, гіалуронідазу, коагулазу.

Токсинутворення. Токсин чумної палички являє собою особливий білок, що поєднує властивості екзо- і ендотоксину, він складається з двох білкових фракцій (А і В), що розрізняються за амінокислотним складом і антигенними властивостями. Він дуже токсичний для людини. Чумний токсин називають мишача отрута, так як миші високо чутливі до його дії.

Антигенна структура бактерій чуми складна. Мікроби чуми містять близько десяти різних антигенів: фракції F, V, W та ін. Фракція F - основний компонент, пов'язаний з капсулою; V і W компоненти перешкоджають фагоцитірованія клітини. У бактерій чуми є загальні антигени з збудником псевдотуберкульозу, ешеріхіями, шигеллами і еритроцитами людини O-групи.

Стійкість до факторів навколишнього середовища. Високі температури (100°C) гублять чумні бактерії миттєво, 80°C - через 5 хв. Низькі температури чумні бактерії переносять добре: при 0°C зберігаються 6 місяців, в заморожених трупах - рік і більше. Прямі сонячні промені вбивають їх через 2-3 ч. Чумні бактерії дуже чутливі до висихання. У харчових продуктах вони зберігаються від 2 до 6 міс. У блохах - до року.

Звичайні концентрації дезінфікуючих розчинів вбивають їх через 5-10 хв. Особливо вони чутливі до сулеме і карболової кислоти.

Сприйнятливість тварин. Основними носіями чуми є гризуни: бабаки, ховрахи, тарабагани; вони обумовлюють природну осередкове чуми. Дуже чутливі до чуми сірі та чорні щури, миші; сприйнятливі також верблюди, лисиці, кішки. До експериментальному зараженню чутливі миші, щури, морські свинки та ін.

Джерела зараження. Хворі тварини, в основному гризуни. Епідемії у людей часто передують епізоотії у гризунів.

Шляхи передачі і переносники. 1. Основний шлях передачі - трансмісивний. Переносники - блохи (гризуни → блохи → людина).

2. Повітряно-крапельний шлях (зараження людини від людини при легеневій формі чуми).

3. Харчовий - при вживанні в їжу погано провареного зараженого м'яса (цей шлях буває рідко).

Патогенез і форми захворювання. Вхідними воротами є шкіра і слизові оболонки дихальних шляхів і травного тракту. Збудники чуми мають велику інвазивної здатністю. На місці проникнення збудника утворюються папули, що переходять в пустулу з кров'янистогнійним вмістом. У патологічний процес втягуються регіонарні лімфатичні вузли, через які мікроби проникають в кров, викликаючи бактеріємію. З кров'ю вони потрапляють у внутрішні органи.

Залежно від місця локалізації у людини можуть виникнути різні форми захворювання: шкірна, кожно-бубонна, кишкова, легенева, первинно-септична; кожна форма може закінчитися сепсисом (вторинна септицемія). Найбільш часто виникає бубонна форма. Бубон хворобливий. При попаданні великої дози збудника і малої резистентності організму може виникнути первинно-септична форма. Захворювання починається гостро і протікає з явищами інтоксикації - високою температурою, головним болем та ін.

Імунітет. Напружений і тривалий (в минулі століття в період великих епідемій перехворіли використовували для догляду за хворими). Імунітет обумовлюється системою макрофагів. Велике значення має фагоцитарний фактор.

Профілактика. Загальні заходи полягають в ранній діагностиці, ізоляції хворих. Встановлення карантину для людей, що знаходилися в контакті з хворими. Проведення в осередках дезінсекції та дератизації. Захист медичного персоналу, що знаходиться в осередках, проводиться введенням стрептоміцину і протичумної вакцини. Виконання міжнародних конвенцій щодо профілактики чуми (дератизація та дезінфекція кораблів в портах). Охорона державних кордонів.

Специфічна профілактика. В Україні застосовують живу вакцину EV. Цей штам був отриманий з вирулентної культури шляхом послідовних пересівань збудника на поживні середовища протягом 5 років. Штам втратив вірулентність, зберігши при цьому імуногенні властивості. Імунітет триває близько року. Вакцинують тільки людей, яким загрожує небезпека зараження.

Лікування. Стрептоміцин, тетрациклін, специфічний фаг і протичумний імуноглобулін.

Мікробіологічна діагностика чуми

Матеріалом для мікробіологічної діагностики при бубонній формі чуми є вміст бубонів, при легеневої формі – мокротиння, при кишковій формі – випорожнення, при септичній формі – кров. Від трупа досліджують кров з серця, часточки уражених органів: лімфатичних вузлів, легень, печінки, селезінки.

Мікробіологічну діагностику чуми проводять мікроскопічним, бактеріологічним, серологічним та біологічним методами. При дослідженні трупного матеріалу, який загниває, для виявлення в ньому антигенів збудника застосовують реакцію термопреципітації.

Добір та доставка матеріалів у лабораторію повинні виконуватись з ретельним дотриманням правил безпеки.

Мікробіологічна діагностика чуми проводиться з дотриманням суворого режиму в спеціальних протичумних установах.

Мікроскопічний метод. З матеріалу, який досліджується, готують мазки й фарбують за Грамом й синькою Леффлера. *Yersinia pestis* у мазках схожа на коротку овоїдну паличку й фарбується біполярно. Збудник чуми фарбується за Грамом негативно. Найбільш ефективним є виявлення збудника з допомогою специфічних люмінесцентних сироваток в РІФ. Після обробки такими сироватками мазків з дослідного матеріалу, в разі наявності *Y. pestis*, під час перегляду препаратів за допомогою люмінесцентного мікроскопу виявляються характерні за морфологічними ознаками палички, які з обох боків на кінцях світяться смарагдово-зеленим кольором.

Бактеріологічний метод. Матеріал, що досліджується висівають на м'ясо-пептонний агар з додаванням стимуляторів росту (сульфіт натрію, кров чи лізат культури сарцин) і МПБ, інкубують в термостаті при 25-28°C.

На МПА через 24 години виростають колонії R-форми у вигляді «мереживних хусточок» – компактний опуклий центр яких, оточений світлою мереживною зоною.

В бульйоні ріст проявляється утворенням плівки, від якої вниз відходять ниткоподібні утворення, що нагадують сталактити. Бульйон залишається прозорим. Матеріал з підозрілих колоній пересівають на скошений агар для отримання та накопичення чистої культури мікробів. З мікробного нальоту, що виростає на скошеному агарі через добу, готують мазок, який фарбують за Грамом, вивчають під мікроскопом та встановлюють чистоту отриманої культури й проводять її ідентифікацію. Приналежність до *Y. pestis* встановлюють на основі вивчення морфологічних, тінкторіальних, культуральних, біохімічних, антигенних властивостей, проби з чумним бактеріофагом, біопроби, рухливості.

Серологічний метод. Антитіла до збудника чуми у сироватці хворих визначають з допомогою реакції пасивної гемаглютинації, непрямой РІФ й ІФА.

Біологічний метод. Матеріал, який досліджується, вводять морській свинці підшкірно, внутрішньочеревинно або наносять на шкіру, втираючи його у поголену скарифіковану шкіру черева.

При наявності в матеріалі збудника чуми у тварин розвивається гострий інфекційний процес. При внутрішньочеревному зараженні морські свинки гинуть через 2-3 доби, а при нашірному – через 5-7 діб. З трупного матеріалу тварин, які загинули, готують мазки – відбитки. Їх роблять з лімфатичних вузлів, селезінки, печінки, легень, а також готують мазки крові, роблять висів на живильні середовища. Після забору матеріалу для дослідження, трупи тварин занурюють у 5% розчин лізолу, а потім спалюють.

Для виявлення збудників чуми у трупному матеріалі, який загниває, застосовують реакцію термопреципітації з чумною преципітуючою сироваткою.

Диференціація Y. pestis від Y. pseudotuberculosis й Y. enterocolitica

Властивості	<i>Y. pestis</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	<i>Y. enterocolitica</i>
Рухливість при 25°C	-	+	+
Рухливість при 28-37°C	-	-	-
Ферментація з утворенням кислоти			
Ферментація з утворенням рамнози	-	+	-
Ферментація з утворенням рафінози	-	+	-
Ферментація з утворенням інозита	-	-	+
Утворення уреаз	-	-	+
Утворення орнітин-декарбоксилази	-	-	-
Наявність фракції 1	+	-	-
Наявність мишачого токсину	+	-	-
Наявність пестицину 1	+	-	-
Наявність плазмокоагулази	+	-	-
Фібрінолізин	+	-	-
Чутливість до чумного бактеріофагу	+	-	-
Вірулентність	у R формі	у S формі	у S формі

Збудник псевдотуберкульозу

Кишковий ієрсиніоз й псевдотуберкульоз – гострі інфекційні захворювання, що протікають з переважним враженням шлунково-кишкового тракту.

Збудники належать до родини Enterobacteriaceae, роду Yersinia (*Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*).

Збудники псевдотуберкульозу за морфологічними, культуральними та ферментативними властивостями схожі з збудниками чуми. Однак є відмінності. Бактерії псевдотуберкульозу рухливі, перитрихи. Біохімічно активніші.

Антигенні властивості. Бактерії псевдотуберкульозу мають жгутиковий H-антиген і два соматичних антигену: гладкий - типовий і шорсткий - груповий, спільний з антигеном збудника чуми.

До збудника псевдотуберкульозу в основному чутливі тварини: гризуни, домашні і хижі. Людина заражається харчовим шляхом.

Патогенез. Збудники псевдотуберкульозу проникають в шлунково-кишковий тракт, вражають лімфоїдну тканину, розмножуються і по лімфатичних судинах проникають в кров, викликаючи бактеріємію і токсикоз.

Мікробіологічна діагностика ієрсиніозів

Для мікробіологічної діагностики цих захворювань використовують мікроскопічний, бактеріологічний, серологічний та алергологічний методи.

Матеріалом для дослідження є кров, сеча, випорожнення, продукти харчування.

Мікроскопічний метод. В мазках, виготовлених із випорожнень, сечі та фарбованих за Грамом *Y. pseudotuberculosis* й *Y. enterocolitica* мають вигляд безспоривих грамнегативних паличок розміром від 1-3 - 0,5-0,8 мкм. Обидва види бактерій рухливі при температурі 18-20°C і нерухомі при температурі 37°C .

Бактеріологічний метод. Заснований на виділенні збудника, як правило, з калових мас хворого. Спочатку матеріал для дослідження висівають у рідкі середовища накопичення (фосфатно-буферний розчин, 1% пептонна вода) й витримують у холодильнику при температурі 5-6°C для накопичення ієрсиній в мікробних асоціаціях. При недостатності живлення й низькій температурі ієрсинії накопичуються швидше за інші ентеробактерії. На 3-5 добу виконують висів із середовища накопичення на чашки Петрі з середовищами Ендо, Плоскирева, Серова, попередньо оброблені слабким розчином луку, й поміщають в термостат для культивування.

Y. enterocolitica на щільних середовищах утворює дрібні, круглі, опуклі блискучі колонії з рівними краями, з блакитино-сірим відтінком. У процесі старіння колонії зливаються та ростуть суцільно. На середовищі Ендо утворюються колонії з рожевим відтінком. У рідких поживних середовищах спостерігають дифузний ріст у вигляді помутніння.

Y. pseudotuberculosis утворюють як S- так й R-форми колоній. S-форми *Y. pseudotuberculosis* – дрібні, блискучі, сірувато-жовті й менш прозорі ніж у *Y. enterocolitica*. На середовищі Ендо колонії безбарвні. R-форми - опуклі, бугристі, середніх розмірів, часто з фестончастими краями. У процесі старіння колонії збільшуються в розмірах й втрачають свою прозорість. У рідинних поживних середовищах ієрсинії дають дифузний ріст у вигляді помутніння чи у вигляді осаду пластівців, залишаючи середовище прозорим. Відбирають підозрілі колонії, що виростили, і виготовлюють з них мазки, які фарбують за Грамом, мікроскопують. Частину колонії, яка залишилась, пересівають на скошене поживне середовище для накопичення чистої культури мікробів. Пробірки поміщають в термостат на 48-72 годин при температурі 22-30°C.

Отриману чисту культуру мікроорганізмів висівають у строкатий ряд Гіса для вивчення біохімічних властивостей.

Збудники псевдотуберкульозу та кишкового ієрсиніозу

Здатність до ферментації	Збудники	
	Кишкового ієрсиніози	Псевдотуберкульозу
Рамноза	–	+
Маніт	+	+
Лактоза	–	–
Цукроза	+	–
Мілібіоза	–	+
Сорбіт	+	–
Мукат	–	–
Сірководень	–	–
Індол	±	–

реакція позитивна (+), реакція негативна (–).

Ієрсинії не утворюють сірководню, проявляють уреазну активність. Ферментують більшість вуглеводів, виключаючи лактозу й мукат, без утворення газу. У ієрсиній псевдотуберкульозу реакція Фогеса-Проскауера завжди негативна, тоді як у кишкових ієрсиній при температурі 22-28°C вона позитивна. Псевдотуберкульозні мікроби від кишкових ієрсиній відрізняються за відношенням до цукрози й рамнози, лізабельністю псевдотуберкульозним бактеріофагом й аглютинабельністю відповідними видовими сироватками.

Для вивчення антигенних властивостей виконують реакцію аглютинації на склі з адсорбованою діагностичною сироваткою при розведенні 1:10. Результати оцінюють через 3-5 хвилин.

Серологічний метод. З метою виявлення специфічних антитіл у крові хворого використовують реакцію аглютинації й реакцію пасивної гемаглютинації. Досліджують парні сироватки, відібрані на початку та на 3-му тижні захворювання. Розгорнута РА типу Відаля виконується з відповідними діагностикумами. Реакцію вважають позитивною при титрі антитіл 1:200 й вище. Реакцію пасивної гемаглютинації (РПГА) ставлять з еритроцитарним псевдотуберкульозним й кишковоієрсиніозним діагностикумами. РПГА вважається позитивною при титрі 1:160 – 1:200 й вище.

При дослідженні парних сироваток, найбільш вірогідним вважають приріст титрів антитіл у 4 рази й більше.

В експрес-діагностиці псевдотуберкульозу й кишкового ієрсиніозу для виявлення антигенів ієрсиній в матеріалі, який досліджується, в перші дні захворювання може бути використаний ІФА (див. додаток).

Алергологічний метод. Для постановки внутрішньошкірної проби використовують алергодіагностичні препарати "псевдотуберкулін" й "ентероієрсин". Облік проби проводять через 24 години. Реакція вважається позитивною, якщо у місці введення 0,1 мл алергену утворюється папула й зона гіперемії діаметром 10 мм й більше.

Збудник туляремії

Збудник *Francisella tularensis* входить до родини Brucellaceae, роду Francisella.

Збудник туляремії вперше був виділений в 1911 р Мак-якому і Чепіна при вивченні захворювання ховрахів в США (штат Каліфорнія, округ Туляре). У 1921 році американський дослідник Е. Френсіс з'ясував, що ця хвороба властива також людям і описав її. Тому збудник отримав назву *Francisella tularensis*.

Морфологія. Збудники туляремії дрібні коккобактерії. Середня величина їх 0,3-0,6 × 0,1-0,2 мкм. Вони дуже поліморфні: в мазках виявляють кулясті, ниткоподібні і інші форми.

Зустрічаються культури, які проходять через бактеріальні фільтри. Бактерії туляремії нерухомі, спор не утворюють. Мають ніжною капсулою, грамнегативні. У мазках-відбитках, зроблених з органів і забарвлених за Романовським, бактерії мають ніжно-фіолетове забарвлення.

Культивування. Збудники туляремії - факультативні анаероби. Ростуть вони на середовищах, багатих поживними речовинами: згорнутої желточної середовищі, на агарових м'ясних чи рибних середовищах з додаванням цистину, глюкози і крові. Розмножуються краще на щільних поживних середовищах, але зростання може бути і на рідких і напіврідких середовищах. На щільних поживних середовищах бактерії туляремії ростуть повільно, 4-14 днів при температурі 36-37 ° С і рН 6,8-7,2. Вони утворюють дрібні, білуватого кольору, опуклі, блискучі з рівними краями колонії діаметром в 1-3 мм. Вірулентні штами в S-формі. Вакцинні штами в SR-формі. R-форма бактерій - авірулентніе (при тривалому культивуванні в лабораторних умовах вони переходять в R-форму).

Ферментативні властивості. У бактерій туляремії ферментативні властивості мало виражені і виявляються тільки на спеціальних середовищах. Вони можуть ферментувати глюкозу, мальтозу, манозу, левулезу з утворенням кислоти без газу. Деякі штами розщеплюють гліцерин, іноді утворюють сірководень.

Токсинутворення. Екзотоксин у бактерій туляремії не розпізнаний. Хвороботворні дію мікробів пов'язано, по-видимому, з ендотоксинів.

Антигенна структура. S-форма туляреміїних бактерій містить два антигенних комплексу: О-і Vi-антигени. З Vi-антигеном пов'язані вірулентність і імуногенність. R-форми втрачають Vi-антиген. О-антиген має загальний антиген з бруцельозного бактеріями.

Стійкість до факторів навколишнього середовища. При температурі 100°C бактерії туляремії гинуть миттєво, при температурі 60°C - зберігаються 20 хв. При низьких температурах і у вологому ґрунті збудники зберігаються до 4-5 міс. При 1°C у воді вони зберігаються до 9 міс, зерні та соломі при 0°C - до 150 днів, хлібі - до 14 днів, м'ясі - до 30 днів та ін. Звичайні розчини дезінфікуючих речовин вбивають їх протягом 10-15 хв. Бактерії туляремії чутливі до багатьох антибіотиків.

Сприйнятливість тварин. Збудники туляремії патогенні для багатьох видів тварин. Природна зараженість туляремією відома у 145 видів хребетних і понад 100 видів безхребетних тварин. Найбільш сприйнятливими до туляремії є багато видів гризунів і деякі комахоїдні.

З експериментальних тварин чутливі морські свинки і білі миші.

Джерела інфекції - гризуни, переважно водяні щури, полівки, будинкові миші, ондатри, хом'яки і зайці. Джерелом зараження може бути вода, харчові продукти, солома та інші субстрати, забруднені виділеннями хворих тварин.

Шляхи передачі. Трансмисивний, повітряно-пиловий, харчовий, контактнo-побутовий.

Патогенез. Бактерії туляремії мають високу інвазивної здатністю. Вони проникають через пошкоджену і неушкоджену шкіру і слизові оболонки.

Залежно від шляху проникнення в організм збудники можуть локалізуватися в шкірі, слизових оболонках кишкового тракту, дихальних шляхів, очей та інших органах. З вхідних воріт по лімфатичних шляхах вони потрапляють в найближчі лімфатичні вузли, де розмножуються і надходять в кров. В осередках скупчення збудників туляремії утворюються специфічні гранульоми - первинні бубони. При подальшому поширенні мікробів можуть виникнути вторинні бубони. Розміри бубонів коливаються від лісового горіха до курячого яйця.

Розрізняють такі клінічні форми захворювання: бубонна, ангінозний-бубонна, глазобубонна, легенева, абдомінальної та генералізовану. По тяжкості перебігу - легку і важку форми. За тривалістю перебігу - гостру і затяжну форми.

Імунітет. Напружений і тривалий. Визначається гуморальними і клітинними факторами. Характерним для туляремії є алергічний стан, що виникає з перших днів захворювання.

Профілактика. Боротьба з гризунами та комахами. Общесанітарні заходи.

Специфічна профілактика. Імунізують людей, які проживають в зоні природних вогнищ. Імунізацію проводять живою вакциною Гайского-Ельберта. Вакцинують одноразово, накожно. Тривалість імунітету 3-6 років.

Лікування. Бактерії туляремії чутливі до багатьох антибіотиків: стрептоміцину, біоміцину, тетрацикліну, мономіцину, канаміцину. До пеніциліну та сульфаміди вони не чутливі.

Мікробіологічна діагностика туляремії

Матеріалом для дослідження, в залежності від клінічної форми захворювання, є пунктат лімфовузлів, відокремлюване кон'юнктиви, вміст пустул чи виразки на шкірі, мокрота, випорожнення, кров.

Матеріал забирають й доставляють в лабораторію, дотримуючись правил роботи зі збудниками особливо небезпечних інфекцій.

Мікробіологічну діагностику туляремії проводять біологічним, бактеріологічним, серологічним, алергологічним методами.

Біологічний метод. Виділити збудника туляремії шляхом прямого висіву матеріалу, який досліджується, на живильні середовища не вдається, тому біологічний метод має першорядне значення. Матеріалом, який досліджується інфікують білих мишей чи морських свинок. Матеріал вводять підшкірно, на шкірно, внутрішньочеревним методом чи через рот. Навіть при введенні одиничних бактерій тварини, як правило, занедужують й гинуть (миші на 3-4 добу, морські свинки – на 10 добу). Якщо в зазначений термін тварини не гинуть, їх забивають на 15-20 добу і розтинають трупи. Із селезінки і печінки готують мазки-відбитки і мікроскопують їх. Кров, кістковий мозок, ділянки внутрішніх органів втирають у поверхню одного зі спеціальних живильних середовищ.

Бактеріологічний метод. Для культивування використовують згорнуте жовточне середовище, середовище Мак-Коя, глюкозо-цистеїновий агар з кров'ю. Ріст туляреміїних бактерій на згорнутому жовточному середовищі з'являється через 18-24 години при температурі 37°C. Засіяні живильні середовища інкубують у термостаті до 10 діб. Туляреміїні бактерії ростуть у виді нальоту з нерівною поверхнею чи утворюють дрібні гладенькі S-форми колонії, що мають білуватий колір з блакитним відтінком, схожі на крапельки роси. Після виділення чистої культури мікробів проводять їх ідентифікацію за морфологічними, культуральними, антигенними властивостям. У мазках з колоній виявляють дрібні поліморфні грамнегативні бактерії. Антигенні властивості визначають у реакції аглютинації з туляремієюю аглютинуючою сироваткою.

Збудник добре культивується в жовточному мішку 12-добового курячого ембріона, в якому легко виявляється за допомогою прямої реакції імуофлюоресценції (РІФ).

Біологічний і бактеріологічний методи досліджень проводять тільки в спеціалізованих лабораторіях.

Серологічний метод. З 2-го тижня захворювання ставлять розгорнуту реакцію аглютинації в пробірках з туляреміїним діагностикомом. Діагностичним вважається титр 1:100. Під час постановки реакції аглютинації з парними сироватками, збільшення титру антитіл в чотири рази й більше дозволяє поставити діагноз. Специфічні антитіла в сироватці крові хворого визначають й в реакції пасивної гемаглютинації, яка може бути позитивною

вже наприкінці першого тижня захворювання. Для її постановки використовують еритроцитарний туляремійний діагностикум. Діагностичні титри 1:1280 – 1:2560.

Алергологічний метод. Ставлять шкірно-алергічну пробу з тулярином. У разі внутрішньошкірної постановки вона буває позитивною з 3-5, а при нашкірній – з 6-8-ї доби хвороби. Результати проби враховують через 24-48 г. Наявність вираженого інфільтрату й гіперемії діаметром 0,5 см більше свідчить про позитивну реакцію.

Теоретичні питання:

1. Характеристика збудників чуми та туляремії. Біологічні властивості.
2. Епідеміологія. Патогенез, клінічні особливості чуми та туляремії.
3. Лабораторна діагностика.
4. Властивості і характер імунітету.
5. Принципи лікування і профілактика чуми та туляремії.

Протокол № 14

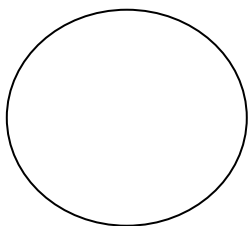
Тема: Мікробіологічна діагностика бруцельозу.

Мета: Вивчення методів мікробіологічної діагностики, терапії і профілактики бруцельозу.

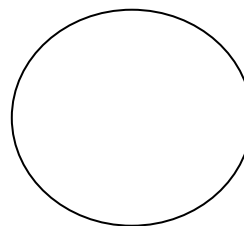
1. Огляд і замалювання демонстраційних препаратів:

а) мазок із чистої культури бруцел (фарбування за Грамом);

б) мазок із чистої культури бруцел (фарбування за Козловським);



Brucella abortus
(фарбування за Грамом)



Brucella abortus
(фарбування за Козловським)

2. Вивчення живильних середовищ:

а) печінковий бульйон і агар для бруцел.

3. Вивчення біопрепаратів для лабораторної діагностики, специфічної терапії і профілактики:

- бруцельозний діагностикум для постанови реакції Райта і Хеддльсона;

- антиген для опсонофагоцитарної проби;

- бруцелін для алергічної проби;

- бруцельозна вакцина;

4. Самостійна робота студентів:

а) постановка реакції Хеддльсона з метою виявлення антитіл у сироватці хворого.

Схема постановки реакції аглютинації Хеддльсона

Інгредієнти, мл	Номер квадрата					
	1	2	3	4	5	6
Ізотонічний розчин NaCl	-	-	-	-	Контроль сироватки 0,03	Контроль антигена 0,03
Сироватка хворого	0,08	0,04	0,02	0,01	0,02	-
Бруцельозний діагностикум	0,03	0,03	0,03	0,03	-	0,03

Реакція аглютинації Хеддльсона на склі

1	2	3
4	5	6

Заключення:

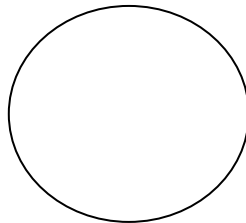
б) вивчення схеми постанови реакції Райта з метою виявлення антитіл в сироватці хворого.

Схема реакції аглютинації Райта

Інгредієнти, мл	№ пробірки						
	1	2	3	4	5	6 Контроль антигена	7 Контроль сироватки
Ізотонічний розчин NaCl	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	-
Сироватка хворого (1:50)	1,0 →	1,0 →	1,0 →	1,0 →	1,0	-	1,0
Бруцельозний діагностикум	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-
Розведення сироватки	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	-	1:50
Інкубація 18-20 годин в термостаті при 37 °С, потім при кімнатній температурі 2 години							
Облік							

Заклучення:

в) приготування мазків із культури антракоїда, фарбування їх за Грамом і замалювання.



5. Вивчення схем лабораторної діагностики бруцельозу.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Збудники бруцельозу

Збудники *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis* входять до роду *Brucella*.

У 1886 р. Д. Брюс в селезінці хворого, який загинув від мальтійської лихоманки, виявив маленьку коккобактерію, яку виділив у чистій культурі і назвав *Micrococcus*.

У 1896 р. Б. Банг з навколоплідної рідини при аборті корів також виділив коккобактерію. У 1914 р. Ж. Траум виділив подібну паличку від хворих свиней. А в 1916 р. Ивенса, вивчивши всі виділені мікроорганізми, визначила їх схожість і в честь Брюса вони були названі бруцеллами. Надалі (1953, 1957, 1966) були відкриті і інші види бруцел. Всі вони об'єднані в рід *Brucella*.

В даний час бруцелли поділяють на види за ознакою їх основного господаря: *B. melitensis* - хворіє дрібна рогата худоба (вівці, кози); *B. abortus* - хворіє велика рогата худоба; *B. suis* - хворіють свині та ін.

Кожен вид бруцел поділяють на біовари: *B. melitensis* включає 3 біовара; *B. abortus* - 9 біоварів; *B. suis* - 5 біоварів. Найбільш патогенним для людини є *B. melitensis*. *B. abortus* рідко викликають клінічний прояв захворювання у людини.

Морфологія. Збудники бруцельозу дрібні 0,6-0,8 × 0,3-0,5 мкм бактерії паличкової або овоїдної форми. Нерухомі. Суперечка не мають. Утворюють ніжну капсулу. Грамнегативні. В мазку розташовуються безладно.

Культивування. Бруцели - аероби. Вибагливі до живильних середовищ. Характеризуються уповільненим ростом (2-3 тижнів). Вирощують їх на спеціальних поживних середовищах: сироватково-декстрозних агарі, на агарі з картопляного настою з сироваткою і кров'яним агаром (5% овечої крові), середовищі "Д", печеночном агарі МПА і МПБ. Ростають вони при температурі 37°C і рН 6,8-7,2. Деякі штами вимагають для зростання 5-10% CO₂, особливо при первинному виділенні. На щільних поживних середовищах виростають ніжні, дрібні, безбарвні, опуклі з перламутровим блиском колонії в S-формі. Під впливом деяких факторів вони можуть диссоціювати в R-форму. Під дією антибіотиків у них виникають L-форми. У рідких поживних середовищах бруцели дають рівномірну каламуть. Бруцели можна культивувати в желточном мішку курячого ембріона.

Диференціюють види бруцел на підставі їх здатності утворювати сірководень і рости на середовищах з барвниками - основним фуксином і тіоніном.

Біологічні властивості бруцелл

Вид бактерії	Тест		
	Бактеріостатична дія барвників (1:25000)		Виділення H ₂ S
	фуксин	тіонин	
<i>B. melitensis</i>	+	+	-
<i>B. bovis</i>	+	-	+
<i>B. suis</i>	-	+	+

Ферментативні властивості. Бруцели розщеплюють D-рибозу, D-галактозу, аланін, аспарагін. Деякі штами гідролізують амінокислоти з утворенням аміаку.

Бруцели утворюють гіалуронидазу, каталазу, пероксидазу, ліпазу, фосфатазу та ін. Бруцели мають виражені інвазивними і агресивними властивостями.

Токсинутворення. Патогенна дія бруцелл визначається, по-видимому, наявністю ендотоксин. Крім того, вони мають алергенні властивості.

Антигенна структура. Бруцели містять два соматичних антигену А і М. Ці антигени є видоспецифічними. Вони завжди входять до складу мікробної клітини, але в різних співвідношеннях. У *B. melitensis* переважає антиген М, у *B. abortus* і *B. suis* - антиген А. Крім того, у них виявлено термолабільних Vi-антиген.

Стійкість до факторів навколишнього середовища. При 100°C бруцели гинуть миттєво. При температурі 80-85°C - через 5 хв, при 60°C - через 30 хв. До низьких температур вони дуже стійкі. Прямі сонячні промені діють на них згубно. У вологому середовищі бруцели зберігаються довго - 3-4 міс. У молочних продуктах - до 40-45 днів, замороженому м'ясі - до 5 міс, ґрунті і воді - до 3-5 міс.

Сприйнятливість тварин. Бруцельоз хворіють в основному сільськогосподарські тварини: дрібна та велика рогата худоба, свині, олені та ін. Кожен вид бруцел вражає певний вид тварини. Але бруцели можуть мігрувати, т. Е. Переходити від одного виду тварини іншій. Наприклад, *B. abortus* можуть вражати дрібну рогату худобу.

Основними ознаками захворювання є: у самок - аборти, у самців - орхіти. Крім того, у них буває ураження суглобів, схуднення, випадання шерсті та ін. Але бруцельоз у тварин може протікати у прихованій формі, що сприяє поширенню інфекції.

З експериментальних тварин до бруцел чутливі білі миші і морські свинки. Після зараження вони абортують, різко худнуть, у них випадає шерсть. У мишей іноді розвивається септицемія.

Джерела інфекції. Основним джерелом захворювання на бруцельоз людей є дрібна та велика рогата худоба. Роль людини в передачі бруцельозній інфекції епідеміологічного значення не має.

Шляхи передачі. Харчовий, контактнo-побутовий, повітряно-крапельний.

Контактний шлях - при роботі з тваринами: в процесі догляду за тваринами, на підприємствах, що переробляють сировину і продукти тваринного походження; при зіткненні з виділеннями хворих тварин, плодом, в процесі забою, розбирання туші та ін.

Аерогенним шляхом бруцели проникають в шкіру і неушкоджені слизові оболонки.

Харчовий шлях - вживання заражених харчових продуктів. Найбільш небезпечні молочні продукти - молоко, бринза та ін.

Патогенез. Потрапивши в організм, бруцели по лімфатичних шляхах проникають в лімфатичні вузли, кров, кістковий мозок, паренхіматозні органи і локалізуються всередині клітин. При загостренні процесу бруцели з клітин знову потрапляють в кров і виникає рецидив. Захворювання характеризується запаленням суглобів, невралгією і природними абортами.

Імунітет - обумовлюється клітинними (фагоцитоз) і гуморальними факторами - агглютининами, комплементсвязиваючіе антитілами і ін. Імунітет поєднується зі станом алергії. У дослідах на морських свинках було показано, що стійкість до повторного зараження у них поєднувалася з позитивною реакцією до бруцеллін.

Профілактика. Планові обстеження в тваринницьких господарствах, на пасовищах, в забійних пунктах, на м'ясних і молочних комбінатах.

Специфічна профілактика. Вакцинація живою вакциною *B. abortus* (штам 19-ВА). Щеплення проводять на шкірному методом одноразово, ревакцинують через 8-12 міс.

Лікування. Антибіотики: левоміцетин, еритроміцин. Для попередження рецидивів використовують також бруцеллезний імуноглобулін.

Мікробіологічна діагностика бруцельозу

Матеріалом для мікробіологічної діагностики є кров, кістковий мозок, сеча, грудне молоко, навколосуглобна рідина, навколоплідні води, абортвані плоди тварин. Мікробіологічну діагностику бруцельозу проводять мікроскопічним, бактеріологічним, серологічним, біологічним та алергологічним методами.

Мікроскопічний метод. З матеріалу, який досліджують, готують мазок і фарбують спочатку карболовим фуксином (розведення 1:5) протягом 3 хвилин. Потім препарат промивають водою і додатково фарбують 2% водним розчином метиленової синьки протягом 5 хвилин. При мікроскопії виявляють на блакитному тлі бруцели у вигляді коротких паличок із закругленими кінцями червоного кольору.

Бактеріологічний метод. Оскільки збудники бруцельозу високовірулентні й контагіозні, працювати з культурами цих мікробів можуть лише фахівці, що мають відповідну підготовку.

Матеріал, який досліджують, висівають у печінковий бульйон чи МПБ із 1% глюкози і 1% гліцерину. При цьому використовують 2 флакони із середовищем. В другому флаконі створюють умови для росту *B. abortus*. Цей вид бруцел для росту вимагає CO₂. Тому флакон з бульйоном після висіву в нього матеріалу, який досліджується, закривають тліючою ватно-марлевою пробкою. Висіви розміщують у термостаті при t 37°C й культивують протягом декількох днів. Далі роблять пересів на щільні живильні середовища: печінковий агар, сироватково-декстрозний чи кров'яний агар.

На цих середовищах бруцели ростуть у вигляді ніжних безбарвних опуклих круглих колоній діаметром від 1 до 5 мм (S- форми). Їх порівнюють із крапельками роси. Іноді з'являються R-формиколоній. У мазках з типових колоній виявляються дрібні грамнегативні бактерії кулястої, овоподібної чи паличкоподібної форми.

Підозрілі колонії пересівають на скошений печінковий агар й після виділення чистої культури мікробів ідентифікують їх. При цьому враховують морфологічні, тінкторіальні, культуральні властивості, потребу у CO₂ для росту, здатність рости на середовищах у присутності фуксину, тіоніну, виділяти H₂S, утворювати уреазу, фосфатазу, каталазу, чутливість до специфічного полівалентного бактеріофага, аглютинацію моноспецифічними бруцельозними сироватками.

Серологічний метод. Визначають титр антитіл до бруцел у сироватці обстежуваного в реакціях Райта й Хеддльсона. Як антиген використовують бруцельозний єдиний діагностикум. Цей діагностикум представляє собою гомогенну суспензію бруцел, інактивовану нагріванням фенолом і пофарбовану в синій колір. Під час постановки реакції аглютинації Райта з сироватки хворого готують розведення 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 на фізіологічному розчині, у який додають перед тим 0,5% фенолу в об'ємі 0,5 мл, а потім додають по 0,5 мл бруцельозного єдиного діагностикума в розведенні 1:10. Реакція вважається позитивною при титрі 1:100 – 1:200, а при титрі 1:800 й вище – різко позитивною.

Реакцію Хеддльсона ставлять на добре знежиреному склі, розкресленому на 6 квадратів. На першому квадраті записують номер сироватки, а на другий, третій, четвертий, п'ятий квадрат наносять сироватку, яку досліджують, в об'ємах 0,04; 0,02; 0,01 мл; 0,02 мл (контроль сироватки). У контроль сироватки додають 0,03 фізіологічного розчину, в інші краплі сироватки – 0,03 мл не розведеного бруцельозного єдиного діагностикума. На шостому квадраті контроль антигену (0,03 мл антигену + 0,03 мл фізіологічного розчину). Облік реакції проводять протягом 8 хв. Негативна реакція – аглютинат відсутній у всіх обсягах сироватки. Сумнівна реакція – аглютинат є тільки в об'ємі 0,04 м/л. Позитивна реакція – аглютинат в об'ємах 0,02-0,01 мл. Різко позитивна – аглютинат у всіх об'ємах сироватки. Реакцію застосовують при масовому обстеженні людей. Позитивний результат дозволяє відібрати осіб з підозрою на бруцельоз для подальшого поглибленого обстеження.

Біологічний метод застосовують для виділення бруцел у чистій культурі з матеріалів, забруднених сторонніми мікроорганізмами. Для цього використовують морських свинок й білих мишей. Матеріал, який досліджують, вводять підшкірно чи внутрішньочеревним шляхом.

Алергологічний метод (проба Бюрне). У середню частину внутрішньої поверхні передпліччя внутрішньошкірно вводять 0,1 мл бруцеліну (фільтрат з 3-4 тижневих бульйонних культур бруцел трьох типів). Позитивна реакція характеризується утворенням через 24 години патологічного інфільтрату розміром 4 x 6 см й гіперемією. Ця реакція специфічна. Вона виявляється через 1-2 тижні після початку захворювання і зберігається роками.

Теоретичні питання:

1. Збудник бруцельозу.

Властивості. Резистентність. Епідеміологія.

Патогенез, клінічні особливості сибірської виразки.

Патогенність для людини і тварини. Фактори патогенності, токсини.

2. Мікробіологічна діагностика.

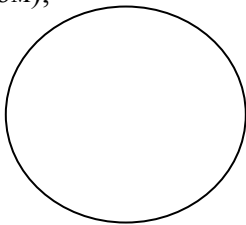
3. Специфічна профілактика і лікування сибірської бруцельозу.

Протокол № 15

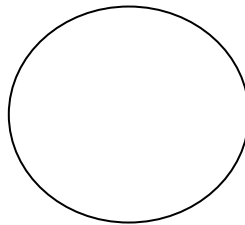
Тема: Мікробіологічна діагностика сибірки.

Мета: Вивчення методів мікробіологічної діагностики, терапії і профілактики сибірки.

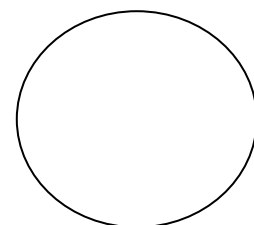
1. Огляд і замалювання демонстраційних препаратів:
 - а) мазок із культури стрептобацил (фарбування за Грамом);
 - б) мазок-відбиток із органу інфіцированої експериментальної тварини, у якому помітні палички з капсулами (фарбування метиленовим синім);
 - в) мазок із культури спороутворюючих бактерій з центральною спорою (фарбування за Грамом);



Стрептобацила
(фарбування за Грамом)

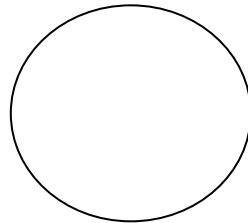


Мазок-відбиток
(фарбування метиленовим синім)



Центральна спора
(фарбування за Грамом)

2. Вивчення живильних середовищ:
 - а) колонії антракоїда на чашках Петрі з МПА.
3. Вивчення біопрепаратів для лабораторної діагностики, специфічної терапії і профілактики:
 - преципітуюча сироватка проти сибірської виразки для реакції Асколі;
 - антраксін;
 - сибірковий бактеріофаг;
 - імуноглобулін проти сибірки;
 - вакцина проти сибірки СТІ.
4. Самостійна робота студентів:
 - а) приготування мазків із культури антракоїда, фарбування їх за Грамом і замалювання.



5. Вивчення схем лабораторної діагностики сибірки.

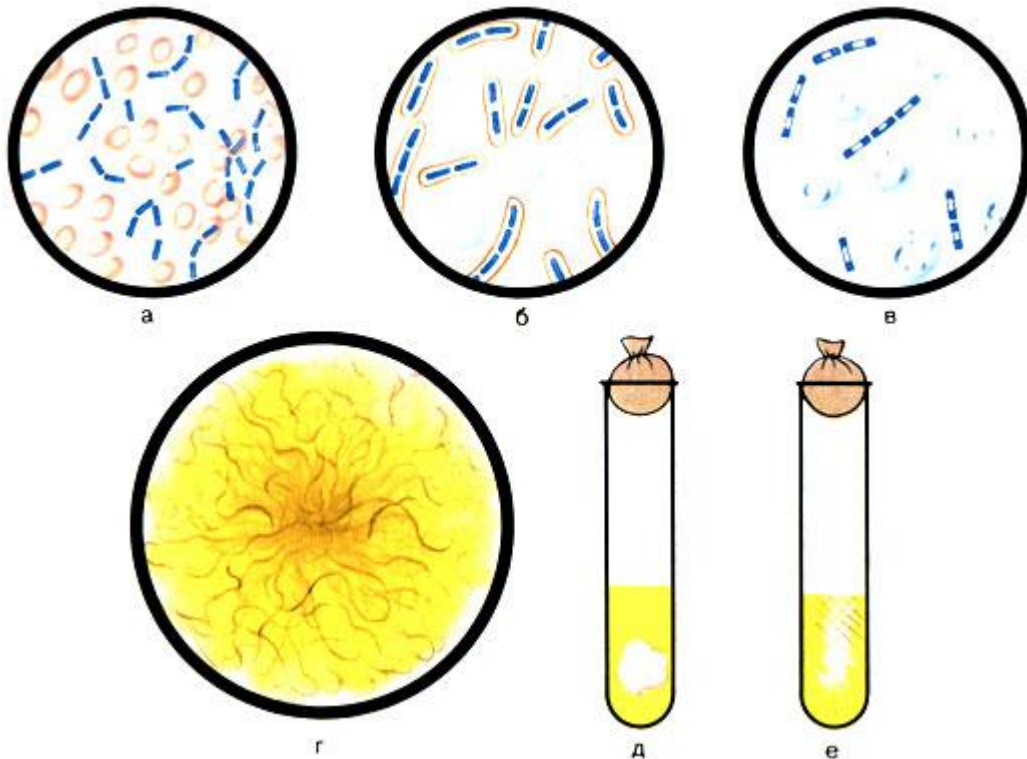
ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Збудник сибірки

Збудник сибірки *Bacillus anthracis* входить до родини *Bacillaceae*, роду *Bacillus*. Назва хвороби - "углевік" дано російським лікарем Андрієвським, який в кінці XVIII століття вивчав це захворювання в Сибіру під час великої епізоотії серед корів.

Збудник сибірської виразки був відкритий Паллендером в 1849 г. Великий внесок у вивчення цього захворювання внесли Р. Кох, Л. Пастер і Л. С. Ценковського.

Морфологія. Збудники сибірської виразки - великі палички 6-8 × 1-1,5 мкм з обрубаними або кілька увігнутими кінцями. Грамположительні. В організмі вони розташовуються попарно або у вигляді коротких ланцюжків. На поживних середовищах зустрічаються довгі ланцюжки. Бацили сибірської виразки і без листя. В організмі утворюють капсулу, навколишню одну, дві особини або весь ланцюжок. Бацили сибірської виразки утворюють суперечки овальної форми, розташовані в центрі і не перевищують діаметра мікробної клітини. Спорообразование найкраще відбувається при доступі кисню і температурі 30-40°C. При температурі вище 43°C і нижче 15°C спорообразование припиняється. В період утворення спор цитоплазма клітини майже повністю лізується, клітинна стінка розривається і суперечки виходить назовні.



Мал. Морфологічні та культуральні властивості збудника сибірки (*Bacillus anthracis*).
а - *B. anthracis* (в крові миші); б - утворення капсул; в - спори; г - зростання колоній; д - зростання культури на МПБ; е - зростання культури на желатині

Культивування. Збудники сибірської виразки - факультативні анаероби. Невиблагливі. Ростуть при температурі 35-38°C і рН середовища 7,2-7,6. На МПА утворюють великі колонії з нерівними торочкуватими краями (R-форма). Від краю колонії відходять пучки ниток. Вид колоній нагадує голову медузи або левову гриву. R-форма є характерною для вірулентних штамів сибіркових бацил. У старих культурах з'являються гладкі S-форми колоній - НЕ вірулентні.

У бульйоні ріст сибіркових бацил характеризується придонним ростом. На дні пробірки утворюється осад у вигляді грудки вати, при цьому середовище залишається прозорою.

При посіві на 10-12% желатин після 2-3-денної інкубації з'являється зростання по ходу уколу у вигляді білих тяжів, зменшуються донизу (вид перекинутої ялинки).

При посіві збудників на МПА з пеніциліном (на пластинчастому агарі) спостерігається розпад бацил на кулі, ланцюг з яких нагадує перлове намисто. Характер зростання на середовищах має діагностичне значення.

Ферментативні властивості. Сибіреязвенние бацили мають виражену ферментативну активність. Сахаролитические властивості: розщеплюють глюкозу, лактозу, мальтозу, левулезу і інші цукру до утворення кислоти.

Протеолітичні властивості виражаються в пептонізації молока, розрідженні желатину, згортання молока (повільно). Вони утворюють сірководень і аміак, переводять нітрати в нітроти, гідролізують крохмаль та ін. Не гемолізує еритроцити. Лизируются протисибіркових фагом. Бацили сибірки утворюють ферменти: діастазу, пероксидазу, ліпазу.

Токсинутворення. *V. anthracis* утворює токсин - протеїновий комплекс, що містить набряклий і летальні фактори. Цей токсин називають "мишачий токсин" (зважаючи на високу чутливості мишей). Велика роль в вірулентності сибіркових бацил належить капсулі, яка пов'язана з токсичною речовиною.

Антигенна структура. Бацили сибірської виразки містять два антигени: 1) соматичний (полісахаридних), який знаходиться в клітинній стінці мікроба. Термостійкий. Проти цього антигену антитіла не продукуються. Цей антиген довго зберігається в культурах і трупному матеріалі. На його виявленні заснована реакція преципітації Асколі; 2) капсульний (протеїновий) антиген, що обумовлює антифагоцитарної дію.

Перебуваючи в організмі або на середовищах, що містять екстракти тканин, бацили сибірської виразки виробляють протективний термолабільних антиген, який є атоксичним, але володіє імунізующою здатністю.

У сибіркових бацил є загальний антиген з антракоїдів і іншими спороутворюючими сапрофіти (*B. subtilis*, *B. cereus* та ін.).

Стійкість до факторів навколишнього середовища. Вегетативні форми збудників сибірської виразки малостійкі. При 100°C вони гинуть миттєво, температура 55-60°C губить їх через 30-40 хв. Звичайні концентрації дезінфікуючих розчинів вбивають їх через кілька хвилин. Капсули сибіркових бацил володіють великою стійкістю. При дослідженні трупів тварин, підданих дії гнильної мікрофлори, можна виявити порожні капсули (тіні). Спори стійкі: вони витримують кип'ятіння протягом 15-20 хв. Автоклавирование (120°C) вбиває їх через 20 хв. До низьких температур не чутливі. У сухому стані зберігаються до 30 років, в ґрунті - десятиліття.

Звичайні розчини дезінфікуючих речовин гублять їх через 2-3 доби.

Сприйнятливість тварин. До сибірковим бацили чутливі корови, вівці, коні, олені, свині. Заражаються вони один від одного харчовим шляхом, поглинаючи з кормом спори збудника.

З лабораторних тварин найбільш сприйнятливі білі миші, морські свинки, кролики. Ці тварини після зараження гинуть через 2-4 діб від септицемії. На місці введення спостерігаються набряк і гіперемія. Кров у загинув тварин густа і темно-червоного кольору, так як сибіреязвенние бацили мають антикоагулюючим дією.

Джерела захворювання. Хворі тварини.

Шляхи передачі. Контактно-побутовий, повітряно-пилевої, харчової (при використанні продуктів, заражених бацилами сибірської виразки).

Людина від людини зазвичай не заражається, проте при захворюванні людини на сибірку вживаються всі необхідні заходи обережності.

Патогенез. Вхідними воротами є шкіра і слизові оболонки дихальних шляхів і травного тракту. Залежно від локалізації розрізняють шкірну, легеневу і кишкову форми. Кожна форма може генералізуватися.

Шкірна форма - в місці проникнення з'являється почервоніння, що переходить в папулу (сверблячу). Папула мідно-червоного кольору переходить в везикулу з серозно-геморагічним вмістом, після підсихання утворюється чорний струп (углевик).

Легенева форма - розвивається специфічна пневмонія, що протікає по типу набряку легенів. Зазвичай закінчується летально.

Кишкова форма - всі вищеописані явища розвиваються в слизовій кишечника. Зазвичай закінчується летально.

Імунітет. Досить стійкий, антимікробний і антитоксичний. Залежить від освіти протективний антитіл. Велика роль належить фагоцитарної реакції. У сироватці перехворіли на сибірку виявляються антитіла, що руйнують капсульну субстанцію бацил.

При сибірку розвивається гіперчутливість, що реєструється в алергічної пробі з антраксином.

Профілактика. Всі заходи щодо попередження сибірської виразки проводять спільно з ветеринарною службою Вони передбачають своєчасне виявлення, ізоляцію хворих тварин, ретельну дезінфекцію території.

Специфічна профілактика. В даний час використовують вакцину СТІ, яка була виготовлена в 1942 р. Н. Н. Гінсбурга з бескапсульної культури. Вакцинують зазвичай людей, які за характером своєї роботи пов'язані з сільськогосподарськими тваринами. Для екстреної профілактики (людям, які контактували з хворими) вводять протівосібіреязвенний імуноглобулін і антибіотики.

Лікування. Протівосібіреязвенний імуноглобулін, антибіотики: пеніцилін, стрептоміцин, тетрациклін.

Мікробіологічна діагностика сибірки

Матеріалом для мікробіологічної діагностики є вміст карбункула при шкірній формі сибірки, кал при кишковій формі, мокротиння при легеневій формі, кров при септичній формі.

Можна досліджувати також різні об'єкти зовнішнього середовища (вода, ґрунт), сировину тваринного походження, продукти харчування.

Мікробіологічну діагностику сибірки проводять мікроскопічним, бактеріологічним, біологічним, алергологічним методами. Крім того, при дослідженні трупного матеріалу, шкіри, волосся ставлять реакцію термопреципітації Асколі для виявлення антигену С мікробів.

Мікроскопічний метод. З матеріалу, який досліджують, готують мазки, фіксують над полум'ям й фарбують за Грамом та Романовським. Виявлення в мазках великих грампозитивних оточених капсулами (іноді одна капсула на 2-3 мікробні клітини) паличок з обрубленими кінцями, розташованих парами й ланцюжками, дає підставу для постановки орієнтовного діагнозу.

З метою прискореної індикації збудника використовують РІФ при якій з взятих проб готують мазки, фіксують їх й оброблюють люмінесціюючою сироваткою. Через 15-20 хвилин препарат промивають водою, висушують і мікроскопують у люмінесцентному мікроскопі. При виявленні специфічного свічення мікробів ставлять попередній діагноз сибірки.

Бактеріологічний метод. Є основним. Матеріал для дослідження засівають на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром. Якщо досліджують кров, то її попередньо засівають у м'ясо-пептонний бульйон і витримують у термостаті протягом 18-24 годин при температурі 37°C. У бульйоні збудник сибірки росте, утворюючи осад у вигляді шматочків вати, бульйон при цьому залишається прозорим. На МПА утворює R-форми колоній: матові великі шорсткуваті колонії з нерівним краєм, які під мікроскопом виглядають як локони чи левина грива. З однієї частини такої підозрілої колонії готують мазок, фарбують за Грамом, мікроскопують. Другу частину пересівають на скошений агар для одержання великої кількості чистої культури

мікробів. Через добу інкубації в термостаті, мікроби, що вирости на скошеному агарі перевіряють на чистоту і продовжують ідентифікувати шляхом вивчення біохімічних властивостей (розщеплюють глюкозу, лактозу, мальтозу до кислоти без газу, розріджують желатин), властивості лізувати еритроцити, чутливості до бактеріофагу сибірки, постановки проби з пеніциліном (на агарі з пеніциліном через 3 години росту бацили розпадаються на окремі кульки, які при мікроскопії визначаються як феномен «перлового намиста»).

Під час проведення бактеріологічного методу обов'язкова перевірка виділеної чистої культури мікробів на патогенність для лабораторних тварин, тому що в природі є лжепалички сибірки, антракоїди, дуже схожі за багатьма ознаками на *Bacillus anthracis*, але не патогенні для тварин і людини.

Біологічний метод. Готують емульсію матеріалу, який досліджують, у стерильному фізіологічному розчині і вводять підшкірно білим мишам, морським свинкам чи кроликам. У разі наявності в матеріалі *B. anthracis*, миші і морські свинки гинуть через 24-36 годин, кролики - через 48-72 години. Під час розтину тварин, що загинули, виявляють збільшені, внаслідок застою крові, органи. Особливо різко змінена селезінка. У мазках з органів й крові виявляють палички сибірки з добре вираженою капсулою.

Біологічний метод дозволяє прискорити діагностику. Його використовують також у тих випадках, коли матеріал для дослідження сильно забруднений сторонньою мікрофлорою, особливо гнилісною.

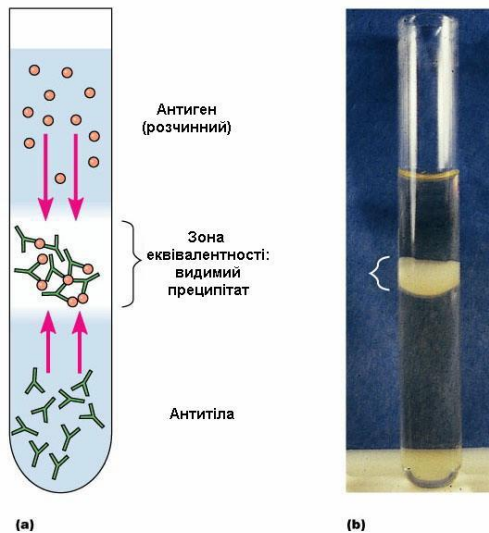
Алергологічний метод. Для діагностики свіжих випадків сибірки застосовується специфічний препарат – антраксин, з яким ставлять внутрішньошкірну алергічну пробу на долонній поверхні передпліччя. У разі позитивної реакції через 24 години в місці введення антраксину з'являється гіперемія й інфільтрат, розміром більш ніж 15 мм. Проба може бути позитивною вже на першому тижні захворювання й довго тримається після перенесення захворювання, тому вона може використовуватися для ретроспективної діагностики.

Ознаки B. anthracis , псевдосибіркових мікробів та антракоїдів

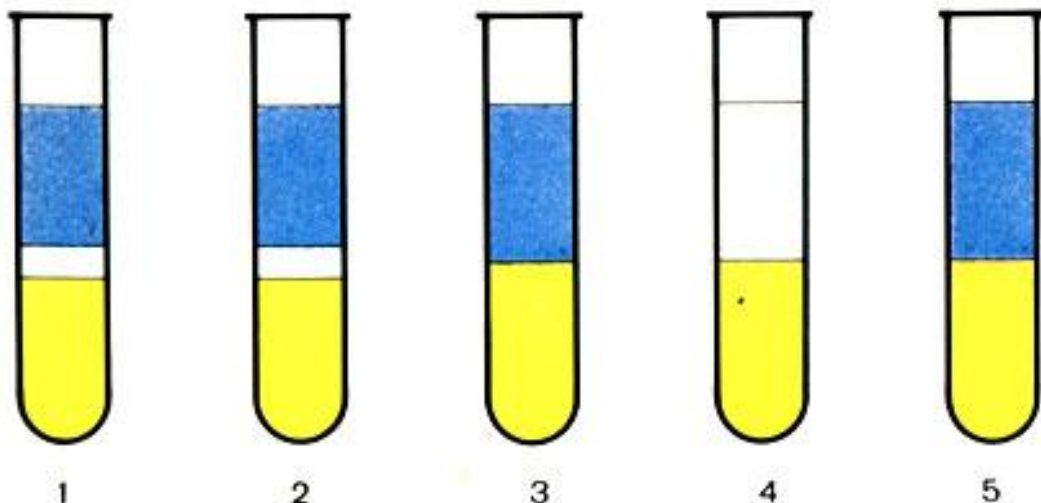
Назва мікроба	Рухливість	Капсула	Ріст в бульйоні	Гемоліз	Лакмусова сироватка	Патогенність для тварин
<i>B. anthracis</i>	-	+	у вигляді шматочків вати на дні (бульйон лишається прозорим).	-	червоніє	патогенна
<i>B. pseudoanthracis</i>	слабка	-	У бульйоні утворюється каламуть, на дні крихтоподібний осад, плівка на поверхні	+	синіє	у великих дозах інколи патогенна для мишей
<i>B. anthracoides</i>	слаба	-	бульйон каламутніє, на дні крихтоподібний осад, плівка на поверхні	+	синіє	у великих дозах інколи патогенна для мишей

B. subtilis	+	-	плівка на поверхні, середовище каламутне	-	синіє	не патогенна
-------------	---	---	--	---	-------	--------------

Реакція термореципітації Асколі. Використовують для виявлення термостабільного антигену збудника в різних об'єктах тваринного походження (вовна, шкіра й ін.). Антиген витягають кип'ятінням досліджуваного субстрату у фізіологічному розчині з наступним фільтруванням.



У пробірки малого діаметра вносять 0,5 мл преципітуючої сибіркової сироватки, а потім обережно по стінці пробірки пастерівською піпеткою нашаровують на неї 0,5 мл отриманого екстракту з дослідного матеріалу. Якщо в отриманому екстракті є антиген сибірки, то на межі двох рідин через 2-5 хвилин утвориться кільце преципітату білуватого кольору. Реакція Асколі відрізняється високою чутливістю.



- Мал. Реакція Асколі. 1 - Преципітуючих сироватка + досліджуваний термоекстракт;
 2 - Преципітуючих сироватка + стандартний сибіреязвенний антиген (контроль);
 3 - Преципітуючих сироватка + антиген з вовни здорової тварини (чужорідний антиген);
 4 - Преципітуючих сироватка + ізотонічний розчин хлориду натрію;
 5 - нормальна сироватка + випробуваний антиген

Постановка реакції: 1-я пробірка - преципітуючих сироватка + досліджуваний термоекстракт; 2-я пробірка - преципітуючих сироватка + стандартний сибіреязвенний антиген (контроль); 3-тя пробірка - преципітуючих сироватка + термоекстракт з вовни здорової тварини (контроль).

При позитивній реакції в перших двох пробірках утворюється преципітаційне кільце, в третій - кільце відсутній.

Теоретичні питання:

1. Збудник сибірки (*Bacillus anthracis*).

Властивості. Резистентність. Епідеміологія.

Патогенез, клінічні особливості сибірки.

Патогенність для людини і тварини. Фактори патогенності, токсини.

2. Мікробіологічна діагностика.

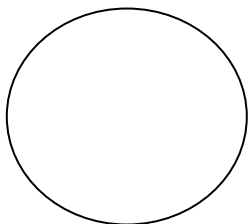
3. Специфічна профілактика і лікування сибірки.

Протокол № 16

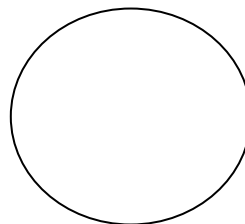
Тема: Мікробіологічна діагностика сифіліса.

Мета: Вивчення методів мікробіологічної діагностики, терапії і профілактики сифіліса.

1. Мікроскопія і замалювання демонстраційних препаратів: бліда спірохета у мазку , (фарбування сріблом за Морозовим та за Буррі).



Treponema pallidum
(фарбування за Морозовим)



Treponema pallidum
(фарбування за Буррі)

2. Ознайомлення з інгредієнтами для постанови реакції Вассермана:

а) кардіоліпіновий антиген для реакції Вассермана;

б) гемолітична сироватка;

с) сухий комплемент

3. Вивчення схеми постанови реакції Вассермана.

Схема реакції Вассермана

Інгредієнти, мл	№ пробірки				
	1	2	3	4	5
Позитивна сироватка	0,5	-	-	-	-
Дослідна сироватка	-	0,5	-	0,5	0,5
Нормальна сироватка	-	-	0,5	-	-
Антиген	0,5	0,5	0,5	0,5	-
Комплемент	0,5	0,5	0,5	-	0,5
Фізіологічний розчин	-	-	-	0,5	0,5
Інкубація в термостаті при температурі 37° С протягом 45 хвилин					
Гемолітична система	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Облік результатів					

Заключення: _____

4. Вивчення схеми лабораторної діагностики сифіліса (бактеріологічної і серологічної).

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Патогенні спірохети

Спірохети відносяться до сімейства Spirochaetaceae. Являють собою тонкі, покручені мікроорганізми, тіло яких складається з осової нитки і навколишнього її спиралевидної цитоплазми, що надає їм штопорообразную форму.

У ультрасрезах виявлена тришарова зовнішня мембрана. У деяких спірохет в електронному мікроскопі видно на кінцях ниткоподібні освіти. Джгутиків, капсул, суперечка вони не утворюють. Дуже рухливі. Мають чотирма видами руху: поступальний, згинальні, хвилеподібним і обертальним. Розміри спірохет коливаються від 5 до 500 мкм в довжину і 0,3-0,75 мкм завширшки.

До патогенних для людини спірохетам відносяться представники наступних пологів:

1. Treponema - збудники сифілісу і фрамбезії
2. Borrelia - збудники поворотного тифу епідемічного, ендемічного і ангіни Венсана
3. Leptospira - збудники лептоспірозів.

Морфологічно спірохети відрізняються один від одного кількістю і глибиною завитків спіралі і ставленням до фарбування. Основний метод забарвлення за Романовським - Гімзою. Цим способом краще за всіх фарбуються боррелії - в синьо-фіолетовий колір, гірше - трепонеми - в блідо-рожевий колір. Спірохети вивчають у живому стані.

Захворювання, що викликаються спірохетами, називаються спірохетози. Характерним для клініки спірохетозів є циклічність перебігу.

Збудник сифілісу

Збудник Treponema pallidum входить до родини Spirochetaceae, роду Treponema (від лат. trego - повертати, пето - нить).

T. pallidum відкрита Ф. Шаудином в 1905 г. Великий внесок у вивчення сифілісу внесли І. І. Мечников, П. Ерліх, Д. К. Заболотний та ін.

Морфологія. T. pallidum - спиралевидная нитка розміром 8-18 × 0,08-0,2 мкм з дрібними, рівномірними завитками. Число завитків 12-14. Кінці трепонеми загострені або закруглені. Трепонеми рухливі. Мають чотирма видами руху. За Романовським-Гімзою фарбуються в блідо-рожевий колір, тому вони називаються T. pallidum - бліда трепонема. Погане фарбування пояснюється малим вмістом нуклеопротеїдів. Спірохети можна виявляти в препаратах, забарвлених за Буррі, сріблення. Крім того, їх вивчають у живому стані - в темному полі.

Збудники сифілісу суперечка і капсул не мають.

Культивування. Блідітрепонеми дуже вимогливі до живильних середовищ. На штучних поживних середовищах вони ростуть тільки в присутності шматочків мозку або нирок кролика і асцитичної рідини. Ростуть повільно, 5-12 днів при температурі 35-36°C в анаеробних умовах. Блідітрепонеми добре розмножуються в курячому ембріоні (поперечним поділом). При вирощуванні на штучних поживних середовищах трепонеми втрачають вірулентність. Такі культури називаються культуральними. Культури, вирощені в курячому ембріоні, називають тканинними. Вони зазвичай зберігають вірулентність.

Ферментативними властивостями трепонеми не володіють. Однак культуральні штами розрізняються між собою за здатністю утворювати індол і сірководень.

Токсинутворення. Не встановлено.

Антигенна структура. Бліда трепонема містить кілька антигенних комплексів: полісахаридних, ліпідний і протеїновий. Серогрупи і серовар не встановлені.

Стійкість до факторів навколишнього середовища. Бліді трепонеми малостійкі. Температура 45-55°C губить їх через 15 хв. До низьких температур вони стійкі. При заморожуванні зберігаються до року. Спірохети чутливі до солей важких металів (ртуті,

вісмуту, миш'яку та ін.). Звичайні концентрації дезінфікуючих речовин гублять їх протягом декількох хвилин. Вони чутливі до бензилпеніциліну, Біцилін q ін. Під впливом деяких факторів зовнішнього середовища і антибактеріальних препаратів трепонеми можуть утворювати цисти. У такій формі вони довго перебувають в організмі в латентному стані.

Сприйнятливість тварин. У природних умовах тварини сифілісом не хворіють. Однак на мавпах, як показали І. І. Мечников і Е. Ру, можна відтворити клінічну картину сифілісу: на місці введення утворюється твердий шанкр. В даний час показано, що при зараженні кроликів, морських свинок на місці введення або в іншому місці на шкірі утворюються виразки. На кроликах шляхом пасажів можна тривалий час зберігати виділений штам трепонем.

Джерела інфекції. Хвора людина.

Шляхи передачі. Контакт побутової (прямий контакт), переважно статевий шлях. Іноді сифіліс може передаватися через предмети (посуд, білизну). Від хворої сифілісом матері захворювання передається через плаценту дитині (вроджений сифіліс).

Патогенез. Вхідними воротами є слизові оболонки статевих шляхів і ротової порожнини.

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 – високовірulentний мікроорганізм. Для того щоб відбулося зараження, досить потрапити в організм людини 10-100 блідних трепонем. Вірогідність зараження зростає при повторних статевих контактах з джерелом зараження і великій кількості блідних трепонем у виділеннях сифілідів.

У місці проникнення збудник розмножується, формується первинна сифілома – твердий шанкр (від франц. *chancre* - виразка) – безболісна ерозія або виразка із 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 області 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 тій же стороні, що і шанкр, так і на протилежній. 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. *gutti* - камідь) ураження шкіри, внутрішніх органів, серцево-судинної системи, кісток. Вони характеризуються розпадом тканин. В осіб із низькою резистентністю бліда трепонема проникає у нервові волокна, де може перебувати як позаклітинно, так і всередині клітин (у цитоплазмі, ядрі). Особливістю сифілісу є відсутність скарг з боку хворого (щодо свербіжжю, 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 розміром 0,5-1 см у діаметрі (розеоли), 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 і згинальних сторонах кінцівок. Дуже характерні для сифілісу папульозні 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 трепонеми, що збереглися в організмі. Тканина в гумах розкладається, що призводить до утворення порожнини. Після загоєння гум утворюються грубі рубці. Третинний період триває роки 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 злякисний сифіліс. Сифіліс без шанкру розвивається внаслідок безпосереднього проникнення збудника у кров (під час внутрішньовенних ін'єкцій) і проявляється через 2-3 міс. у формі вторинного сифілісу. Злякисна 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 і 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 із злоякісним перебігом інфекції. Залишається високим рівень вторинного рецидивного і раннього прихованого сифілісу.

Імунітет. Природного імунітету немає. При захворюванні на сифіліс розвивається "нестерильний" інфекційний імунітет. Його називають шанкерний, так як при повторному зараженні твердий шанкр не утворюється, але всі наступні періоди розвиваються. При сифілісі виявляють IgC і IgM, а також реакіни IgE, які в присутності кардіоліпідного антигену пов'язують комплемент.

Профілактика. Санітарно-освітня робота, раннє виявлення хворих на сифіліс. Специфічна профілактика. Не розроблена.

Лікування. Пеніцилін, біцилін, біохінол q ін.

Мікробіологічна діагностика сифілісу

Матеріалом для дослідження є відокремлюване твердого шанкру чи його пунктат, пунктат лімфатичного вузла, зскрібок з роzeоли, ліквор, кров. При доборі матеріалу від хворого необхідно дотримуватися запобіжних заходів (робота в гумових рукавичках).

Мікробіологічну діагностику сифілісу проводять мікроскопічним й серологічними методами.

Мікроскопічний метод. Краплю тканинної рідини чи ексудату наносять на предметне скло і накривають покривним склом. Препарат «розчавлена крапля». Досліджують у темному полі. T. pallidum має вигляд ніжної спіралі з 8-12 завитками однакового розміру. Спірохети рухливі. Виявляють 4 види рухів: уперед, назад, обертальні і згинальні. Ці ознаки відрізняють її від сапрофітних трепонем, що можуть існувати на статевих органах і в порожнині рота.

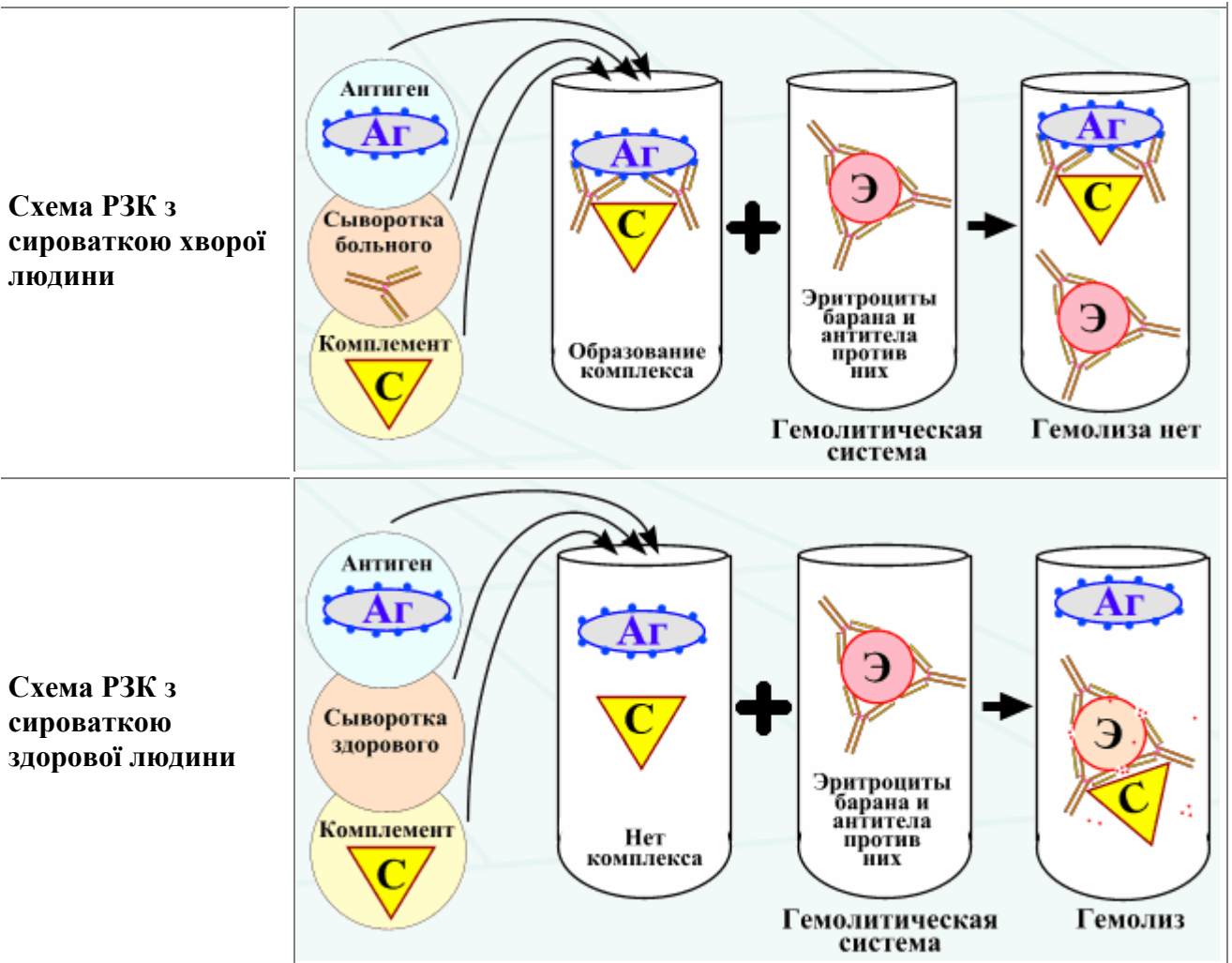
Мікроскопують також препарати з матеріалу, який досліджують, фарбуючи їх за Романовським. Спірохети за цим способом фарбування набувають блідо-рожевого забарвлення. Гарні результати дає фарбування за Бурі, сріблення за Морозовим.

Серологічний метод. Є основним методом діагностики сифілісу, тому що його можна використовувати в різні періоди захворювання, крім первинного серонегативного сифілісу. Для виявлення специфічних антитіл використовують комплекс серологічних реакцій: реакцію Васермана, реакцію мікропреципітації, реакцію іммобілізації трепонем, реакцію імунофлюоресценції. В цих реакціях використовують як специфічний трепонемний антиген,

який готують із зруйнованого ультразвуком штаму Рейтера (апатогенного культурального штаму *T. pallidum*) так і неспецифічний кардіоліпіновий антиген (екстракт із серця бика).

Реакція Васермана (RW) заснована на принципі реакції зв'язування комплементу і відрізняється від останньої тим, що при її постанові поряд зі специфічними антигенами беруть і неспецифічні.

RW буває позитивною через 2-3 тижні після появи твердого шанкру, протягом всього вторинного періоду й у 75% випадків у третинному періоді. Необхідно враховувати той факт, що досить часто реакція Васермана дає лжепозитивні результати.



У якості скринінг-тестів застосовують і реакцію мікропреципітації з плазмою крові і з інактивованою сироваткою.

Для постановки остаточного діагнозу з використанням серологічного методу ставлять одну (чи декілька) з перерахованих нижче специфічних реакцій:

- реакцію імунофлюоресценції (РІФ)
- імуноферментний аналіз (ІФА)
- реакцію іммобілізації блідих трепонем (РІБТ)
- реакцію імунного прилипання (РІП)
- реакцію непрямої гемаглютинації (РНГА)

Реакція імунофлюоресценції. Для РІФ, що ставиться в непрямому варіанті, як антиген використовують штам Ніколса (тканинна культура блідої трепонеми від інфікованого кролика).

Імуноферментний аналіз. Знаходить все більше застосування в діагностиці сифілісу. Налагоджено випуск діагностичних тест-систем.

Реакція іммобілізації блідих трепонем. Заснована на феномені втрати рухливості блідих трепонем при дії на них сироватки крові хворого в присутності комплементу. Трепонемі отримують з яєчка кролика, ураженого специфічним орхітом. Ця реакція має високу чутливість і залишається позитивною після одужання хворого.

Реакція імуного прилипання. Сутність цієї реакції полягає в тому, що тканинні трепонемі штаму Ніколса при змішуванні із сироваткою крові хворого сифілісом у присутності комплементу й еритроцитів людини прилипають до поверхні еритроцитів.

Реакція непрямой гемаглютинації. Широко використовується в діагностиці сифілісу завдяки простоті постановки. Вона буває позитивною через 3 тижні після інфікування й залишається такою через багато років після одужання.

Теоретичні питання:

1. Збудник:

Властивості. Резистентність.

Патогенність для людини і тварини. Фактори патогенності, токсини.

Патогенез захворювання у людини, імунітет.

Мікробіологічна діагностика.

Специфічна профілактика і лікування.

2. Мета постанови реакції Вассермана.

3. Діагностична цінність реакції Вассермана і осадкових реакцій.

4. Механізм реакції Вассермана.

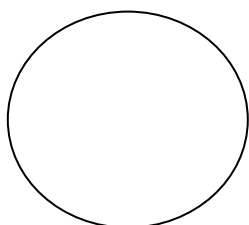
5. Особливості імунітета при сифілісі.

Протокол № 17

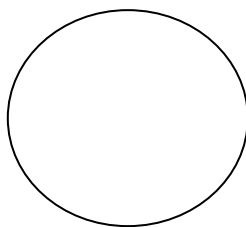
Тема: Мікробіологічна діагностика лептоспірозів і бореліозів.

Мета: Вивчення методів мікробіологічної діагностики, терапії і профілактики захворювань, викликаних лептоспірами і бореліями.

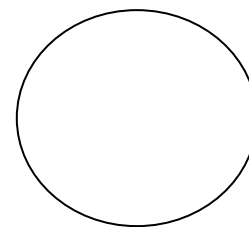
1. Мікроскопія і замалювання демонстраційних препаратів: лептоспіра у мазках, фарбованих за Буррі і за Романовським-Гімзою, спірохети роду борелія – товста крапля крові хворого на поворотний тиф.



Leptospira
(фарбування за Буррі)



Leptospira
(фарбування за Романовським-Гімзою)



Borrelia recurrentis
(фарбування за Романовським-Гімзою)

2. Вивчення біологічних препаратів для специфічної профілактики лептоспірозів:

- лептоспірозна вакцина;
- лептоспірозний полівалентний імуноглобулін;

3. Вивчення схеми лабораторної діагностики поворотного тифу (епідемічного і ендемічного).

Захворювання	Дослідження	Матеріал для дослідження	Терміни проведення дослідження
Епідемічний тиф	Мікроскопія 1. Препарат роздавленої краплі в темному полі зору 2. Перегляд мазків і товстої краплі, пофарбованих фуксином 3. Препарати за Буррі	Кров	Під час лихоманкового періоду
	Серологічне дослідження Реакція Брусіна-Риккенберга	Сироватка хворого	З 2–3 тижня
Ендемічний тиф	Мікроскопія 1. Препарат роздавленої краплі в темному полі зору 2. Перегляд мазків і товстої краплі, пофарбованих фуксином	Кров	Протягом хвороби
	Біологічна проба Зараження морських свинок	Кров	Протягом хвороби

4. Вивчення схеми лабораторної діагностики лептоспірозу.

Метод дослідження	Матеріал для дослідження	Терміни проведення дослідження
Мікроскопія Препарат роздавленої краплі в темному полі зору, або мазки, пофарбовані за Романовським-Гімзою	Кров	1-3 день з початку хвороби
Бактеріологічне дослідження Посів на середовище Уленгута	Кров, сеча	З 7-го дня і до 3-х місяців
Серологічне дослідження Реакція мікроаглютинації–лізиса з живими культурами лептоспир Реакція зв'язування комплементу	Сироватка хворого	З 6-го дня хвороби
Біологічна проба (при жовтушному лептоспирозі) Внутрішньочеревинне зараження морської свинки	Кров	У перші дні хвороби

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Збудники поворотного тифу

Збудники поворотного тифу відносяться до сімейства Spirochaetaceae, роду Borrelia.

За характером переносника поворотний тиф поділяють на епідемічний, що передається вошами, і ендемічний, переносниками якого є кліщі.

Борелії зворотних тифів відрізняються від інших спірохет тим, що мають великі, нерівномірні завитки і добре фарбуються аніліновими фарбами, в тому числі за Романовським-Гімзою в фіолетовий колір.

Збудником епідемічного поворотного тифу є *Borrelia recurrentis*, а збудниками ендемічного поворотного тифу – *Borrelia duttonii*, *Borrelia caucasica* й ін. Збудники хвороби Лайма *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia garinii* і *Borrelia afzelii* входять до родини Spirochaetaceae, роду Borrelia.

Епідемічний поворотний тиф

Збудники епідемічного (вошивого) поворотного тифу описані були О. Обермайєр в 1868 р.

Морфологія. *Borrelia recurrentis* є спиралевидною нитка з 5-8 неоднаковими завитками і загостреними кінцями. Розміри їх 10-18 × 03-05 мкм. Вони володіють всіма чотирма видами руху, властивими спірохетам.

Культивування. На штучних поживних середовищах ростуть тільки в присутності сироватки або асцитичної рідини, тканин або органів тварин. Ростуть вони повільно, 7-12 днів, в анаеробних умовах при температурі 30-35°C і рН середовища 7,2-7,4. У рідких середовищах, навіть при рясному розмноженні, видимого росту немає. В останні роки боррелії культивують в курячому ембріоні.

Ферментативними властивостями боррелії не володіють.

Токсинутворення. Утворюють ендотоксин (маловивчений).

Антигенна структура. Маловивчений.

Стійкість до факторів навколишнього середовища. Борелії дуже чутливі до високих температур: 45-50°C інактивують їх через 30 хв, при 0°C зберігаються протягом декількох діб. До низьких температур вони більш стійкі. При заморожуванні зберігаються кілька місяців. При висушуванні гинуть швидко. Звичайні концентрації дезінфікуючих речовин гублять їх через кілька хвилин.

Сприйнятливість тварин. У природних умовах тварини не хворіють поворотним тифом. В експериментальних умовах насилу вдається заразити *Borrelia recurrentis* мавп, білих мишей, хом'яків.

Джерела інфекції. Хвора людина.

Переносники. Воші, які залишаються заразними протягом усього життя (30-40 днів); трансоваріально потомству боррелії не передаються.

Механізм зараження. Воша, насмоктавшись крові хворого, стає заразною через 5-7 днів. За цей час спірохети з кишечника воші проникають в гемолімфу, де накопичуються. При расчесах людина пошкоджує тіло воші і втирає гемолімфу в місце расчеса.

Патогенез. У 1874 р. Г. Мінх, а в 1881 р. І. І. Мечников в дослідях на собі довели, що збудники поворотного тифу циркулюють в крові (заражали себе кров'ю хворого).

Потрапивши із зараженою лімфою в організм людини, боррелії розмножуються в клітинах системи макрофагів, потім потрапляють в кров. Виникає перший гарячковий напад хвороби. У крові хворого накопичуються антитіла - спірохетолізіни, які лизують боррелії. Утворився при цьому ендотоксин викликає явища інтоксикації - температуру та інші функціональні розлади. Але частина боррелії, що знаходяться в глибині тканин, зберігаються, розмножуються і дають нове покоління боррелії, що не чутливі до наявних лізину. При виході їх в кров починається другий напад захворювання. В організмі утворюються лізину, що розчиняють другу генерацію боррелії. Таких нападів буває кілька (3-5). Зазвичай кожен наступний напад коротшим від попереднього, а інтервали між ними (апірексія) довше. Одужання настає після повного лізису всіх з'явилися різновидів боррелії.

У хворих поворотним тифом ще спостерігається феномен тромбоцитобарії - в капілярах внутрішніх органів тромбоцити адсорбуються на поверхні спірохет, утворюється агрегат "спирохет і тромбоцитів". Цей агрегат порушує місцевий кровообіг, а боррелії втрачають рухливість.

Імунітет. Характеризується наявністю антитіл: спірохетолізінов, аглютиніни, тромбоцитобарінов. Однак він нестійкий.

Профілактика. Боротьба з педикульозом, поліпшення санітарно-гігієнічних умов. Специфічна профілактика не розроблена.

Лікування. Тетрациклін, пеніцилін, левоміцетин і миш'яковисті препарати.

Ендемічний поворотний тиф

Збудниками ендемічного поворотного тифу є кілька видів: *B. persica*, *B. duttonii* й ін. *B. duttonii* були виявлені в крові хворого Ф. Россом в 1904 р.

Морфологія. Борелії кліщового возвратного тифу подібні зі збудниками епідемічного поворотного тифу.

Культивування. *B. duttonii* можна культивувати на спеціальних середовищах. Вирощують їх при температурі 30-35°C і рН середовища 7,2-7,4 в анаеробних умовах.

Ферментативні властивості. Чи не виявлені.

Антигенна структура. Існують кілька варіантів боррелій, які можна диференціювати, використовуючи біологічний метод.

Стійкість до факторів навколишнього середовища. Така ж, як у збудників епідемічного поворотного тифу.

Сприйнятливість тварин. Хворіють гризуни: миші, хом'яки, піщанки. З експериментальних тварин чутливі морські свинки, щури і білі миші.

Джерела інфекції. Джерелом і природним вогнищем є гризуни: миші, хом'яки, піщанки і кліщі роду *Ornithodoros*. У тілі кліщів боррелії зберігаються довічно і передаються трансоваріально.

Шляхи передачі. Трансмісивний. Людина заражається при укусі кліща, в слині якого знаходяться боррелії. На місці укусу утворюється папула.

Патогенез. Подібний до патогенезу епідемічного поворотного тифу, але кількість нападів більше. Клінічно захворювання протікає легше.

Імунітет. В ендемічних осередках імунітет набувається в ранньому дитинстві і обумовлюється наявністю спірохетолізину і інших антитіл. Хворіють в основному приїжджі. Після перенесеного захворювання імунітет нестійкий. Перехресного імунітету з епідемічним поворотним тифом немає.

Профілактика. Знищення гризунів і комах. Для кожного природного вогнища характерний свій вид збудника. Специфічна профілактика не розроблена.

Лікування. Антибіотики: тетрациклін, пеніцилін, левоміцетин та ін.

Мікробіологічна діагностика поворотних тифів, хвороби Лайма

Матеріалом для дослідження є кров хворого. У період ремісії можна брати й кістковий мозок. Використовують методи мікробіологічної діагностики: мікроскопічний, серологічний, біологічний.

Оскільки збудники хвороби Лайма відсутні в периферичній крові, для діагностики цього захворювання використовують лише серологічний метод.

Мікроскопічний метод. Готують мазок крові чи препарат «товста крапля». Висушені мазки не фіксують, а фарбують за Романовським. Під мікроскопом на тлі клітинних елементів крові виявляють синьо-фіолетового кольору ниткоподібні спірално вигнуті борелії, розміром від 5 до 20 мкм. Ці мікроорганізми мають 3-8 іноді до 10-12 завитків. Характерною рисою є те, що завитки нерівномірні, можуть бути глибокими і дрібними.

Збудника легко можна виявити шляхом мікроскопії препарату «висяча крапля» у темному полі. Борелії дуже рухливі: можуть робити згинальні, обертальні, поступальні рухи. Варто пам'ятати про те, що спірохетемія найбільш виражена в початковому періоді підвищення температури тіла. Для діагностики кров у хворого забирають в період апірексії з ліктьової вени (2-3 мл). Кров центрифугують й в осаді шукають борелії.

Мікроскопічний метод є основним у діагностиці зворотних тифів.

Серологічний метод. Антитіла до борелій визначають у реакції зв'язування комплементу, реакції Рікенберга-Брусіна (навантаження борелій тромбоцитами), РІФ (непряма), ІФА.

Постановка й облік реакції Рікенберга-Брусіна. Сироватку обстежуваного змішують з цитратною плазмою здорової морської свинки у рівних об'ємах. До трьох об'ємів суміші додають один об'єм культури борелій. Суміш перемішують у центрифужній пробірці й ставлять у термостат на 15 хвилин. Потім беруть піпеткою краплю з дна пробірки, наносять її на предметне скло й досліджують у темному полі. При наявності в сироватці хворого специфічних антитіл, тромбоцити морської свинки адсорбуються на поверхні тіла борелій й останні втрачають рухливість.

Біологічний метод. Морській свинці вводять 1-3 мл крові хворого. При наявності в ній збудників кліщового поворотного тифу тварина хворіє й в її крові знаходять борелії. Цей метод дозволяє відрізнити епідемічний поворотний тиф від ендемічного кліщового поворотного тифу. Морські свинки не чутливі до збудника ендемічного поворотного тифу.

Збудники лептоспірозів

Збудник *Leptospira interrogans* входить до родини Spirochaetaceae, роду *Leptospira*. Відкрито в 1915 р. японськими дослідниками Инада і Ідо. До роду *Leptospira* відноситься група мікроорганізмів, що викликають захворювання у тварин і людини.

Морфологія. Лептоспіри - спіралеподібні нитки, довжиною 6-20×0,1-0,25 мкм. Мають численні (12-18) дрібні, тісно прилягають один до одного завитки. Кінці спіралей загнуті у

вигляді гачків. Існують і безкрючкові штами. Лептоспіри дуже рухливі. Мають всі форми руху.

Вони погано фарбуються аніліновими барвниками, тому з метою виявлення їх в патологічному матеріалі та в культурах використовують метод мікроскопії живих лептоспір в темному полі або метод сріблення - при цьому способі вони забарвлюються в коричневий колір.

Культивування. Лептоспіри строгі аероби. Розмножуються з рідких і напіврідких поживних середовищах, що містять сироватку кролика, при температурі 28-30°C і рН середовища 7,2-7,4. Ростуть повільно (7-10 днів). Середовища при розмноженні лептоспір залишаються прозорими. Зростання визначають по опалесценції або при мікроскопії препаратів в роздавленою краплі (в темному полі). Лептоспіри можна вирощувати і на щільних поживних середовищах, що містять кролячу сироватку. Зростання з'являється на 5-7-й день. При вирощуванні лептоспір на штучних поживних середовищах вони втрачають вірулентність.

Ферментативні властивості. У лептоспір виявлені ферменти: каталаза, оксидаза, ліпаза та ін.

Токсинутворення. Наявність ендотоксину у лептоспір не доведена.

Антигенна структура. Антигенну структуру лептоспір вивчають в реакції мікроаглютинації з монорецепторними сироватками. На підставі цієї реакції лептоспіри ділять на 19 сіро груп і 169 сероварів. Кожна серогрупи і серовар мають назву.

Стійкість до факторів навколишнього середовища. Лептоспіри чутливі до високих температур: 56°C губить їх через 30 хв. При низьких температурах (- 70-80°C) вони довго зберігаються. Лептоспіри дуже чутливі до висихання. Вони чутливі до дії кислот, жовчі. Звичайні концентрації дезінфікуючих речовин гублять їх через кілька хвилин.

У воді лептоспіри виживають до двох місяців, в молочних продуктах, хлібі - кілька годин.

Сприйнятливості тварин. Найбільш сприйнятливі до лептоспір гризуни, але хворіють парнокопитні, велика і дрібна рогата худоба, свині, собаки і навіть хижі тварини. У тварин захворювання протікає зазвичай в хронічній формі.

З експериментальних тварин найбільш чутливі до лептоспір морські свинки, золотисті хом'яки. Однак викликати у них захворювання можуть тільки деякі серовар лептоспір. У гризунів захворювання протікає теж в хронічній формі і лептоспіри виділяються з сечею.

Джерела інфекції. Джерелами зараження є хворі тварини - сільськогосподарські і гризуни (в основному щури). Вони інфікують сечею навколишнє ґрунт, відкриті водойми (річки, ставки, колодязі). Крім того, вони заражають харчові продукти.

Шляхи передачі. Контактного-побутового (при купанні та виконанні різних робіт в воді, зараженої лептоспірозом хворих тварин; при догляді за хворими тваринами), харчової (через воду і харчові продукти).

Патогенез. Вхідними воротами є пошкоджена шкіра і неушкоджені слизові оболонки рота, очей і шлунково-кишкового тракту. Первинний афект на шкірі і слизових оболонках не утворюється. Лептоспіроз протікають в жовтушною і безжовтушною формі. Проникнувши в організм, лептоспіри через лімфатичні шляхи проникають в кров, де циркулюють. З потоком крові вони проникають в паренхіматозні органи і локалізуються в печінці та нирках. До цього часу утворюються антитіла, що руйнують лептоспіри.

У процесі розпаду лептоспір виділяється токсична речовина, яка призводить до явищ інтоксикації і крововиливів в паренхіматозних органах. У важких випадках розвивається жовтяниця і гостра ниркова недостатність (нефрит) у людини і у чутливих до лептоспір тварин.

При легких формах перебігу ураження паренхіматозних органів виявляються тільки при спеціальних методах дослідження.

Імунітет. Пов'язаний з утворенням агглютинінів і спірохетолізінів, максимальна концентрація яких досягається на 3-4 тижні (антитіла бувають у високих титрах 1:1000 і вище). Імунітет зберігається тривалий час.

Профілактика. Боротьба з гризунами, осушення боліт та інші меліоративні заходи, а також захист харчових продуктів від щурів і мишей. Сільськогосподарських тварин вакцинують.

Специфічна профілактика. Вакцинація людей, які працюють в осередку. Лептоспірозна вакцина являє собою суспензія вбитих нагріванням лептоспір декількох сероварів.

Лікування. Пеніцилін, тетрациклін, протіволептоспірозна імуноглобулін (приготований з найбільш поширених серогрупп лептоспір).

Мікробіологічна діагностика лептоспірозу

Матеріалом для дослідження є кров, сеча, спинномозкова рідина, секційний матеріал й сироватка крові хворого (для визначення титру специфічних антитіл).

В діагностиці використовують мікроскопічний, бактеріологічний, біологічний, серологічний методи.

Мікроскопічний метод. Для виявлення лептоспір готують препарат «розчавлена крапля» й мікроскопують у темному полі. Лептоспіри являють собою тонкі спіралеподібні мікроорганізми. Крім первинних дрібних завитків мають вторинні великі, вигнуті у вигляді латинської букви S чи C. Довжина лептоспір до 20 мкм. Ці мікроорганізми рухливі.

Мазки фарбують за Романовським, тушшю за Бурі, срібленням за Морозовим. У разі фарбування за Романовським лептоспіри набувають блідо-рожевого кольору, за Морозовим – брунатного чи майже чорного кольору, за Бурі – залишаються знебарвленими на чорному тлі. У крові лептоспіри можна знайти до 5-го дня хвороби; пізніше – у сечі, спинномозковій рідині, паренхіматозних органах.

Бактеріологічний метод. Лептоспіри культивують на поживних середовищах, що містять кролячу сироватку. Частіше інших використовують рідкі поживні середовища: Ферворта-Вольфа, Терських.

Матеріал, який досліджують, засівають у кілька пробірок з поживним середовищем й культивують при температурі 28-30°C.

Особливістю культуральних властивостей лептоспір є те, що розмножуючись в поживному середовищі, вони не викликають його помутніння й повільно ростуть. Тому для виявлення росту лептоспір, через кожні 10 днів беруть з пробірки матеріал, готують препарат «розчавлена крапля» і мікроскопують у темному полі. При відсутності росту протягом 3 місяців результат вважають негативним.

Для диференціації патогенних і сапрофітних лептоспір вивчають їх біологічні, культуральні й біохімічні властивості. Виділені лептоспіри ідентифікують за серогруповою приналежністю в реакції аглютинації за допомогою набору аглютинуючих сироваток.

Біологічний метод. Матеріал, який досліджують, вводять внутрішньочеревинно морським свинкам чи золотавим хом'ячкам. Золотавих хом'ячків можна заражати також підшкірно, внутрішньовенно, через скарифіковану шкіру й слизові. Через 48-72 години проводять мікроскопію черевного ексудату й крові. Продовжують спостереження за тваринами. Тварин, що полягли, розтинають та проводять подальші дослідження. Лептоспіри виявляють у печінці, нирках, легенях, наднирниках.

Серологічний метод. Антитіла в сироватці крові хворого виявляють із другого тижня захворювання. Для цього використовують реакцію мікроаглютинації – лізису, що ставлять у ряді пробірок з розведенням сироватки хворого від 1:10 до 1:1000 й стандартним набором

живих культур лептоспир. За позитивного результату, під мікроскопом (темне поле) можна побачити утворення аглютинату у вигляді павучків (клубки з лептоспир). Специфічною вважають реакцію при титрі не нижче 1:400 чи виникнення «зернистого» розпаду лептоспир. Реакції необхідно ставити повторно для виявлення наростання титру антитіл.

Теоретичні питання:

1. Збудник.

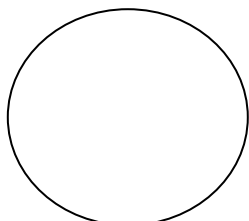
- Властивості. Резистентність.
- Патогенність для людини і тварини. Фактори патогенності, токсини.
- Патогенез захворювання у людини, імунітет.
- Мікробіологічна діагностика.
- Специфічна профілактика і лікування.

Протокол № 18

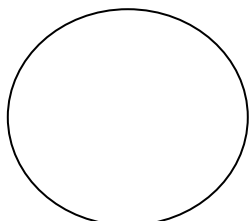
Тема: Мікробіологічна діагностика малярії.

Мета: Вивчення методів мікробіологічної діагностики малярії.

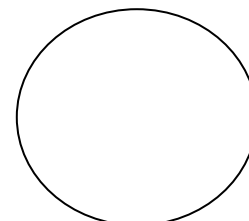
1. Мікроскопія і замалювання демонстраційних препаратів: малярійні плазмодії у мазку із крові – стадія кільця, стадія шизонта, стадія меруляції.



Plasmodium vivax
стадія кільця



Plasmodium vivax
стадія шизонта
(фарбування за Романовським-Гімзою)



Plasmodium vivax
стадія меруляції

2. Вивчення протималярійних препаратів.

Класифікація	Препарати, що впливають на шизогонію		Препарати, що впливають на спорогонію	Комбіновані
	Тканинний цикл (печінка)	Еритроцитарний цикл (еритроцит)		
	Шизотропні		Гамонтотропні	
Препарати та їх синоніми	Гістошизотропні: 1. Піріметамін (Хлоридин) 2. Прокваніл (Бігумаль) 3. Квіноцид (Хіноцид) 4. Прімаквін (Прімахін)	Гематошизотропні: 1. Піріметамін 2. Прокваніл 3. Хлорохін 4. Хінін 5. Гідроксихлорохін 6. Мефлохін (Ларіам)	1. Піріметамін 2. Прокваніл 3. Квіноцид 4. Прімаквін	1. Піріметамін+ Сульфаметазин (Метакельфін) 2. Піріметамін+ сульфадоксин (Фансідар)

3. Вивчення диференційних ознак малярійних плазмодіїв у мазку периферичної крові:

Ознака	<i>P.vivax</i>	<i>P.ovale</i>	<i>P.malariae</i>	<i>P.falciparum</i>
Еритроцити:				
Збільшення, блідо-рожеві	+	+	-	-
Овоїдні, края часто бахромчасті	-	+	-	-
Зернистість в ураженому еритроциті:				
- дрібна, обільна, червона (зерна Шюффера)	+	-	-	-
- велика, менш обільна (зерна Джеймса)	-	+	-	-
- одиничні крупні рожеві плями (зерна Мауера)	-	-	-	+
Паразит:				

Наявність усіх стадій шизогонії	+	+	+	-
Стадія кільця (кількість паразитів в еритроциті)	2-3	2-3	1	2-3
Лентоподібні форми	-	-	+	-
Округлі гамонти	+	+	+	-
Напівлунні гамонти	-	-	-	+

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Збудники малярії.

Малярія - антропоозна інфекційна хвороба, що викликається декількома видами простіших роду *Plasmodium*, передається комарами (*Anopheles*), супроводжується лихоманкою, анемією, збільшенням печінки і селезінки.

Збудники малярії відносяться до Protozoa, типу Apicomplexa, класу Sporozoa і видам *Pl. vivax*, *Pl. malariae*, *Pl. falciparum*, *Pl. ovale*.

Життєвий цикл плазмодіїв проходить в організмі комара (остаточному господарі) і організмі людини (проміжному господарі). У організмі комара відбувається статеве розмноження, або спорогонія (утворення дрібних клітин - спорозоїтів), а в організмі людини здійснюється безстатеве розмноження - шизогонія або, точніше, мерогонія, при якій утворюються дрібні клітини - мерозоїти. При укусі спорозоїти із слинних залоз комара потрапляють у кров, потім проникають в печінку, в клітинах якої здійснюється перший етап мерогонії - тканинна мерогонія (шизогонія). У клітинах печінки спорозоїт переходить в стадію тканинного шизонта, після розвитку якого настає ділення (меруляція), що завершується утворенням тканинних мерозоїтів, що поступають у кров. Мерозоїти проникають в еритроцити, в яких здійснюється декілька циклів еритроцитарної мерогонії (шизогонії). При цьому мерозоїти перетворюються на форми паразита (трофозоїти), що ростуть, в еритроциті: кільцеподібний, юний, дорослий трофозоїт. Останній ділиться і перетворюється на шизонт. З шизонтів, що діляться, утворюються мерозоїти, що упродовжуються в інші еритроцити; цей процес повторюється багато разів. У еритроцитах мерозоїти дають початок як безстатевим формам трофозоїта (агамонтам), так і статевим формам (гамонтам). Тривалість циклу розвитку у *Pl. vivax*, *Pl. falciparum*, *Pl. ovale* складає 48 год, у *Pl. malariae* - 72 год. При укусі статеві форми збудника потрапляють разом з кров'ю хворої людини в шлунок самок комарів. У комарі гамонти приступають до гаметогонії. Статеві форми дозрівають і запліднюються, утворюючи зиготу, що перетворюється на подовжену, рухому форму, - оокинету. Оокинета проникає через стінку шлунка і перетворюється на ооцисту, в якій завершується спорогонія з утворенням до 10 тис. спорозоїтів. Спорозоїти потім потрапляють через гемолімфу в слинні залози комара.

Характеристика збудників. *Pl. vivax* відкритий в 1890 р. В. Грассі і Р. Фелетті. Є збудником триденної малярії. У еритроциті при забарвленні мазка з крові за Романовським-Гімзою має форму кільця правильної форми: крупна вакуоль в центрі, облямована блакитною цитоплазмою з рубіново-червоним ядром (кільцеподібний трофозоїт). Іноді в одному еритроциті зустрічається 2-3 кільця. Напівдорослий трофозоїт має в еритроциті форму амеби з псевдоподіями. На деяких стадіях розвитку в ураженому еритроциті виявляється цегляно-червона зернистість. У стадії ділення паразита утворюється 12-24 мерозоїта.

Pl. malariae відкритий в 1880 р. А. Лавераном. Є збудником чотириденної малярії. Напівдорослий трофозоїт усередині еритроцита відрізняється від форм *Pl. vivax*, оскільки має стрічкоподібну форму і паразит ділиться на 6-12 мерозоїтів, розташованих впорядковано навколо пігменту, зазвичай у вигляді розетки.

Pl. falciparum відкритий в 1897 р. У. Уелчем. Є збудником тропічної малярії. Характерна наявність юних форм паразита у вигляді дрібних кілець в еритроциті, часто по 2-3 в одному еритроциті, а також поява в периферичній крові статевих клітин у вигляді полулуній.

Pl. ovale відкритий в 1922 р. Ж. Стівенсенем. Є збудником триденної малярії. Паразит у стадії кільця в еритроциті має крупніше ядро, ніж в кільці *Pl. vivax*. Деякі еритроцити мають овальну форму. У еритроциті виявляється зернистість. Паразит ділиться на 6-12 мерозоїтів.

Епідеміологія. На малярію хворіють сотні мільйонів чоловік, що живуть в країнах тропічного клімату, що визначає важливість проблеми завезення малярії в нашу країну.

Джерело інфекції - інвазована людина; переносник - самка комара роду *Anopheles*. Основний механізм передачі - трансмісивний, через укуси інвазованої самки комара.

Патогенез і клінічна картина. Інкубаційний період при різних формах малярії коливається від тижня до року і більш. Малярії властивий нападopodobний перебіг: озноб з сильним головним болем змінюється підйомом температури тіла до 39-40 °С і вище, після чого відбувається швидке зниження температури тіла з рясним потовиділенням і вираженою слабкістю.

Імунітет. При захворюванні формується нестійкий видоспецифічний нестерильний імунітет. Можливі повторні захворювання.

Мікробіологічна діагностика. Заснована на приготуванні мазків з крові, забарвленні їх за Романовським-Гимзою, мікроскопії і виявленні різних форм збудника; застосовують РНГА, ІФА, ДНК-гібридизацію для виявлення ДНК паразитів в крові.

Лікування і профілактика. Протималярійні препарати мають різну дію на безстатеві, статеві стадії плазмодіїв. До основних протималярійних препаратів відносять хінін, хлорохин, акрихін, прімахин, хиноцид, бігумаль, хлоридин і ін.

Профілактичні заходи направлені на джерело збудника (лікування хворих малярією і носіїв) і знищення переносників збудника - комарів. Розробляються методи вакцинації на основі антигенів, отриманих методом іншої інженерії.

Теоретичні питання:

1. Характеристика і класифікація найпростіших.
2. Структура клітин найпростіших (еукаріотів).
3. Етіологія малярії. Біологічні властивості малярійних плазмодіїв і їх диференціація за морфологічними властивостями.
4. Епідеміологія і патогенез малярії.
5. Методи мікробіологічної діагностики малярії.
6. Лікування і профілактика малярії.

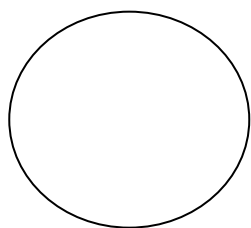
Протокол № 19

Тема: Мікробіологічна діагностика протозойних інфекцій.

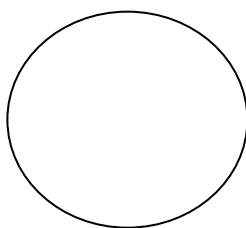
Мета: Вивчення методів мікробіологічної діагностики захворювання, викликаних трихомонадами, трипаносомами, лейшманіями, токсоплазмами, лямбліями.

1. Мікроскопія і замалювання демонстраційних препаратів:

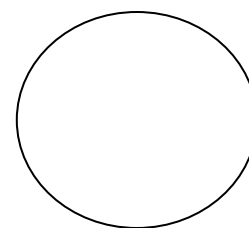
- а) лейшманії: у культурі, у тканині,
- б) токсоплазми у перитонеальному ексудаті миші,
- в) трихомонади у виділеннях із піхви,
- г) лямблії у дуоденальному вмісті,
- д) дизентерійна амеба у фекаліях хворого.



Leishmania в культурі

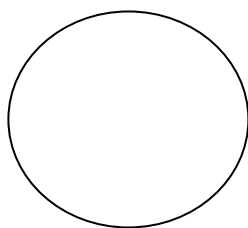


Leishmania в тканині

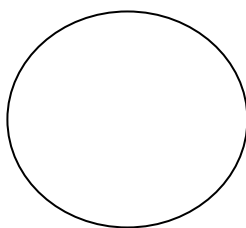


Toxoplasma

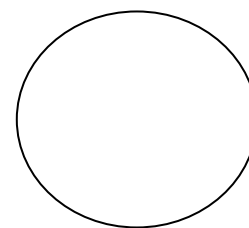
(фарбування за Романовським-Гімзою)



Trichomonas vaginalis
(фарбування метиленовим синім)



Giardia lamblia
(фарбування за Романовським - Гімзою)



Entamoeba histolytica
(фарбування залізним гематоксиліном)

2. Диференційні ознаки *Entamoeba histolytica* і *Entamoeba coli*, що мешкають у кишечнику людини (у свіжому нативному препараті):

Вид	Розмір, мкм	Цитоплазма	Ядро	Рухливість	Цисти/число ядер
<i>Entamoeba histolytica</i>: велика вегетативна форма	20-60	Ектодерма гомогенна, ендоплазма дрібнозерниста, іноді є еритроцити	Не видно	Поступова, різка, товчками	Не має
<i>Entamoeba histolytica</i>: просвітна форма	15-20	Розділення на два шари видно тільки при рухах; іноді є бактерії	Не видно	Слабо виражена	Є/1-4

Entamoeba coli	20-40	Вакуолі різного розміру; бактерії, гриби	Видно	Слабка («топтання на місте»)	Є/1-8
-----------------------	-------	--	-------	------------------------------	-------

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Морфологія простіших, особливості класифікації.

Простіші - еукаріотичні одноклітинні мікроорганізми, складові підцарство Protozoa царства тварин (Animalia). Простіші включають 7 типів, з яких три типи (Sarcomastigophora, Aricomplexa, Ciliophora) мають представників, що викликають захворювання у людини. Розміри найпростіших коливаються в середньому від 5 до 30 мкм. Простіші забарвлюються за Романовським-Гимзою (ядро - червоного, цитоплазма - синього кольору).

Збудник амєбіаза. Амєбіаз - інфекційна хвороба, що викликається *Entamoeba histolytica* та супроводжується виразковим ураженням товстої кишки; можливе утворення абсцесів в різних органах; протікає хронічно.

Збудник відноситься до Protozoa, типу Sarcomastidophora, підтипу Sarcodina. Відкритий в 1875 р. російським ученим Ф.А. Лісовиком.

Морфологія і культивування. Збудник існує в двох стадіях розвитку: вегетативній і цистній. Вегетативна стадія має декілька форм (тканинну, велику вегетативну, просвітну і передцистну). Циста (стадія, що покоїться) має овальну форму і діаметр 9-14 мкм; утворюється з вегетативних форм в кишечнику. Інфікування відбувається при попаданні цист збудника в кишечник, де з них утворюються кишкові вегетативні форми. Просвітна форма має розмір 15-20 мкм, вона пересувається поволі, мешкає в просвіті товстої кишки як нешкідливий коменсал, але за певних умов стає патогенною і перетворюється на тканинну, або інвазивну, форму. Тканинна форма має розмір біля 30 мкм і володіє рухливістю за рахунок формування псевдоподій. Вона може виявлятися в свіжовиділених фекаліях людини, проникає в стінку товстої кишки, викликає виразкові процеси, здатна фагоцитувати еритроцити (еритрофаг, або гематофаг).

Епідеміологія. Амєбіаз - антропонозне захворювання. Джерелом інвазії є людина. Механізм передачі - фекально-оральний. Зараження відбувається при занесенні цист з продуктами харчування, особливо овочами і фруктами, рідше - з водою, через предмети домашнього ужитку. Розповсюдженню цист сприяють мухи і таргани.

Патогенез і клінічна картина. Цисти, що потрапили в кишечник, і просвітні форми амєб, що утворилися, можуть мешкати в ньому, не викликаючи захворювання. При зниженні резистентності організму амєби проникають в стінку кишечника і розмножуються. Розвивається кишковий амєбіаз. Цьому процесу сприяють деякі представники мікрофлори кишечника. Вражається з утворенням виразок верхній відділ товстої кишки, іноді - пряма кишка. Спостерігається частий рідкий стілець. У випорожненнях виявляють гнійні елементи і слиз. Може відбуватися перфорація кишкової стінки з розвитком гнійного перитоніту. Амєби з током крові можуть потрапляти в печінку, легені, головний мозок - розвивається позакишковий амєбіаз. Можлива поява шкірного амєбіаза, що розвивається як результат вторинного процесу. На шкірі періанальної області, промежини і сідниць утворюються ерозії і малохворобливі виразки.

Мікробіологічна діагностика. Основним методом є мікроскопічне дослідження випорожнень хворого, вмісту абсцесів внутрішніх органів. Мазки офарблюють розчином Люголя і гематоксиліном. Серологічні дослідження (РПГА, РЗК і ін.) при амєбіазі бувають часто позитивними.

Лікування і профілактика. У лікуванні використовуються наступні препарати: що діють на амєб, що знаходяться в просвіті кишечника (похідні оксихиноліна - хиніофон, ентеросептол, мексаформ, інтестопан, а також з'єднання миш'яку - амінарсон, осарсол і ін.);

що діють на тканинні форми амеб (препарати еметіна); що діють на проясні форми амеб і амеб, що знаходяться в стінці кишки (тетрациклін); що діють на амеб при будь-якій їх локалізації (похідні імідазола - метронідазол).

Збудник токсоплазмоза. Токсоплазмоз - зоонозна інфекційна хвороба, що викликається внутрішньоклітинним паразитом *Toxoplasma gondii*, що супроводжується паразитемією, ураженням різних органів. У людини клінічні прояви поліморфні, або захворювання перебігає безсимптомно.

Збудник відноситься до Protozoa, типу Apicomplexa, класу Sporozoa. Відкритий в 1908 р. Ш. Ніколем і Л. Мансо.

Морфологія і культивування. У життєвому циклі токсоплазм розрізняють декілька морфологічних стадій. Характерну форму мають ендозоїти (трофозоїти) - апельсинова часточка або півмісяць розміром 4-7×1,5-2 мкм. При забарвленні за Романовським-Гімзою цитоплазма має блакитний колір, а ядро - рубіново-червоний. Токсоплазми культивують в курячих ембріонах і на культурах тканин, а також шляхом зараження лабораторних тварин - білих мишей і ін.

Епідеміологія. Токсоплазми поширені повсюдно. Джерелом інвазії служать багато видів домашніх і диких ссавців, а також птахи. Зараження відбувається часто в результаті споживання термічно погано оброблених продуктів (м'ясо, молоко, яйця), отриманих від тварин, заражених токсоплазмами. Остаточними господарями токсоплазм є кішки і представники сімейства котячих, що виділяють з випорожненнями ооцисти збудника. Людина, інфікована токсоплазмами, не виділяє їх в навколишнє середовище.

Патогенез і клінічна картина. У організм людини збудники потрапляють аліментарним, рідше контактним (через пошкоджену шкіру і слизисті оболонки) або повітряно-пиловим шляхом. При природженому токсоплазмозі збудник проникає в плід через плаценту.

Токсоплазми, що проникли в організм, досягають із струмом лімфи регіонарних лімфатичних вузлів, розмножуються і проникають в кров, розносяться по організму, потрапляючи в клітини ретикулоендотеліальної і центральної нервової систем, де утворюють цисти, що зберігаються десятиліттями.

Мікробіологічна діагностика. Основним в діагностиці є серологічний метод. Застосовують РІФ, РПГА, РЗК, а також реакцію Себіна-Фельдмана, або фарбувальний тест, при цьому мерозоїти збудника залежно від властивостей антитіл досліджуваної сироватки крові по-різному забарвлюються метиленовим синім. Використовують алергічний метод - постановку внутрішньошкірної проби з токсоплазміном.

Лікування і профілактика. У лікуванні застосовують хлоридин. Найбільш ефективним є застосування комбінації піриметаміна (дарапріма) з сульфаніламідними препаратами. При вагітності рекомендується замість піриметаміна застосовувати спираміцин, який не проходить через плаценту.

Збудник лямбліозу. Лямбліоз - антропонозна інфекційна хвороба, що викликається *Lambliia intestinalis* (*Giardia lamblia*) та характеризується порушенням функції тонкої кишки; часто протікає як безсимптомне носійство. Збудник відноситься до Protozoa, типу Sarcostigophora, підтипу Mastigophora (джгутиконосії), вперше описаний в 1859 р. російським ученим Д.Ф.Лямблем. Існує у вигляді вегетативної форми і цисти. Вегетативна форма грушоподібна, розміром 9-21×5-12 мкм, рухлива, має чотири пари симетрично розташованих джгутиків.

Джерелом інфекції є хворі люди і здорові носії. Зараження відбувається харчовим або водним шляхами.

Для **діагностики** проводять мікроскопічне дослідження нативних і забарвлених мазків, отриманих з випорожнень, дуоденального вмісту.

Для **лікування** застосовують метронідазол, нірідазол, акрихін і ін.

Збудник балантидіазу. Балантидіоз (дизентерія інфузорна) - зоонозна інфекційна хвороба, що характеризується виразковим ураженням товстої кишки і загальною інтоксикацією. Збудник балантидіазу *Balantidium coli* належить до Protozoa, типу Ciliophora. Паразит має вегетативну і цистну стадії розвитку. Цисти потрапляють в навколишнє середовище з фекаліями і тривало в ньому зберігаються. Зараження цистами відбувається через рот. Вегетативна стадія представлена паразитами овальної форми з віями; на кінці є щільовидний отвір - перистома з ротовим отвором - цитостомом. Паразит поширений широко, проте рідко викликає захворювання. Лікування схоже з лікуванням амебіаза.

Збудники лейшманіозів. Лейшманіози - трансмісивні захворювання людини або тварин, що викликаються лейшманіями і передаються москітами; характеризуються ураженням внутрішніх органів (вісцеральний лейшманіоз) або шкіри і слизистих оболонок (шкірний лейшманіоз).

Збудники лейшманіозів - *L. tropica*, *L. braziliensis*, *L. donovani* відносяться до Protozoa, типу Sarcostomatophora, підтипу Mastigophora - джгутиконосії.

Лейшманії мають два цикли розвитку: лейшманіальний (безджгутиковий) і лептомонадний (джгутиковий). Лейшманіальний цикл відбувається в ретикулоендотеліальних клітинах печінки, селезінки, лімфатичних вузлах і макрофагах інфікованих людей і тварин. Паразити округлої форми (2-5 мкм), без джгутиків, при забарвленні мазків за Романовським-Гімзою цитоплазма має сірувато-блакитний колір, а ядро - червонувато-фіолетовий.

У лептомонадному циклі паразити розвиваються в кишечнику москіта. Вони мають джгутик і здібні до пересування. Збудник має подовжену веретеноподібну форму, довжина його 10-20 мкм, поперечник - біля 5 мкм. Протоплазма містить ядро, цитоплазму, блефаропласт і зерна волютина. Джгутик відходить від загостреного кінця.

Епідеміологія. Основними джерелами збудників вісцерального лейшманіозу є інфіковані собаки, а шкірного лейшманіозу - ховрахи, піщанки і інші гризуни. Переносниками збудників є москіти роду *Phlebotomus*. Механізм передачі збудників - трансмісивний, через укуси москітів.

Патогенез і клінічна картина. Розрізняють дві форми збудників шкірного лейшманіозу: *L. tropica minor* - збудник антропонозного шкірного лейшманіозу (міського типу) і *L. tropica major* - збудник зоонозного шкірного лейшманіозу (сільського типу). При антропонозному шкірному лейшманіозі інкубаційний період складає декілька місяців. На місці укусу москіта з'являється горбок, який збільшується і через 3-4 міс покривається виразками. Виразки частіше розташовуються на обличчі і верхніх кінцівках. Джерелами збудника є хвора людина і собаки.

При зоонозному шкірному лейшманіозі інкубаційний період складає 2-4 тиж. Захворювання характеризується гострішим перебігом. Виразки частіше локалізуються на нижніх кінцівках. Резервуаром лейшманій є піщанки, ховрахи, їжаки. Захворювання поширене в Середній Азії, Середземномор'ї і Закавказзі. *L. braziliensis* викликає шкіряно-слизистий лейшманіоз, що характеризується гранулематозним і виразковим ураженням шкіри носа і слизистих оболонок порожнини рота і гортані. Ця форма зустрічається переважно в Південній Америці.

Вісцеральний лейшманіоз (кала-азар, або чорна хвороба) викликається *L. donovani* і зустрічається в країнах тропічного і субтропічного клімату. Інкубаційний період складає 6-8 міс. У хворих збільшуються печінка і селезінка, вражаються кістковий мозок і травний тракт.

Лікування і профілактика. Для лікування вісцерального лейшманіозу застосовують препарати сурми (солі сурмін, неостібозан й ін.) і ароматичні діамідини (стильбамідин, пентамідин).

Збудник трипаносомозів. Для людини патогенні *Trypanosoma gambiense* і *Trypanosoma rhodesiense*, що викликають африканський трипаносомоз (сонну хворобу), *Trypanosoma cruzi* - збудник американського трипаносомоза (хвороба Шагаса). Таксономічне положення на рівні вищих таксонов таке ж, як і у лейшманій. Трипаносоми мають довгасте вузьке тіло з джгутиком і ундулюючою мембраною.

Переносником африканського трипаносомоза є мухи цеце, а хвороби Шагаса - триатомові клопи.

Збудник трихомоноза. Трихомоноз - антропонозна інфекційна хвороба, що викликається сечостатевою трихомонадою (*Trichomonas vaginalis*), супроводжується ураженням сечостатевої системи. Передається переважно статевим шляхом.

Збудник відноситься до Protozoa, типу Sarcomastigophora, підтипу Mastigophora - джгутиконосії. Цист не утворює. Має грушовидну форму, розміри - 8-45×2-14 мкм. Чотири джгутики розташовано на передньому кінці клітини. Один джгутик сполучений з клітиною ундулюючою мембраною. У навколишньому середовищі швидко гине. Для постановки діагнозу використовують мікроскопічний метод.

Для лікування застосовують метронідазол, тинідазол, осарсол, амінарсон, фуразолідон й ін.

Теоретичні питання:

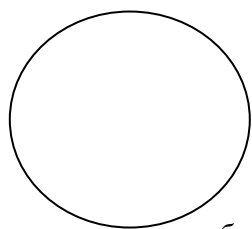
1. Характеристика і класифікація найпростіших.
2. Структура клітин найпростіших (еукаріотів).
3. Етіологія захворювань, викликаних трипаносомами, лейшманіями, лямбліями, трихомонадами, токсоплазмами.
4. Епідеміологія і патогенез захворювань, викликаних трипаносомами, лейшманіями, лямбліями, трихомонадами, токсоплазмами.
5. Методи мікробіологічної діагностики захворювань, викликаних трипаносомами, лейшманіями, лямбліями, трихомонадами, токсоплазмами.
6. Лікування і профілактика захворювань, викликаних трипаносомами, лейшманіями, лямбліями, трихомонадами, токсоплазмами.

Протокол № 20

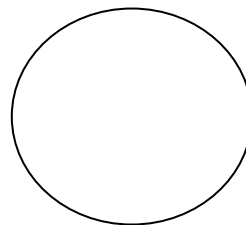
Тема: Мікробіологічна діагностика мікозів.

Мета: Вивчення методів мікробіологічної діагностики, терапії та профілактики захворювань, викликаних патогенними грибами.

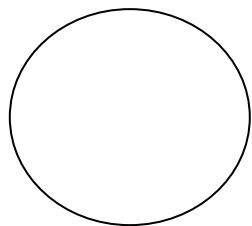
1. Мікроскопія і замалювання демонстраційних препаратів: а) гриби роду *Candida* в мазках з чистої культури, забарвлених за Лефлером, б) гриби роду *Candida* в мазках з чистої культури, забарвлених за Романовським-Гімзою, в) гриби роду *Pneumocista*, забарвлення за Лефлером; г) гриби роду *Pneumocista*, забарвлення за Романовським-Гімзою.



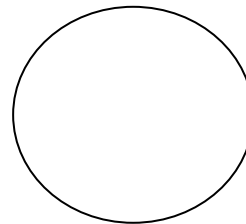
гриби роду *Candida* в мазках з чистої культури
фарбування за Лефлером



фарбування за Романовським-Гімзою



гриби роду *Pneumocista*
фарбування за Лефлером



фарбування за Романовським-Гімзою

2. Перерахувати патогенні види грибів:

3. Вивчення лікарських препаратів для лікування мікозів.

4. Вивчення схеми лабораторної діагностики мікозів.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

В останні роки однієї з актуальних проблем охорони здоров'я стали опортуністичні мікози, тому що є частими ускладненнями багатьох захворювань, що входять у компетенцію лікарів різних спеціальностей: терапевтів, педіатрів, пульмонологів, гінекологів, хірургів, дерматологів, урологів і т.д. Зростання випадків грибкових інфекцій серед населення пов'язане з декількома причинами. Погіршення екологічних умов знижує антиінфекційну резистентність людини, що приводить до порушення балансу між нормальною флорою й імунною відповіддю організму, до різкої активації умовно-патогенних грибів, розширюючи спектр збудників, що викликають поразки шкіри й внутрішніх органів. Нераціональне використання антибіотиків, цитостатиків, гормональних препаратів, променевої і хіміотерапії в боротьбі з основним захворюванням також приводить до зниження імунітету, селекції стійких штамів мікроорганізмів і розвитку грибкових ускладнень. Часта

катетеризація, парентеральне харчування, проведення штучної вентиляції легенів, гомотрансплантація, трансплантація органів, кандиданосійство медперсоналу й ін. збільшують ризик інфікування внутрілікарняними штамами грибів. випадки, Що Частішають, самолікування, антисанітарні умови життя, важкі хронічні захворювання є факторами, що повертаються, до розвитку поверхневих і глибоких мікозів.

Сучасний прогрес медичної науки служить лікуванню раніше невиліковних хвороб, полегшує серйозні страждання й продляє людське життя. Але, з іншого боку, велика кількість пацієнтів, чиє життя було врятовано або продовжене завдяки проведеному лікуванню, падають жертвами опортуністичних грибкових інфекцій. І це незважаючи на той факт, що ці ускладнення в принципі можуть бути легко діагностовані й успішно вилікувані. Значна кількість летальних випадків через грибкове інфікування є результатом недоліку адекватного й кваліфікованого лабораторного дослідження в медичній мікології.

КЛАСИФІКАЦІЯ МІКОЗІВ

Поверхневі мікози (кератомікози) — поразка поверхневих шарів шкіри, волосся:

Malassezia furfur - збудник різнобарвного лишая.

Eophiala werneckii - збудник чорного лишая.

Piedraia hortae - збудник чорної п'єдри (п'єдріоз).

Trichosporon beigellii - збудник білої п'єдри (трихоспороз).

Епідермофітії (епідермомікози, дерматофітії, дерматомікози) - поразка епідермісу, шкіри, волосся.

Рід *Microsporum*

Microsporum audouinii - збудник мікроспорії.

Microsporum ferrugineum - збудник мікроспорії.

Рід *Trichophyton*

Trichophyton tonsurans - збудник тріхофітії.

Trichophyton violaceum - збудник тріхофітії.

Trichophyton rubrum - збудник рубромікоза.

Рід *Epidermophyton*

Epidermophyton floccosum - збудник епідермофітії.

Epidermophyton interdigitale - збудник епідермофітії.

Підшкірні, або субкутійні, мікози — поразка дерми, підшкірної клітковини, м'язів.

Sporothrix schenckii - збудник споротрихоза.

Fonseca compacta - збудник хромомікоза.

Fonseca pedrosoi - збудник хромобластомікоза.

Phialophora verrucosa - збудник хромомікоза.

Phoma spp., *Alternaria* spp., *Bipolaris* spp., *Curvularia* spp., *Eophiala* spp. - збудники феогіфомікоза.

Збудники міцетоми (хронічний гнійно-запальний процес підшкірної клітковини й суміжних тканин) — *Actinomyces* spp., *Nocardia* spp., *Madurella* spp., *Eophiala* spp.

Системні, або глибокі, мікози - поразка внутрішніх органів і тканин.

Histoplasma capsulatum, *H. duboisii* - збудник грубнути.

Blastomyces dermatidis - збудник боронити.

Coccidioides immitis - збудник кокцидіоїдоза.

Paracoccidioides brasiliensis - збудник паракокцидіоїдоза.

Cryptococcus neoformans - збудник криптококкоза.

Опортуністичні мікози:

Aspergillus spp. - аспергильоз.

Mucor spp. - зигомікоз.

Penicillium spp. - пеніцильоз.

Fusarium spp. - фузаріоз.
Candida spp. - кандидоз.
Pneumocystis carinii - пневмоцистоз.

Кандидоз

Кандидоз - мікотична інфекція, викликувана дріжджеподібними (д/п) грибами роду *Candida*, що входить у сімейство *Cryptococcaceae*. До цього роду ставляться безспоріві дріжджі, у яких псевдоміцелій може бути добре розвиненим, рудиментарним або зовсім відсутній; деякі види утворюють щирий міцелій.

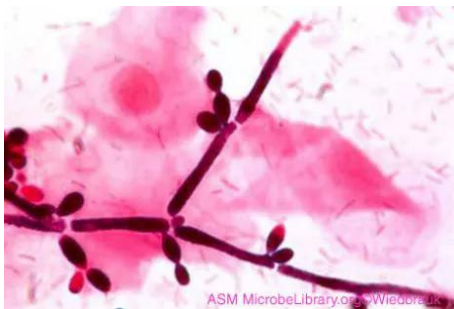
Гриби роду *Candida* широко розповсюджені в природі. Їх можна виявити в повітрі, ґрунті, воді, предметах побуту, продуктах харчування, а також на слизуватій оболонці травного тракту, геніталій і шкірі в людей.



Рис. 6.39. Гриби роду *Candida* (представлені овальними почкуючимися дріжджевими клітками, псевдогіфами і септирваними гіфами)

Вважають, що до 2/3 людей є носіями (нігті, кишечник й ін.) кандидозних бластоспор, але в більшості останні перебувають в "сплячому" стані. При вагітності, прийомі естроген-утримуючих препаратів (наприклад, оральних контрацептивів), антибіотиків дріжджеподібні гриби "ідуть у ріст". Кандидоз - частий супутник зниженого імунітету. Тому його відносять до групи опортуністичних - супутніх СПИДу - захворювань.

Морфологія: *Candida* не утворюють каротиноїдних пігментів і не формують капсул. Рід *Candida* включає 163 виду, але основну роль у патології людини грають обмежене число видів при різкому домінуванні *C. albicans*.



Дріжджова фаза *Candida* представлена одноклітинними організмами щодо великих розмірів - 1,5 x 1,5 до 8 x 14 мкм, овальної, округлої або овально-втягнутої форми. Молоді клітини мають округлу або яйцевидну форму - "суперечки", зрілі - подовжену. Істинного міцелію - грибних ниток - дріжджоподібні гриби не мають, а утворюють псевдоміцелій. Його нитки відрізняються від істинного міцелію тим, що не мають спільних оболонки і перегородок, а складаються з

ланцюжка тонких клітин, що стикаються один з одним вузьким підставою.

Культуральні властивості. Вони порівняно швидко ростуть на щільних і рідких поживних середовищах, краще з додаванням вуглеводів. Оптимальна температура росту - 25-28°C, патогенні для людини і тварин види добре ростуть при 37°C, можуть рости в діапазоні - 5-40°C, оптимум рН - 5,8-6,5, але гриби здатні рости при кислих значеннях середовища (рН - 2,5-3,0). Факультативні анаероби, при цьому анаеробний метаболізм особливо характерний для нитчатої фази.

C. albicans на щільному середовищі утворює опуклі колонії білого або кремового кольору сметаноподібної консистенції; дріжджові клітини овальної або подовжено-овальної форми розміром 2,9-7,2 x 2,9-14,4 мкм, філаментують нерівномірно, скупчення дріжджових клітин (гломерули) сильно заломлюють світло і клітини *C. albicans* в рідких білкових

середовищах (сироватка, плазма або яєчний білок в розведеннях 1: 2 - 1:10) протягом 2 - 4 год при 37°C проростають, утворюючи короткі нитки ("паросткові трубки").



Види *Candida*, є найбільш частими збудниками кандидозу, ідентифікуються за морфологічними ознаками (макро- і мікроскопічна картина дріжджовий фази, характер філаментациї) і ферментативної активності. За антигенною структурою *Candida* є надзвичайно гетерогенною групою, всередині якої є як родинні, так і відокремлені види. При впровадженні в тканини дріжджові клітини *C. albicans* трансформуються в міцеліальних фазу, для якої характерні зменшення товщини клітинної стінки і втрата потужного електронно-прозорого шару, характерного для дріжджовий фази.

Фактори патогенності. Клітини *C. albicans* і її компоненти надають імуномодулюючий ефект. Цілісні клітини, клітинні стінки обох фаз, а також розчинні полісахариди *C. albicans* активують систему комплементу по альтернативному шляху, при цьому активність зазначених компонентів гриба вище, ніж ліпополісахариду *E. coli*.

Деякі ферменти *Candida* можуть розглядатися як важливі чинники агресії збудника. У мембранах і клітинної стінки *C. albicans* містяться фосфоліпази, частина яких секретується за межі клітини.

Дослідження авторів розширили уявлення про токсичні субстанції *Candida*: були виділені і охарактеризовані кандітоксин, глікопротеїновий і низькомолекулярні токсини, але їх патогенетичне значення залишається нез'ясованим.

Епідеміологія. *Candida* відносяться до умовно-патогенних мікроорганізмів з високим рівнем носійства, яке проявляє виражену тенденцію збільшення. На слизовій піхви невагітних жінок носійство досягає 11 - 12,7%, але різко збільшується в останній третині вагітності, складаючи за різними даними 29,3-46-86%. У фекаліях частота виділення *Candida* досягає 80%, на непошкодженій шкірі - до 9,5%. Загальний рівень носійства формується до 16 - 18-річного віку, залишаючись надалі без істотних змін.

Первинне інфікування організму людини відбувається в родових шляхах матері, про що свідчить висока частота виділення *Candida* у новонароджених (до 58%), і майже повний збіг видового складу *Candida* у дитини і матері. Інфікування сприяє збільшена частота носійства і кандидозу піхви в останній третині вагітності.

Новонароджені проявляють високу чутливість до екзогенного зараження: у 98,5% інфікованих дітей на 5 - 6 день життя розвивається кандидоз ротової порожнини. Прогноз захворювання сприятливий, за винятком недоношених, у яких мікоз може набувати вісцеральний і генералізований характер.

Описано трансплацентарний шлях зараження при кандидозі, прогноз якого залежить від ступеня доношеності: при народженні дитини після 36 тижнів вагітності захворювання, як правило, протікає у вигляді легко купіруємої поверхневих уражень, а при народженні в більш ранні терміни мікоз приймає системний характер з високою летальністю.

Роль нераціональної антибактеріальної терапії в розвитку кандидозу обґрунтована великим числом досліджень, в яких вирішальне значення надається придушення нормальної мікрофлори макроорганізму, яка конкурує з *Candida* за рецептори слизових, глюкозу як джерело живлення і блокує проникнення дріжджів через слизовий гель і гнітючої їх зростання, ймовірно, за рахунок летючих жирних кислот. Крім придушення нормальної мікрофлори антибактеріальні антибіотики мають імуно супресорних дією.

При СНІД кандидоз слизових розвивається, складаючи в структурі микотических ускладнень 80-90%.

Кандидоз слизових при нез'ясованих патогенезі (відсутність в анамнезі терапії цитостатиками, антибактеріальними антибіотиками, нормальний ендокринний статус) є маркером СНІДу.

У порівнянні з іншими імунодефіцитними станами, кандідоємія, незважаючи на інтенсивну колонізацію слизової орофарінгса, зустрічається на тлі СНІДу рідко і лише в термінальній стадії захворювання. Причинами дисемінації є нейтропенія, антибіотична терапія, в / в катетери.

У шлунково-кишковому тракті кандидоз поширюється по протягу. Легеневі ураження виникають в результаті аспірації грибів з ротової порожнини або гематогенного поширення і носять обмежений характер у вигляді ураження окремих бронхіол або нечисленних альвеол. Гриби можуть впроваджуватися в тканини вдруге, проникаючи через ерозії, викликані герпетичної інфекцією.

Розвинувся кандидоз викликає додаткову імуносупресію, тому вимагає антифунгальної лікування. Імуносупресорної активністю володіють маннан і глікопротеїн *C. albicans*.

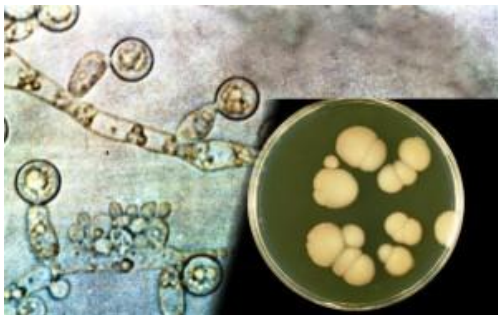
Важливе значення в розвитку кандидозу мають ендокринопатії: цукровий діабет, гіпаратиреоїдоз, поєднання гіпоадrenокортіцизма, гіпаратиреоїдоза, які з поверхневим кандидозом були об'єднані в єдиний синдром.

Систематичне (до 1 року) використання контрацептивів гормональної природи призводить до збільшення як частоти носійства, так і кандидозу піхви.

Локальні кандидозні ураження виникають через порушення цілісності епітеліальних покривів (виразкові поверхні, мацерації, мікротравми).

При парентеральному проникненні збудника в результаті оперативних втручань на органах черевної порожнини і серце, використання апаратів екстракорпорального кровообігу, тривалого парентерального харчування, зондування судин і порожнин серця, порушення асептики при ін'єкціях (наркомани) розвивається генералізована форма кандидозу в осіб з нормальним імунним статусом. При екзогенному попаданні гриба в організм основну захисну роль виконують фагоцити, в першу чергу нейтрофіли.

Поверхневі ураження слизових можуть переходити в дисеміновану форму, якщо знижується неспецифічна захист макроорганізму, що забезпечується фагоцитами, як це має місце при лейкеміях і в термінальній фазі СНІДу.



Лабораторна діагностика. Мікроскопічне дослідження є найдоступнішим методом, його можна використовувати в умовах звичайних поліклінік, де немає спеціальних лабораторій. Культуральна діагностика відіграє найважливішу роль в постановці діагнозу. Вона дозволяє встановити вид гриба (що, як зазначалося вище, практично неможливо при мікроскопії), а також охарактеризувати ступінь обсіменіння грибами (визначити кількість дріжджових

клітин в одиниці об'єму). Недоліком є необхідність спеціалізованої бактеріологічної лабораторії.

Внутрішньошкірні проби проводять з полісахаридним антигеном різних видів грибів (*Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*). Пробу ставлять за типом реакції Манту ("гудзик на туберкульоз"). Реакцію враховують через 24 - 48 год. Після проведення проби. Внутрішньошкірні проби вважають більш специфічними пріхроніческом перебігу кандідаінфекції.

Серологічні реакції. Реакція аглютинації при кандидозах вважають істинно позитивної при розведенні сироватки більш високому, ніж 1: 100. Реакція зв'язування компліменту (РСК) з полісахаридними антигенами менш чутлива, але більш специфічна в порівнянні з

реакцією аглютинації. При відносно невеликих осередках ураження РСК майже завжди негативна.

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) - відносно новий, але за рахунок високої чутливості і специфічності вельми перспективний метод. Як ні парадоксально, саме висока чутливість обмежує застосування методу ПЛР в діагностиці кандидаміозом: результат виявляється позитивним навіть у присутності невеликої кількості ДНК гриба при носійстві, яке, як було сказано вище, широко поширене.

1. Необхідно виявити і при можливості усунути патогенетичні фактори захворювання:
 - дослідження імунного і ендоринного статусу;
 - шлунково-кишковий тракт.

Провести терапію основного захворювання.

2. антимикотиком місцевого і системного дії.

При гострих формах поверхневого кандидозу шкіри та слизових оболонок ефективні місцеві антимикотические кошти у вигляді розчину, крапель, крему, мазі, вагінальних таблеток. В останні 30 років при лікуванні кандидозу широко застосовуються препарати азольного ряду, що володіють широким спектром дії, а також полієнових антибіотики, алліламіновое сполуки, похідні циклопіроксаламіна.

Противірибкові препарати для системного застосування:

1. Флуконазол: дифлазон, дифлюкан, мікосіст, флюкостат, форкан;
2. Ітраконазол: орунгал;
3. Кетоконазол: низорал, ороназол;
4. Тербінафін: ламізил, екзіфін;
5. Натамицин: пимафуцин.

Противірибкові препарати для зовнішнього застосування:

1. Біфоназол: біфосін, микоспор;
2. Клотримазол: антифунгол, кандібене, канестен, канізон, клотримазол;
3. Еконазол: екалін, екодакс;
4. Ізоконазол: травоген;
5. Кетоконазол: низорал;
6. Миконазол + мазіпредон: мікозолон;
7. оксіконазол: мифунгар крем;
8. нафтифін: екзодеріл;
9. Тербінафін: ламізил, екзіфін.

Профілактика. 1. Для профілактики розвитку кандидоз-інфекції у осіб, які отримують антибактеріальні препарати, необхідно призначати протівірибкові препарати. Добова доза залежить від ступеня ризику, лікування проводять протягом основної терапії.

2. Лікування хворих з кандідоносительством в кишечнику.

3. Попередження розвитку кандидозу у хворих з важкими соматичними та ендокринними захворюваннями, а також з імунодефіцитом (неодноразові мікологічні дослідження).

4. Профілактика дисбактеріозу.

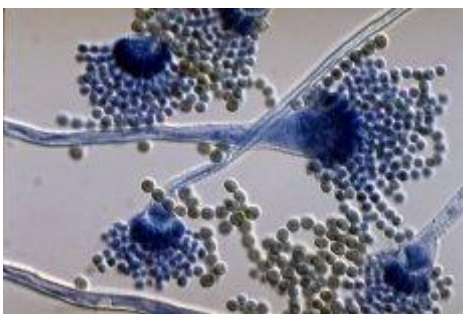
5. Попередження розвитку кандидозу у новонароджених.

Аспергильоз

Гриби роду *Aspergillus* є важливою причиною небезпечних для життя інфекцій у пацієнтів з імуносупресією. Ця зростаюча популяція включає пацієнтів з тривалою нейтропенією, активної ВІЛ-інфекцією, спадковими імунодефіцитами і хворих після транспланції алогенних гемопоетичних стовбурових клітин та / або трансплантацією легкого. Аспергильоз - хвороба, що викликається різними видами цвілевих грибів роду *Aspergillus*.

Частіше протікає з переважним ураженням легень, вулиць з імунодефіцитами приймає важкий септичний (генералізований) перебіг.

Аспергільоз є причиною захворювань, які класично визначають як інвазивні, сапрофітичеської або алергічні. Інвазивні захворювання, викликані грибами роду *Aspergillus*, включають інфекції нижніх дихальних шляхів, пазух носа і шкіри, як місць безпосереднього проникнення збудника. ЦНС, серцево-судинна система і інші тканини можуть бути інфіковані в результаті гематогенної дисемінації або безпосереднього на розповсюдження інфекції з сусідніх ділянок. Сапрофітичеської форми включають аспергиллезний отомікоз і Аспергилл легких. Алергічні форми включають алергічний аспергиллезний синусит і алергічний бронхолегеневий аспергільоз.



Етіологія. Збудники - різні види роду *Aspergillus*. Найбільш часто виділяють від пацієнтів з інвазивним аспергиллезом вид *Aspergillus fumigatus*. Наступні по частоті види це *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* і *Aspergillus terreus*. У деяких установах можуть частіше виявляти *A. fl avus* або *A. terreus*. Морфологічно аспергілли складаються з однотипного міцелію (шириною 4-6 мкм), іноді виявляються "головки" з конідіями.

При посіві на середовище Сабуро ростуть швидко, утворюючи плоскі колонії, спочатку білі, злегка пухнасті або оксамитові, потім приймають синювате, коричневе, жовтувате й інше фарбування (в залежності від виду); при цьому поверхня їх стає борошністої, порошковою. Аспергіли володіють великою біохімічної активністю, утворюють різні ферменти (протеолітичний, сахаролітичеський, липолітичеський), а деякі види містять ендотоксини, при введенні яких експериментальною

твариною розвиваються паралічі і настає їх загибель. Мають алергизуючим дією. З дезінфікуючих засобів на аспергілли найбільш активно діють розчини карболової кислоти і формалін.

Епідеміологія. Аспергіли широко поширені в природі. Їх постійно можна знайти в ґрунті, зерні, борошні, сіні (особливо запліснявілих), в пилу приміщень, де обробляються шкіри, вовна, прядиво. Виявляються аспергілли навіть в пилу лікувальних установ, що обумовлює внутрілікарняне інфікування. Збудник проникає в організм, як правило, через повітря з пилом.

З професійних груп частіше уражаються працівники сільського господарства, працівники ткацьких і бумагопрядільних підприємств. Захворювання в ослаблених осіб може виникнути і як ендогенна інфекція, так як на слизовій оболонці зів здорових людей іноді виявляються аспергілли.

За останні роки актуальною проблемою став аспергільоз в осіб з різними імунодефіцитами. Зокрема, у 20% таких хворих розвиваються мікози, а серед останніх більш 70% припадає на аспергільоз. Спостерігаються внутрішньолікарняні зараження імунодефіцитних пацієнтів пилом, що містить аспергіли (повітряно-пилова передача інфекції). Випадків зараження людини від хворих людей не спостерігається.

Патогенез. Збудник аерогенним шляхом потрапляє на слизові оболонки верхніх дихальних шляхів. Може наставати інфікування через шкіру, звичайно змінену яким-небудь іншим патологічним процесом. Провідну роль в патогенезі аспергиллеза грає зниження імунного захисту організму. Аспергільоз ускладнює різні патологічні процеси шкіри,

слизових оболонок, внутрішніх органів. Зокрема, легеневі форми аспергиллеза виникали на тлі бронхоектатичної хвороби, абсцесів легені, туберкульозу легенів, раку легенів, хронічного бронхіту та ін. В останні роки аспергільоз став особливо часто спостерігатися в осіб з імунодефіцитами (вроджені імунодефіцити, особи, які отримують протипухлинну хіміотерапію, імунодепресанти, а також ВІЛ-інфіковані). Він зустрічається значно частіше, ніж інші глибокі мікози. У ослаблених осіб спочатку уражаються грибом легкі, до якого залучаються плевра, лімфатичні вузли. Поток крові аспергилли можуть заноситися в інші органи, утворюючи там специфічні гранульоми, які зазвичай абсцедують. З легеневого аспергільоз перетворюється в генералізований (септичний) і нерідко (понад 50%) закінчується смертю хворого. При масивній інгаляції спор аспергилл у осіб з нормальною імунною системою може виникнути гостра дифузна пневмонія, що закінчується самовидужанням.

Симптоми і течія. Інкубаційний період точно не встановлено. Аспергилли можуть вражати будь-які органи і тканини. До клінічних проявів можна віднести наступні форми: 1) бронхолегеневий аспергільоз; 2) генералізований (септичний) аспергільоз; 3) аспергільоз ЛОР-органів; 4) аспергільоз очі; 5) аспергільоз шкіри; 6) аспергільоз кісток; 7) інші форми аспергиллеза (ураження слизових оболонок рота, геніталій, міко-токсикоз і ін.).

Діагностика. При розпізнаванні аспергиллеза враховуються епідеміологічні передумови (професія, наявність хвороб, що послаблюють імунітет, і ін.). З поразок бронхів і легенів діагностичне значення має тривалий перебіг хвороби, утворення характерних інфільтратів з наступним розпадом, характер мокротиння, лейкоцитоз, еозинофілія. Підтвердженням діагнозу служить виділення збудника (з мокротиння, матеріалу, взятого з бронхів, біоптатів уражених органів). Бронхоальвеолярний змиви, трансторакальні чрезкожне пунктирование з аспірацією, торакоскопічна біопсія є стандартними процедурами для постановки діагнозу інвазивного аспергільозу легких. У рідинах і зразках тканин, отриманих в ході цих процедур, при прямій мікроскопії можна виявити характерний розгалужених під кутом септірований міцелій, а при культуральному дослідженні виділити гриби роду *Aspergillus*. Де це можливо, зразки, отримані в ході цих процедур, пересівають на грибкові середовища для оптимального росту *Aspergillus*. Однак результати цитологічного дослідження, гістологічного дослідження, безпосереднє дослідження мазка і культуральне дослідження можуть бути помилково негативними, якщо вони отримані від пацієнтів, які вже отримують системну протигрибкову терапію, а також у випадках, коли діагностичні процедури не могли бути виконані безпосередньо в ураженій області. Таким чином, відсутність позитивної культури або негативні результати прямої мікроскопії не виключають діагнозу інвазивного аспергільозу. Культуральне підтвердження у випадках, коли це, можливо, є важливим етапом для диференціювання аспергиллеза від інших міцеліальних грибкових інфекцій типу фузаріозу і сцедоспоріоза. При негативних результатах культурального дослідження використовують імуноферментний тест на галактоманна або D-глюкан і дані КТ. Досить часто міцелії грибів *Aspergillus* виявляють в гістологічному препараті у пацієнтів з імуносупресією і клінічними проявами інфекції. Діагностика, заснована на методі ПЛР, який визначає *Aspergillus*-специфічні грибкові гени, перспективна для аспергиллеза. Однак ці системи не були стандартизовані, недоступні для комерційного використання і поки залишаються на стадії дослідження.

З крові аспергилли виділяються дуже рідко навіть при генералізованих формах аспергиллеза. Діагностичне значення має поява антитіл до збудника, що виявляються за допомогою серологічних реакцій (РЗК та ін.). Шкірні проби зі специфічним аспергиллезним антигеном можна використовувати лише при відносно доброякісно протікає мікозі в лиць нормальною імунною системою. Слід враховувати, що у ВІЛ-інфікованих вже в стадії предСПІДу реакції гіперчутливості уповільненої типу стають негативними.

Лікування. Лікування легеневого і генералізованого аспергиллеза представляє важку задачу. Хіміотерапія мало ефективна. Для терапії легеневого аспергиллозу з обмеженим інфільтратом в останні роки успішно застосовують хірургічні методи (лобектомія з резекцією уражених ділянок легені). У більшості хворих операція протікає без ускладнень і дає гарні віддалені результати (рецидивів не спостерігається). При поширенні процесу на багато органів хірургічні методи використовуються в комплексі з консервативним лікуванням. Призначають препарати йоду всередину в наростаючих дозах. З противомікозних антибіотиків амфотерицин В. При легневих формах аспергиллеза показані інгаляції розчинів йодиду натрію, ністатин натрієвої солі, 0,1% розчин брильянтового зеленого. При нашаруванні вторинної інфекції (зазвичай стафілококової) можна застосовувати оксацилін або еритроміцин. Антибіотики тетрациклінової групи та левоміцетин протипоказані, так як вони сприяють виникненню аспергиллозов. Призначають вітаміни і загальнозміцнюючий лікування.

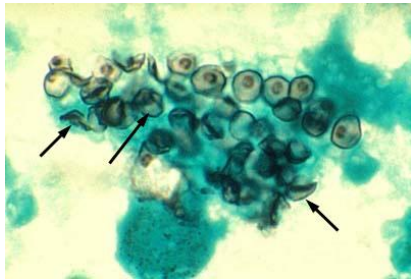
При лікуванні аспергиллезних уражень шкіри і слизових оболонок використовують місцево протизапальні і противомікозні препарати.

Профілактика та заходи в осередку. Боротьба з пилом і травматизмом на виробництві. Носіння респіраторів робітниками на млинах, зерноскладах, овочесховищах, ткацьких підприємствах. У лікувальних установах для осіб з імунодефіцитами вдається значно зменшити частоту екзогенного інфікування аспергиллезом шляхом очищення надходить у палати повітря спеціальними повітряними фільтрами. Для попередження вторинних (легневих) аспергиллозов важливо раннє розпізнавання і лікування основного захворювання.

Пневмоцистоз

Пневмоцистоз - протозойні захворювання, обумовлене *Pneumocystis jiroveci*, яка є однією з найбільш частих причин розвитку пневмоній у осіб з ослабленим імунітетом.

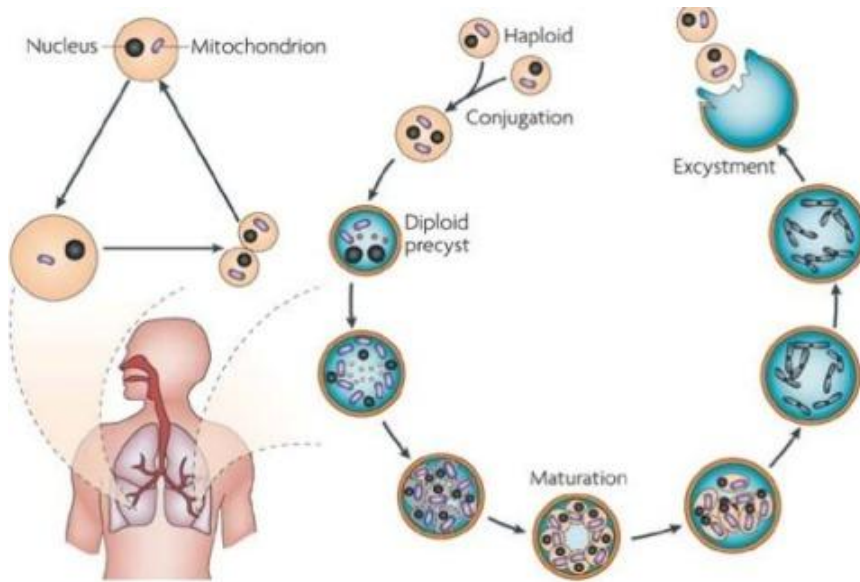
Пневмоцистоз може протікати у вигляді гострих респіраторних захворювань, загострень хронічних бронхолегневих захворювань, а також (найважча його форма) у вигляді пневмоцистної пневмонії. З усього спектра захворювань, при яких визначаються пневмоцисти, найбільш вивчена пневмоцистна пневмонія (ПП).



Етіологія. Збудник - *Pneumocystis jiroveci* - позаклітинний паразит із суворим тропізмом до легеневої тканини, що вражає пневмоцити 1 і 2 порядку. На підставі ряду морфологічних ознак, нездатності до зростання *in vitro*, відсутності реакції на протигрибкові препарати - РС раніше відносили до типу найпростіших, хоча повної ідентичності з найпростішими у них не визначалося. За останні роки на підставі аналізу послідовності ДНК, ліпідного складу стінки, реакції на амфотерицин, гена *H + АТФ-ази* та ін. - отримані вагомі докази приналежності мікроба до класу грибів, а саме - до аскоміцетов, філогенетично пов'язаних з *Schizosaccharomyces pombe*.

Місцем природного проживання в нормальних умовах є легкі. Мікроскопічно *Pneumocystis jiroveci* визначаються у вигляді 4 форм, які відображають 4 стадії його розвитку: дрібних (1-5 мікрон) тонкостінних трофозоїтів (овальної або амебовидної форми з 2-шаровою оболонкою) і прецист (овальної форми без псевдоподій), і більших цист (5-7 мікрон, з відносно товстою оболонкою), що містять до 8 ядер - внутріцістних тілець (діаметром 1-2 мікрона, оточених тонкою 2-шаровою мембраною), що є попередниками внецістних трофозоїтів. Дрібні тонкостінні трофозоїти ростуть і перетворюються в великі тонкостінні прецисти, які, дозріваючи, стають товстостінними цистами, і шляхом прямого розподілу, або

шізогонії, в них виникають спорогонії, які потім виходять з материнського спорозоїта і визначаються як дрібні тонкостінні трофозоїти. Коли зріла циста розривається, спорозоїти або продовжують цикл розвитку в альвеолах, перетворюючись в трофозоїт, або виходять у зовнішнє середовище (з крапельками слизу при кашлі) і, в разі набуття нового господаря, також включаються в свій цикл розвитку. В забарвлених гістологічних препаратах визначаються зазвичай лише багатоядерні цисти.



Весь життєвий цикл *Pneumocystis jirovecii* проходить в альвеолах. *Pneumocystis jirovecii*, розмножуючись в організмі господаря, прикріплюється до епітелію легких, атакуючи пневмоцити 1 і 2 порядку і альвеолярні макрофаги. *Pneumocystis jirovecii* є, таким чином, позаклітинним паразитом, провокуючи у господаря запальний відповідь.

Під електронним мікроскопом видно, як при пневмонії *Pneumocystis*

jirovecii розташовуються уздовж стінок альвеол, тісно прилягаючи до пневмоцитами 1 типу, в яких і визначаються максимальні зміни. *Pneumocystis jirovecii* поширюються повільно і поступово заповнюють альвеолярне простір.

Епідеміологія. Більшість авторів визнає, що пневмоцистна інфекція у людини не є зоонозної, оскільки у *Pneumocystis jirovecii* сильно виражена хазяєвспецифічність, що підтверджується наявністю генетичної дивергенції *Pneumocystis jirovecii* у п'яти різних видів ссавців. Однак безумовно епідеміологічні джерела *Pneumocystis jirovecii* інфекції залишаються невідомими: людина чи це, тварина або зовнішнє середовище, також як не вивчена тривалість збереження *Pneumocystis jirovecii* поза дихальних шляхів на об'єктах навколишнього середовища.

Пневмоцисти передаються повітряно-крапельним шляхом. Відомо, що від 1 до 10% здорових людей є носіями пневмоцист. Клінічні ознаки пневмоцистозу спостерігаються лише в ослаблених дітей і у імунокомпрометованих осіб (хворі на СНІД, а також пацієнти, які отримують імуносупресори). Описані спалахи пневмоцистної пневмонії в стаціонарах, де знаходилися на лікуванні хворі з вищезазначеною патологією.

Серед хворих на СНІД пневмоцистоз є однією з найбільш частих опортуністичних інфекцій (більше 80%) і при відсутності лікування майже завжди приводить до летального результату. У інших хворих з ослабленим імунітетом пневмоциста виділяється в 40% випадків. За даними експериментів на тваринах інкубаційний період триває від 4 до 8 тижнів.

Важкі пневмонії, викликані *Pneumocystis jirovecii*, в основному, виникають у осіб з ознаками значного пригнічення імунної системи, зокрема, у ослаблених недоношених новонароджених, при вроджених агаммаглобулінемія, СНІД, а також при застосуванні імуносупресивної терапії при злоякісних новоутвореннях, колагенових, лімфопроліферативних і гематологічних захворюваннях, колагенозах, трансплантації органів та ін.

Патогенез захворювання визначається механічним ураженням інтерстиціальної тканини легені як самим паразитом, так і запальними клітинами. Стінки альвеол інфільтруються мононуклеарами, клітини інтерстиція - плазматичними клітинами. Товщина альвеолярної стінки збільшується в 5-20 разів, внаслідок чого розвивається альвеолокапиллярна блок. *Pneumocystis jiroveci* при цьому не проникають ні в кровеносні, ні в лімфатичні судини, ні в міжальвеолярні перегородки, і в переважній більшості випадків не відбувається дисемінації збудника в інші органи, однак у хворих на СНІД не виключається дисемінація і внелегочна локалізація пневмоцистозу.

Передбачається, що у імунокомпетентних осіб при наявності специфічних антитіл, які фіксують комплемент на поверхні мікроба, *Pneumocystis jiroveci* фагоцитуються і руйнуються альвеолярними макрофагами.

На клітинній поверхні *Pneumocystis jiroveci* ідентифікований глікопептид, що несе антигенні властивості, характерні і для легеневої тканини, що вносить певний внесок у невразливість *Pneumocystis jiroveci* для імунної системи господаря, - і не виключено, що внаслідок зазначеного паразит широко поширений серед населення.

Відзначається місцева і системна продукція антитіл у відповідь на *Pneumocystis jiroveci*, але утворені антитіла не мають повноцінним протективного дією. Хворі на СНІД ще менш здатні на гуморальний відповідь до *Pneumocystis jiroveci*.

Визнано, що виражене зменшення числа і / або функції Т-лімфоцитів є тим критичним імунодефіцитний стан, яке необхідно для розвитку ПП, проте є переконливі дані про те, що стан гуморального імунітету також, грає велику роль у виникненні захворювання.

Токсинів паразит не продукує. Запальні зміни при ПП можуть бути дуже слабкі і неспецифічні, а можуть визначатися і інтенсивні інфільтрати з плазматичних клітин, що і лягло в колишню назву хвороби "інтерстиціальна плазматична пневмонія".

Симптоми і течія. Пневмоцистоз у дітей розвивається зазвичай на 4-6-му місяці життя (недоношені, хворі на рахіт, гіпотрофією, ураженнями ЦНС) і в більш старших вікових групах (при гемобластозі, злоякісних новоутвореннях, СНІД). Захворювання починається поступово - у дитини знижується апетит, припиняється наростання маси тіла, з'являються блідість і ціаноз носогубного трикутника, легке покашлювання. Нормальна на початку захворювання температура змінюється субфебрильної з підйомами до фебрильної. У легенях з'являються непостійні дрібно-та среднепузирчатие хрипи. З'являються задишка (до 50-70 в 1 хв), ціаноз, кашель коклюшеобразного характеру. Нерідко кашель супроводжується виділенням пінистої мокроті, в якій можуть виявлятися пневмоцистами. Рентгенологічно реєструються вогнищеві тіні різної величини і щільності, що дають картину «облаковидние» легені. У крові виявляється лейкоцитоз, помірна еозинофілія і збільшення ШОЕ.

Іноді пневмоцистоз у дітей протікає під маскою гострого ларингіту, обструктивного бронхіту або бронхіоліту. У ряді випадків настає летальний результат при клінічній картині набряку легенів.

У дорослих пневмоцистоз розвивається у осіб, які отримують імуно-супресивної терапії (зазвичай - кортикостероїди), і у хворих на СНІД. При медикаментозної імуносупресії захворювання часто маніфестується на тлі зниження дози кортикостероїдів. Продромальний період триває зазвичай 1-2 тижні, а у хворих на СНІД він досягає 10 тижнів. Поступово з'являється субфебрилітет, помірна задишка при фізичному навантаженні, сухий кашель, болі в грудній клітці. Через 1-2 тижні можуть з'явитися лихоманка, задишка в спокої, посилюється сухий кашель (продуктивний кашель відзначається рідко). При огляді виявляється тахіпное, тахікардія, ціаноз. У легких часто вислуховуються сухі, рідше - вологі хрипи. Кількість лейкоцитів зазвичай залежить від фонового захворювання.

Пневмоцистна пневмонія при СНІДі зазвичай характеризується млявим хронічним перебігом. Спочатку аускультативна симптоматика не виявляється, рентгенологічна картина

теж може залишатися без патологічних змін. У міру прогресування захворювання з'являються двосторонні прикореневі інфільтрати, що трансформуються потім або в фокусні, або інтерстиціальні зміни. Зрідка виявляються солітарні вузлики, які можуть кавернізуватися з утворенням великої центральної порожнини. Причиною абсцедування, ймовірно, є приєднання бактеріальних і мікозних інфекцій.

Таким чином, найбільш характерні для ПП клінічні симптоми: болісний сухий кашель, поворотна невстановленої причини лихоманка, нічна пітливість, наявність молочниці на орофарингеальним слизових, а також немотівіруемая втрата ваги, які асоціюються з рівнем в крові CD4 - лімфоцитів нижче 200 на 1 мл.

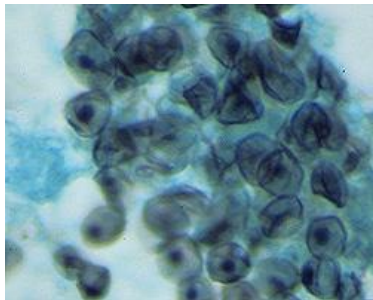
Швидке наростання симптомів, лихоманки, поява продуктивного кашлю свідчить про приєднання гнійної бактеріальної інфекції, - тоді ПП може асоціюватися з банальної пневмонією, і в цих випадках необхідно призначати антибактеріальну терапію.

Ускладнення. Провідним ускладненням, найчастіше обумовлює летальність, є дихальна недостатність, пов'язана з різким порушенням вентиляції і газообміну. Можливі також такі ускладнення, як абсцеси, спонтанний пневмоторакс (на тлі освіти дрібних легеневиких кіст), ексудативний плеврит.

Імунітет при пневмоцистозі нестійкий. Рецидиви ПП відзначаються у 10% дітей і дорослих з імунодефіцитними станами, при СНІДі у - 25% хворих.

Діагноз і диференційний діагноз. З огляду на, що клінічні прояви пневмоцистозної пневмонії малоспецифічні, а розгорнута клініко-рентгенологічна картина з'являється значно отсрочено від початку захворювання (особливо при СНІДі), рання етіологічна діагностика набуває величезного значення, так як дозволяє своєчасно розпочати відповідне лікування.

У хворих на СНІД діагноз ПП поставити свідомо легше на підставі наступних ознак: 1) ШОЕ близько 50 мм на годину, 2) ЛДГ вище 220 мЕ, 3) рентгенологічно - дифузні інтерстиціальні зміни від коренів до периферії.



Пневмоцисти в мокроті хворих виявляють вкрай рідко, а способів культивування пневмоцист людини поки ще не розроблено. Серологічні методи визнані досить ненадійними. З цих причин основною можливістю ідентифікації збудника є гістологічне дослідження рідини бронхоальвеолярного лаважу (РБАЛ) і трансbronхіальную біоптатів, здійснюване за допомогою фібробронхоскопии. Проводиться пряма мікроскопія забарвлених мазків мокротиння або бронхоальвеолярного змиву (БАЗ) за Романовським-Гімза, а також іншими, більш ефективними методами - при імпрегнації сріблом по Гоморі, толуїдиновим синім та ін.).

Помірна ступінь інвазивності і відносна простота фібробронхоскопии дозволяють вважати даний метод обов'язковим дослідженням при обстеженні хворих з різними порушеннями імунної системи і при інтерстиціальних неясного генезу пневмоніях.

Для діагностики пневмоцистозу застосовується також реакція імунофлюоресценції, заснована на визначенні титру сироваткових протипневмоцистних IgG і IgM, однак серологічна діагностика носить скоріше орієнтовний характер і менш достовірна, ніж мікроскопічна.

Високу діагностичну точність можна отримати за допомогою ДНК-полімерази, а також за допомогою моноклональних антитіл. Крім того, для ПП характерно також інтенсивне поглинання галію-67 навіть при нормальній рентгенологічній картині легких.

Лікування. Основними препаратами для лікування пневмоцистозної пневмонії є триметоприм-сул'фаметоксазол (бактрим, бісептол) і пентамідин ізотіонат. Бактрим є інгібітором системи фолієвої кислоти, а пентамідин пошкоджує системи репродукції пневмоцист.

Відзначено, що поєднання бактрима і пентамідину не збільшує ефективності терапії і підсилює токсичність пентамідину. Заміну одного препарату іншим виробляють, якщо один з них не викликає суттєвої позитивної динаміки клінічних проявів протягом 5-7 днів.

Для лікування пневмоцистозу у хворих на СНІД останнім часом все ширше застосовується альфа-діфторметілорнітін (ДФМО). Препарат добре переноситься, малотоксичний. Крім дії на пневмоцисти ДФМО блокує реплікацію ретровірусів і цитомегаловірус, надає також імуномодулюючу дію (відновлює функції Т-супресорів і підвищує імунорегуляторний індекс ОКТ4 / ОКТ8).

При сприятливому перебігу захворювання стан починає поліпшуватися в середньому через 4 дні після початку терапії. Поступово нормалізується температура тіла, покращуються об'єктивні показники ФЗД, рентгенологічна картина. Через 3-4 тижні у 20-25% хворих пневмоцисти не виявляються.

Без специфічного лікування від ПП вмирають 50% дітей раннього віку, 40% старших дітей, 70% хворих на СНІД, 5% хворих з лімфопроліферативними захворюваннями.

Профілактика та заходи в осередку. Застосування бактрима попереджає розвиток пневмоцистозної пневмонії серед груп з високим ризиком зараження. Препарат добре переноситься при тривалому застосуванні у всіх пацієнтів, за винятком хворих на СНІД, так як бактрим не викликає безпосередній загибелі пневмоцист, профілактичний ефект проявляється лише в період його застосування.

Можлива контагіозність пневмоцистозу вимагає ізоляції хворих. Після виписки хворих необхідна заключна дезінфекція палат: вологе прибирання, ультрафіолетове опромінення і обробка предметів 5% розчином хлораміну.

Теоретичні питання:

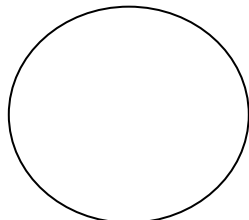
- Возбудителі. Властивості. Резистентність.
- Патогенність для людини і тварин. Фактори патогенності, токсини.
- Патогенез захворювання у людей, імунітет.
- Мікробіологічна діагностика.
- Специфічна профілактика і лікування.

Протокол № 21

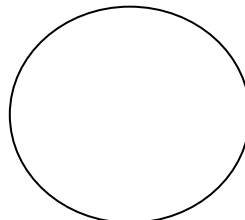
Тема: Мікробіологічна діагностика рикетсіозів.

Мета: Вивчення методів лабораторної діагностики рикетсіозів.

1. Мікроскопія і замалювання демонстраційних препаратів: рикетсії у мазках, фарбованих за Романовським-Гімзою і за Здродовським.



Rickettsia typhi
(фарбування за Романовським-Гімзою)



Rickettsia typhi
(фарбування за Здродовським)

2. Вивчення біологічних препаратів для лабораторної діагностики і специфічної профілактики висипного тифу і рикетсіозів:

- суха жива комбінована висипнотифозна вакцина Е (ЖКСВ-Е);
- жива вакцина проти Ку-лихоманки;
- рикетсіозні антигени сухі (для РЗК і РНГА).

3. Вивчення схеми лабораторної діагностики висипного тифу:

Дні початку дослідження	Метод дослідження	
	Серологічний	Біопроба
3 – 5 день	1. Реакція аглютинації в пробірках з рикетсіями Провачека. 2. Реакція непрямой гемаглютинації 3. Реакція зв'язування комплекта з антигеном із рикетсій Провачека	Внутрішньочеревне зараження морських свинок – самців для отримання скротального феномена
11 день		

4. Вивчення схеми постанови реакції аглютинації і РЗК для діагностики рикетсіозів.

5. Диференціація первинного висипного тифу і хвороби Брилля.

Результати РЗК при диференціації первинного висипного тифу від хвороби Брилля

Дослідна сироватка	Розведення сироватки								
	1:100	1:200	1:300	1:400	1:500	1:600	1:700	1:800	1:1000
Оброблена 2-меркаптоетанолом	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Необроблена	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Пояснення до таблиці: у випадку первинного висипного тифу, для якого характерне переважання IgM, спостерігається зниження титру антитіл у РЗК з обробленою сироваткою. При хворобі Брилля, що перебігає з переважанням IgG, титр антитіл у обох сироватках буде однаковим.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Рикетсії - це особлива група поліморфних бактерій, які є внутрішньоклітинними паразитами. Вони включені в сімейство Rickettsiaceae.

Захворювання, що викликаються рикетсіями, називаються рикетсіозами, вони поширені у всіх країнах світу. До недавнього часу сімейство рикетсій включало роди Rickettsia, Orientia, Ehrlichia, Coxiella. За сучасною класифікацією сімейство Rickettsiaceae включає два роди: Rickettsia, Orientia. Під Coxiella виключений з сімейства Rickettsiaceae і віднесений до порядку Legionellales.

Першого представника цієї групи виявив в 1909 р. американський вчений Ріккетс при вивченні етіології лихоманки Скелястих гір. Від цього захворювання він загинув.

У 1913 р. чеський учений Провацек в крові хворих на висипний тиф також виявив подібні мікроорганізми. Заразившись на висипний тиф, вчений теж загинув.

А в 1916 р. португальська вчений Роша-Ліма на підставі тривалих спостережень встановив, що збудниками мексиканського тифу, європейського висипного тифу та інших подібних захворювань є різновиди мікроорганізмів, виявлених рикетсією, і в честь першовідкривача назвав їх риккетсіями. А в пам'ять Провацека збудника висипного тифу назвав риккетсіями Провацека.

Великий внесок у вивчення висипного тифу внесли А. А. Кронтовскій, М. А. Кронтовская, П. Ф. Здродовский, Е. С. Галіневич й ін.

Серед рикетсій є різновиди, патогенні для людини, тварин і членистоногих.

У людини рикетсії обумовлюють різні гарячкові захворювання, так звані рикетсіозИ.

За П. Ф. Здродовського, рикетсіози людини діляться на 5 груп: група висипного тифу, група кліщових плямистих лихоманок, група цуцугамуши, група Ку-лихоманки, група пароксизмальних рикетсіозів.

Класифікація рикетсіозів заснована на ряді ознак: властивостей збудника, епідеміології і клініки захворювання.

Морфологія. Рикетсії це дрібні (0,2-1 мкм), поліморфні мікроорганізми, серед яких зустрічаються паличкоподібні, кокковидної і ниткоподібні (довжиною 10-30 мкм) представники.

Рикетсії не мають спор, капсул, і без листя. За Романовським-Гімзою забарвлюються в фіолетовий колір, а за Здродовським - в червоний колір. Будова клітинної стінки схоже з будовою стінки грамнегативних бактерій.

Культивування. Рикетсії розмножуються всередині клітини господаря. Аероби. Володіють власним метаболізмом, поводяться в клітці самостійно. Однак є енергетично залежними від клітини паразитами.

У клітці господаря кожен вид рикетсії розмножується тільки в певних місцях: в цитоплазмі, ядрі або вакуолях клітин. Вони добре розмножуються в тканинах чутливих до них тварин і членистоногих. У лабораторній практиці найбільш часто використовується метод зараження курячих ембріонів і культури тканин.

Ферментативні властивості. Чи не виражені.

Токсиноутворення. Рикетсії утворюють термолабільних ендотоксин.

Антигенна структура. Рикетсії мають два антигени: груповий термостабільний і специфічний термолабільних.

Стійкість до факторів навколишнього середовища. До високих температур рикетсії мало стійкі. Винятком є збудники Ку-лихоманки. До низьких температур і до висушування все рикетсії стійкі. Вони чутливі до антибіотиків. Сульфаміди не пригнічує їх зростання.

Збудники висипного тифу

Висипний тиф

Збудником висипного тифу є Rickettsia provazekii.

Ще задовго до відкриття збудника висипного тифу російський лікар О.О. Мочутковського в дослідах на собі показав, що збудник цього захворювання циркулює у хворого в крові.

Морфологія. Збудники епідемічного висипного тифу - рикетсії Провацека - поліморфні. Найчастіше вони мають форму коків або гантелей, зустрічаються ниткоподібні форми. Середні розміри від 0,8-2,0 × 0,3-0,6 мкм. При фарбуванні за методом Здродовського вони набувають червоного кольору.

Культивування. Розмножуються в цитоплазмі клітин господаря, епітелії кишечника воші, ендотелії судин. Найчастіше їх культивують в желточному мішку курячого ембріона. У місці розмноження на 8-13-й день утворюється каламутна бляшка. Оптимальна температура для їх розвитку 35 ° С.

Токсиноутворення. Рикетсії Провацека утворюють ендотоксин. У чистому вигляді він не отримано. Однак його чутливість до температури (при нагріванні він швидко руйнується) дає право припустити, що він білкового походження. Токсин, при проникненні рикетсії в організм, вражає клітини ендотелію судин, що призводить до збільшення проникності капілярів.

Антигенна структура. Рикетсії Провацека містять два антигену. Один з них поверхневий, термолабільний. За хімічним складом він є ліпідополісахаридобелковий комплекс. Цей антиген невідоспецифічен і є загальним з антигенами збудників ендемічного висипного тифу, а також з антигенами протей ОХ19, ОХ2. Другий - белковополісахаридний комплекс є видоспецифічний і знаходиться в глибині клітини.

Е. Вейлем і А. Феліксом була виявлена здатність *Proteus* ОХ 19 давати позитивну реакцію аглютинації з сироваткою хворих на висипний тиф. Ця реакція, названа ім'ям вчених, широко використовувалася з діагностичною метою. Автори вважали, що і збудником висипного тифу є *Proteus* ОХ 19. Однак у міру накопичення матеріалу і докази етіологічної ролі рикетсії при висипний тиф було встановлено: 1) *Proteus* ОХ 19 не є збудником висипного тифу; 2) *Proteus* ОХ 19 дає позитивні реакції аглютинації, з сироватками хворих на висипний тиф тому, що має спільний з рикетсіями Провацека антиген; 3) реакція Вейля - Фелікса не завжди специфічна, і при діагностиці висипного тифу її перестали використовувати, замінивши в реакції аглютинації антиген діагностикумів з рикетсії Провацека.

Стійкість до факторів навколишнього середовища. При високій температурі, особливо у вологому середовищі, рикетсії Провацека гинуть швидко.

У висушених фекаліях вошей рикетсії зберігаються довго. Звичайні розчини дезінфікуючих речовин гублять їх швидко.

Сприйнятливість тварин. В експериментальних умовах можна заразити білих мишей, морських свинок і мавп. На мавпах відтворюють клінічну картину висипного тифу. У заражених білих мишей виникає специфічна пневмонія.

Джерела інфекції. Хвора людина.

Шляхи передачі. Трансмисивний. У 1909 р французький вчений Ніколь в дослідах на мавпах встановив, що рикетсії Провацека передаються платтяною вошами. Надалі було показано, що головні воші також можуть бути переносниками.

Механізм зараження. Насмоктавшись крові хворого, воша стає заразною на 4-5-й день. За цей час рикетсії розмножуються в клітинах епітелію кишечника воші. Накопичившись там, вони руйнують епітеліальні клітини, потрапляють в просвіт кишки і у великій кількості виділяються з фекаліями воші. Потрапивши на шкіру здорової людини, воша кусає його і тут же виділяє рикетсії з фекаліями. Людина розчісує місце укусу і втирає в ранку рикетсії. Так збудники виявляються у внутрішньому середовищі організму людини.

Патогенез. Потрапили в організм людини рикетсії впроваджуються в клітини ендотелію судин. Розмножуються, гублять клітини, потрапляють у великій кількості в кров -

виникає риккетсіємія. Процес в судинах характеризується запаленням і утворенням тромбів, що призводить до закупорки дрібних кровоносних судин. Навколо затромбовані судини головного мозку відбувається утворення гранульом - запалення типу менінгоенцефаліту.

Висипний тиф починається гостро, відзначається висока температура, загальні явища інтоксикації, сильний головний біль і з'являється розеолезно-петехіальний висип.

Імунітет. Антимікробний та антитоксичний. Після перенесеного захворювання - довічний. У крові виявляють антитіла, що нейтралізують токсин, аглютиніни, комплементсвязиваючі антитіла, і ін.

Захворювання на висипний тиф часто були пов'язані з народними лихами (війна, голод та ін.) і завошивленістю.

Мікробіологічна діагностика. Матеріалом для дослідження є кров. Використовують серологічні реакції: РЗК, РА Вейгля з риккетсіями Провацка, РНГА для виявлення антитіл.

Хвороба Брілла

В останні роки накопичився ряд даних про тривале збереження риккетсій Провацка в організмі людини, яка перехворіла на висипний тиф. При зниженні резистентності організму вони можуть викликати повторне захворювання через багато років (10-30 років), т. Е. Це ендогенний рецидив епідемічного висипного тифу. Вперше хвороба цю описав Н. Брілл, а Н. Цінссер довів, що збудником її є риккетсій Провацка. Хвороба Брілла характеризується легким, доброякісним перебігом. Особливістю діагностики при цьому захворюванні є негативна реакція аглютинації з протеєм ОХ 19 (Вейля-Фелікса) і позитивна аглютинація з риккетсіями Провацка. Існує й інша думка, що хвороба Брілла - це реінфекція, т. Е. Повторному зараженню, а легкий перебіг обумовлено наявністю імунітету, набутого в результаті раніше перенесеного захворювання.

Профілактика. Ізоляція хворих і знищення вошей. Специфічна профілактика. В даний час розроблена хімічна вакцина, приготована з концентрованого поверхневого антигену риккетсій Провацка.

Ендемічний блошиний тиф

Збудники ендемічного висипного тифу були відкриті Х. Музера в 1928 р. і в його честь були названі риккетсіями Музера. Зараз їх називають *R. typhi*.

Морфологія. Дрібні кокковидної (в межах 1 мкм в діаметрі) або паличкоподібні (0,3-0,6×1,5 мкм) мікроорганізми. Вони менш поліморфні, ніж риккетсій Провацка. За способом Здродовского фарбуються в червоний колір. Грамнегативні.

Культивування. *Rickettsia typhi* добре розмножуються в желточном мішку курячого ембріона при температурі 35°C. Зростання характеризується утворенням бляшок. У членистоногих вони розмножуються в ядрі і цитоплазмі клітин епітелію кишечника.

Токсиноутворення. *Rickettsia typhi* утворюють ендотоксин, який відрізняється від токсину риккетсій Провацка, що можна виявити реакцією нейтралізації.

Антигенна структура. *Rickettsia typhi* мають два антигенних комплексу. Один - термостабільний - спільний з антигеном риккетсій Провацка і антигенами проти ОХ19 і ОХ2. Другий - термолабільних, видоспецифічний, який дозволяє диференціювати *Rickettsia typhi* від *Rickettsia provazekii*.

Стійкість до факторів навколишнього середовища. *Rickettsia typhi* мало стійкі в зовнішньому середовищі, але у висушеному стані і при низьких температурах вони довго зберігаються. Звичайні концентрації дезінфікуючих розчинів гублять їх швидко.

Сприйнятливість тварин. Ендемічним на висипний тиф хворіють гризуни, в основному миші і щури. З експериментальних тварин чутливі морські свинки, при внутрібрюшинном зараженні у них розвивається періорхіт (скротальний феномен).

Джерела інфекції. Ендемічний висипний тиф - зоонозна інфекція. Основними джерелами в природі є щури і миші.

Шляхи передачі. Трансмісивний, харчової, контактано-побутовий, Переносниками, можуть бути щурячі блохи і кліщі (кліщі передають рикетсій трансоваріально).

Патогенез. Ендемічний висипний тиф є кров'яну інфекцію. Патогенез подібний до патогенезу висипного тифу. Клінічно протікає легше. Хвороба характеризується лихоманкою і появою висипу. Захворювання носить ендемічний характер.

Імунітет. Після хвороби розвивається стійкий імунітет за рахунок антимікробних і антитоксичних захисних факторів.

Профілактика. Знищення комах, гризунів і поліпшення санітарно-гігієнічних умов. Специфічна профілактика здійснюється імунізацією вакциною, яка містить убиті *Rickettsia typhi*. Вакцинують людей, що живуть в ендемічних осередках і зазнали небезпеки зараження.

Лікування. Антибіотики тетрациклінового ряду.

Мікробіологічна діагностика. Лабораторна діагностика має велике значення для диференціації з епідемічним висипним тифом і хворобою Брілля. Використовуються серологічні реакції (РЗК, РА) зі специфічними антигенами. У складних випадках удаються до зараження самців морських свинок, у яких збудник ендемічного висипного тифу разом з лихоманкою викликає розвиток періорхита (скротальний феномен). Збудник епідемічного висипного тифу викликає тільки лихоманку, без виникнення орхіту.

Теоретичні питання:

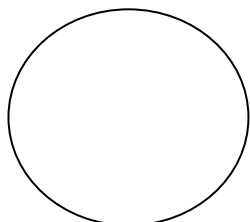
1. Таксономія *R. prowazekii*.
2. Класифікація рикетсіозів.
3. Морфологія і методи фарбування *R. prowazekii*.
4. Джерело інфекції і шляхи передачі збудника висипного тифу. Механізм передачі інфекції.
5. Патогенез. Матеріал для дослідження.
6. Методи лабораторної діагностики епідемічного висипного тифу.
7. Хвороба Брілля-Цинссера. Диференціація її від епідемічного висипного тифу.
8. Імунітет при епідемічному висипному тифі. Специфічна профілактика.
9. Джерело інфекції, шляхи передачі ендемічного висипного тифу.
10. Диференціація епідемічного і ендемічного висипного тифу.

Протокол № 22

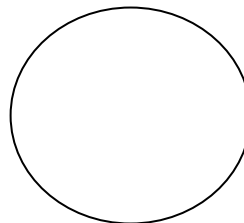
Тема: Мікробіологічна діагностика хламідіозів і мікоплазмозів.

Мета: Вивчення методів мікробіологічної діагностики, терапії і профілактики захворювань, викликаних хламідіями і мікоплазмами.

1. Мікроскопія і замальовання демонстраційних препаратів: мікоплазми у мазках із чистої культури, фарбовані за Романовським-Гімзою, цитоплазматичні включення хламідій у зіскобі з уретри (фарбування за Романовським-Гімзою).



Mycoplasma pneumoniae



Chlamydia trachomatis

(фарбування за Романовським-Гімзою)

2. Вивчення біологічних препаратів для лабораторної діагностики мікоплазмозів і хламідіозів:

- мікоплазмозний діагностикум для РЗК і РПГА;
- орнітозний діагностикум для РЗК;
- антитіла, мічені флюорохромами, для РІФ

3. Перелік патогенних видів:

хламідії: _____

мікоплазми: _____

4. Вивчення антибіотиків для лікування мікоплазмозів і хламідіозів: тетрацикліни, макроліди, фторхінолони.

5. Вивчення схем лабораторної діагностики мікоплазмозів і хламідіозів.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Хламідії відносяться до облігатних внутрішньоклітинних паразитів, що мають кокковидну форму, грамнегативні. Геном хламідій складає не більше 15% розміру генома кишкової палички. Хламідії не можуть синтезувати високоенергетичні сполуки і забезпечувати власні енергетичні потреби, але вони здатні самостійно синтезувати нуклеїнові кислоти, білки і ліпіди, що і дозволило віднести їх до бактерій. Поза клітинами хламідії мають сферичну форму (0,3 мкм), будучи елементарними тільцями. У середині клітин вони перетворюються на ретикулярні тільця, що діляться, утворюються їх скупчення-включення. У людини хламідії викликають трахому, орнітоз і ін. Добре забарвлюються за Романовським-Гімзою, їх можна виявити і темнопольною мікроскопією незабарвлених препаратів. Поза клітинами господаря метаболічні функції зведені до мінімуму і важкі для виявлення.

За сучасною класифікацією рід включає 3 види: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia pneumoniae*.

Життєвий цикл хламідій складний і включає утворення 2-х основних форм і зазвичай завершується протягом 40-72 годин.

Елементарне тільце (ЕТ) - дрібна (0,15-0,2 мкм) інфекційна позаклітинна форма. Характеризується поліморфізмом, метаболічно мало активне і адаптоване до позаклітинного виживання. ЕТ забезпечує передачу захворювання від людини (тварини) до людини (тварини), здатне адсорбуватися на чутливих епітеліальних клітинах і проникати в них за допомогою ендцитоза.

Ретикулярне тільце (РТ) - репродукційна внутрішньоклітинна форма. Крупнішу утворення (до 1 мкм), розвивається через 5-6 годин з ЕТ, що проникле в цитоплазму, зазнало структурні зміни і що перетворилося на ініціальне тільце (вегетативна форма). Після утворення РТ хламідійна клітина починає активно бінарно ділитися; тривалість циклу ділення складає 18-24 години. В результаті утворюються тільця - включення у вигляді вакуолей в цитоплазмі, що містять РТ, які діляться. Зазвичай прилягають до ядра клітини і їх можна виявити мікроскопією («шапочка» на ядрі).

Після РТ трансформується в проміжне тільце (ПТ), що нагадує бичаче око. ПТ трансформується в ЕТ. Вихід ЕТ супроводжується загибеллю клітини.

Збудник трахоми.

Трахома (від греч. trachys - нерівний, шорсткий) - хронічне інфекційне захворювання очей, що викликається *Chlamydiatrachomatis* та характеризується ураженням рогівки і кон'юнктиви з утворенням фолікулів (трахоматозних зерен), виразки яких приводить до рубцювання.

Збудник трахоми - *S. trachomatis*, відкритий в 1907 р. С. Провацеком и Л. Хальбершtedтером, відноситься до сімейства *Chlamydiaceae*, відділу *Gracilicutes*.

Морфологія і культивування. Збудник трахоми - грамнегативна дрібна бактерія; внутрішньоклітинний облигатний паразит. Розмножуючись в клітинах епітелію рогівки ока, утворює включення - тельця Провацека, що забарвлюються за Романовським-Гімзою у фіолетово-синій колір з червоними зернятками.

Культивується в курячих ембріонах, культурах клітин кон'юнктиви ока.

Антигенні властивості. Збудник трахоми має родоспецифічний, видо- і варіантоспецифічний антигени: серовари позначаються як *S. trachomatis* А, В, Ва, С.

Збудник відносно нестійкий, інактивується при дії фізичних і хімічних факторів.

Епідеміологія. Трахома відома давно; захворювання поширене повсюдно, є ендемічні вогнища; в даний час захворювання носить спорадичний характер. Хворіють тільки люди. **Джерело інфекції** - хворі і носії. Зараження відбувається контактно-побутовим (прямим або непрямим) шляхом - через руки, предмети ужитку (рушники, одяг й ін.).

Патогенез і клінічна картина. Захворювання пов'язане з ушкоджувальною дією хламідій на епітеліальні клітини кон'юнктиви і рогівки з подальшим розповсюдженням процесу на лежачі більш глибоко тканини.

Інкубаційний період складає 7-14 днів. Вражаються зазвичай обидва ока. На початку захворювання можуть з'являтися відчуття чужорідного тіла і відчуття паління в очах. Можливий і гострий початок: світлобоязнь, слизисто-гнійні виділення. Розвиваються кон'юнктивіт і кератокон'юнктивіт, що супроводжуються виразками і рубцюванням, що може привести до утворення більма і сліпоті.

Мікробіологічна діагностика. Збудник виявляється в цитоплазмі клітин епітелію кон'юнктиви у формі включень - тілець Хальбершtedтера-Провацека.

Найбільш простий спосіб виявлення *S. trachomatis* в досліджуваному матеріалі - фарбування зразків розчином Люголя, що виявляє скупчення глікогену. У забарвлених препаратах тельця - включення виглядають як одиночні коричневі округлі тіла, розташовані усередині клітин. Також хламідії можна офарблювати і за Романовським-Гімзою. Виділяють

збудники з зіскобів кон'юнктиви шляхом зараження курячого ембріона. Використовують РІФ для виявлення збудника в зіскобах кон'юнктиви або антитіл в сироватці хворого.

Лікування і профілактика. Найбільш ефективний тетрациклін у вигляді мазей, рифампіцин і сульфаніаміди. Специфічна профілактика відсутня. Неспецифічна профілактика полягає в проведенні освітньої роботи, контролі за дотриманням гігієнічних вимог в сімейних вогнищах.

Урогенітальний хламідіоз - значно поширене захворювання сечостатевого тракту, що викликається певними сероварами.

Таксономія. Бактерії, що відносяться до відділу Gracilicutes, роду Chlamydia.

Культуральні і біохімічні властивості збудників урогенітального хламідіоза ті ж, що і збудників інших хламідіозів (трахома, орнітоз й ін.).

Антигенні властивості. Збудники урогенітального хламідіоза по антигенних властивостях належать до сероварів *S. trachomatis*, що позначається від D до K включно.

Епідеміологія. Антропонозна інфекція. *Джерело* - хворі люди, головним чином жінки, з малосимптомним перебігом хвороби. *Механізм зараження* - статевий. Передача інфекції відбувається статевим шляхом, але можливий і контактно-побутовий шлях (при купанні в басейні хламідії проникають в кон'юнктиву). Хламідії можуть інфікувати плід під час вагітності хворої матері.

Патогенез. Хламідії проникають через слизисті оболонки урогенітального тракту, а також через кон'юнктиву. Збудники викликають запалення уретри, шийки матки, придатків, передміхурової залози, кон'юнктиви.

Клінічна картина. Тривалість інкубаційного періоду 7-14 днів. З'являються виділення, свербіння, гіперемія слизистих оболонок. Захворювання часто переходить в хронічну форму.

Імунітет після одужання не формується.

Мікробіологічна діагностика. Методи дослідження: культуральний (на культурі клітин), серологічний (ІФА, РПГА, РЗК з парними сироватками). Найчастіше застосовують РІФ і ІФА для виявлення хламідійного антигена у виділеннях із слизистих оболонок.

При кон'юнктивіті застосовують мікроскопію зіскоба кон'юнктиви для виявлення внутрішньоклітинних включень - тілець Провацека-Хальбершtedтера.

Лікування. Антибіотики широкого спектру дії.

Профілактика неспецифічна.

Венерична лімфогранульома - захворювання статевих органів і регіонарних лімфатичних вузлів, що викликається *S. trachomatis* сероварів L₁ і L₂, тобто збудник ВЛГ відрізняється від інших хламідій тільки по антигенних властивостях.

Епідеміологія. Джерело інфекції - хвора людина. Зараження відбувається переважно статевим шляхом, рідше через предмети ужитку. Зустрічається в країнах з жарким і вологим кліматом, відрізняється високою контагіозністю.

Патогенез і клінічна картина. Вхідні ворота - слизиста оболонка статевих органів. Інкубаційний період - до 30 днів. На статевих органах з'являються папули, виразки. Збільшуються регіонарні лімфатичні вузли.

Імунітет після захворювання стійкий.

Мікробіологічна діагностика: використовують бактеріологічний і серологічний методи.

Лікування - антибіотики.

Профілактика неспецифічна.

Збудник мікоплазмозу. Мікоплазмоз - інфекційна хвороба, що викликається *Mycoplasma pneumoniae*. Збудник вперше виділений в 1944 р.

М. Ітоном і віднесений до вірусів, тільки в 1962 р. ідентифікований як мікоплазма.

Збудник відноситься до відділу Tenericutes, сімейства Mycoplasmataceae, роду Mycoplasma; M. pneumoniae - єдиний вид цього роду, патогенність якого для людини доведена.

Морфологія. Мікоплазми є дрібними сферичними і ниткоподібними клітинами. У них відсутня ригідна клітинна оболонка, замість якої вони покриті тришаровою мембраною. Завдяки цьому мікоплазми можуть міняти форму і навіть проходити через бактерійні фільтри. Мікоплазми резистентні до пеніциліну, але тетрациклін і еритроміцин пригнічують їх зростання. Культивуються на сироватковому агарі з додаванням ацетату талія для пригнічення сторонньої флори (при первинному посіві матеріалу від хворого на щільному середовищі через 1-2 тиж зростають дрібні колонії з втягнутим в середу центром, що нагадують яєчню).

Джерелом інфекції є людина, хвора на пневмонію, або носій. Захворювання розповсюджується повітряно-краплинним шляхом. Матеріалом для дослідження може служити мокрота і носоглотковий слиз. Діагноз може бути також підтверджений серологічними методами (РЗК, РІФ, РПГА).

Етіотропне лікування здійснюється антибіотиками (еритроміцин і тетрациклін).

Специфічна профілактика не розроблена.

Збудник негонококових уретритів. Ureaplasma urealyticum раніше відносилась до роду Mycoplasma.

Морфологія. В даний час виділяють 3 основних типи: дрібні (120-150 нм) з гомогенною цитоплазмою, що включає значну кількість рибосом; середні (500-750 нм), такі, що характеризуються периферичним розташуванням рибосом; великі з негомогенною цитоплазмою і вираженим генофором.

Культуральні властивості. Особливість уреаплазм - здатність до швидкого зростання в оптимальних умовах. Температурний оптимум 37 °С, при незначному залужуванні середовища клітини швидко гинуть. Факультативні анаероби. Для культивування використовують середовища, що містять гідролізат бичачого серця, гідролізат казеїну і ін. Середовища доповнюють внесенням 10 % кінської сироватки. Розмноження збудника в рідких середовищах приводить до зміни забарвлення середовища з лимонно-жовтого на синє. Життєздатність клітин в рідких культурах не перевищує 3-5 діб. Для культивування використовують серцево-мозковий агар, середовище Клодницького, сироватковий бульйон і культуру клітин.

Епідеміологія. Результати численних досліджень, направлених на виявлення Ureaplasma urealyticum у хворих і клінічно здорових, показують на інфікованість 25-80 % осіб, ведучих активне статеве життя і що мають 3-х і більше партнерів. **Шлях передачі** - статевий. **Основний резервуар** - хворі особи.

Мікробіологічна діагностика. Основний метод діагностики уреаплазмозів - метод визначення уреазної активності (утворення аміаку з сечовини). З серологічних методів використовують РЗК і РНГА з сироваткою крові хворого.

Лікування. Тетрациклін, макроліди і фторхінолони.

Теоретичні питання:

1. Збудники.

Властивості. Резистентність.

Патогенність для людини і тварини. Фактори патогенності, токсини.

2. Патогенез захворювання у людини, імунітет.

3. Мікробіологічна діагностика.

4. Специфічна профілактика і лікування.

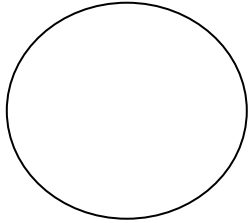
Протокол № 23

Тема: Санітарна мікробіологія.

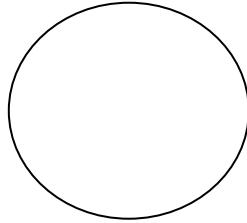
Санітарно-мікробіологічне дослідження води та повітря.

Мета: Засвоєння практичних навичок визначення санітарних показників води та повітря.

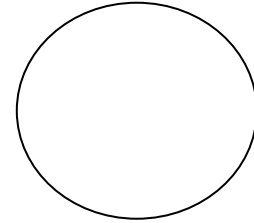
1. Мікроскопія і замалювання демонстраційних препаратів чистої культури бактерій-показників фекального забруднення води (фарбування за Грамом).



()

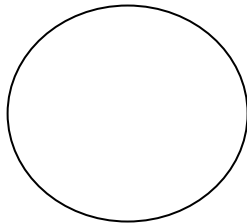


()

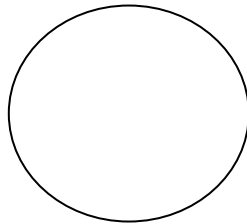


()

2. Мікроскопія і замалювання демонстраційних препаратів чистої культури бактерій-показників забруднення повітря (фарбування за Грамом).



()



()

3. Вивчення росту культури мікробів – показників фекального забруднення води:

а) кишкова паличка на МПБ, МПА і на агарі Ендо;

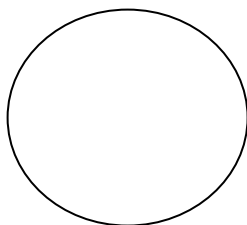
б) ентерокок на цукровому бульйоні;

в) *S. perfringens* на молоці під олією, на середовищі Кітт-Тароці.

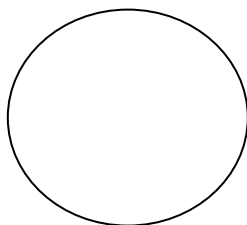
4. Вивчення середовища для визначення колі-титру (середовище Буліра до і після посіву кишкової палички, середовище Ейкмана).

5. Демонстрація фільтру для визначення колі-індексу води.

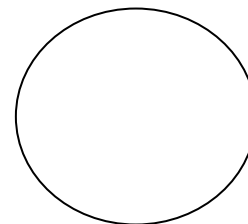
6. Приготування мазків із культури мікробів – показників фекального забруднення води, фарбування їх за Грамом, замалювання.



()



()



()

7. Посів води для визначення загального мікробного числа води: у чашку вносять по 1 мл нерозбавленої і розбавленої у 10 разів води, потім заливають розбавленим і охолодженим до 45° С агаром.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Санітарна мікробіологія - розділ медичної мікробіології, що вивчає мікроорганізми, які містяться в навколишньому середовищі і здатні надавати несприятливу дію на стан здоров'я людини. Вона розробляє мікробіологічні показники гігієнічного нормування, методи контролю за ефективністю знезараження об'єктів навколишнього середовища, а також виявляє в об'єктах навколишнього середовища патогенні, умовно-патогенні і санітарно-показові мікроорганізми. Виявлення патогенних мікроорганізмів дозволяє дати оцінку епідеміологічної ситуації і прийняти відповідні заходи з боротьби і профілактики інфекційних захворювань. Умовно-патогенні мікроорганізми здатні викликати гнійно-запальні процеси в ослабленому організмі. Крім того, вони можуть потрапляти в продукти харчування, швидко розмножуватися з накопиченням великої кількості мікробних клітин і їх токсинів, викликаючи у людей харчові отруєння мікробної етіології. Санітарно-показові мікроорганізми (СПМ) використовують для непрямого визначення можливої присутності в об'єктах навколишнього середовища патогенних мікроорганізмів. Їх наявність свідчить про забруднення об'єкту виділеннями людини і тварин.

СПМ повинні відповідати наступним вимогам:

- 1) повинні мешкати тільки в організмі людей і тварин і виявлятися в їх виділеннях;
- 2) не повинні розмножуватися або мешкати в ґрунті і воді;
- 3) терміни їх виживання і стійкість до різних факторів після виділення з організму в навколишнє середовище повинні бути рівними або перевищувати такі у патогенних мікроорганізмів;
- 4) їх властивості повинні бути типовими і такими, що легко виявляються для їх диференціації;
- 5) методи їх виявлення і ідентифікації повинні бути простими, економічно доступними;
- 6) у навколишньому середовищі не повинно бути схожих мешканців - мікроорганізмів.

Основними завданнями санітарної мікробіології є:

1. Розробка і вдосконалення мікробіологічних методів дослідження об'єктів навколишнього середовища (води, повітря, ґрунту, харчових продуктів, предметів ужитку);
2. Вивчення джерел забруднення навколишнього середовища різноманітною мікрофлорою, що представляє небезпеку для людини;
3. Вивчення життєдіяльності мікрофлори в навколишньому середовищі, особливо в умовах її хімічного і біологічного забруднення;
4. Розробка нормативів для гігієнічної оцінки об'єктів навколишнього середовища, в т.ч. харчових продуктів;
5. Розробка заходів щодо оздоровлення об'єктів навколишнього середовища і контроль за ефективністю цих заходів, включаючи контроль за якістю водопостачання, роботою підприємств харчової промисловості і громадського харчування, ефективністю знезараження стічних вод, викидів та ін.

Забрудненість ґрунту, води, повітря і інших об'єктів визначається по загальному мікробному числу і виявленню СПМ - індикаторів наявності виділень людини або тварин. У воді реєструють кишкову паличку, бактерії групи кишкової палички (БГКП) (коліформні палички), ентерокок, стафілокок; у ґрунті - кишкову паличку, БГКП, клостридії перфрінгенс, термофіли; на предметах ужитку - БГКП, золотистий стафілокок, ентерокок.

Вода - природне місце існування для різноманітних мікроорганізмів. У воді річок, відкритих водоймищ, морів, океанів виявляють представників усіх таксономічних груп

бактерій, а також гриби, водорості і найпростіші. Сукупність всіх мікроорганізмів, що заселяють водоймища, позначають терміном “мікробіологічний планктон”.

Мікрофлора водоймища залежить від речовин, що містяться в ній, і від біоценоза, тобто від видового складу і чисельності інших живих істот. Так, фаги, що знаходяться у воді, та найпростіші знищують бактерії. Мікроорганізми, здатні утворювати антибіотики, викликають загибель інших бактерій, чутливих до цих речовин.

При визначенні мікробного забруднення води розраховують колі-титр і колі-індекс. Колі-титр води вимірюється мінімальною кількістю води (мл), в якій виявляються БГКП, колі-індекс - кількістю БГКП, що містяться в 1 л досліджуваної води. Ці показники визначають титраційним (бродильним) методом або методом мембранних фільтрів. При титраційному методі проводять виділення і ідентифікацію бактерій на живильних середовищах. При методі мембранних фільтрів воду спочатку фільтрують, використовуючи колбу Бунзена з вмонтованою в неї воронкою Зейтца з мембранним фільтром: за допомогою вакууму проганяють воду через фільтри, які потім поміщають на поверхню живильного середовища в чашки Петрі. Після інкубації в термостаті підраховують кількість колоній, що виростили, типових для БГКП, а потім за допомогою біохімічних тестів проводять їх ідентифікацію.

Санітарно-мікробіологічний контроль якості питної води.

Санітарно-мікробіологічне дослідження питної води включає визначення загального мікробного числа (ЗМЧ), кількості ентеробактерій, спор сульфітредукуючих клостридій і коліфагів.

Визначення ЗМЧ при оцінці якості питної води. Загальне мікробне число - кількість мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних бактерій в 1 см³ (1 мл) води - визначають для всіх видів води. Досліджувану воду вносять по 1 мл в дві стерильні чашки Петрі і заливають розплавленим і остигшим живильним агаром (метод глибинного посіву). Інкують при 37°C 24 год, після чого при кімнатній температурі ще 24 год. Підраховують на 2-х чашках число колоній (на поверхні і в глибині живильного агару), що виростили, і розраховують середнє арифметичне значення. Для виявлення цвілевих і дріжджових грибів досліджувану воду засівають по 0,5 мл на середовище Сабуро і інкують при кімнатній температурі протягом 3-4 діб. Підраховують число колоній, що виростили, і також розраховують середнє арифметичне. Результат (ЗМЧ) обчислюють шляхом підсумовування середнього арифметичного числа бактерій, дріжджових і цвілевих грибів і виражають в колонієутворюючих одиницях (КУО/мл).

ЗМЧ дозволяє оцінити рівень мікробного забруднення води, доповнюючи показники фекального забруднення, і одночасно дозволяє виявити забруднення з інших джерел (наприклад, промислові скидання). Несподіване збільшення ЗМЧ (навіть в межах нормативу), виявлене повторно, служить сигналом для пошуку причини забруднення. Також цей показник незамінний для термінового виявлення в питній воді масивного мікробного забруднення невідомої природи.

Визначення кількості ентеробактерій. Присутність ентеробактерій (коліформних бактерій) також визначають у всіх видах води. Поняття коліформні бактерії включає бактерії сімейства Enterobacteriaceae і термотолерантні коліформні бактерії.

До бактерій групи кишкової палички (БГКП) відносяться грамнегативні палички, що не утворюють спору, ферментують лактозу з утворенням кислоти і газу при 37±0,5 °С протягом 24 - 48 годин або ферментують глюкозу з утворенням кислоти і газу при 37±0,5 °С протягом 24 годин, і що не володіють оксидазною активністю. Виявлення в питній воді бактерій сімейства Enterobacteriaceae указує на потенційну епідемічну небезпеку водокористування. Показник «бактерії сімейства Enterobacteriaceae» - основний нормований

показник, забезпечуючий найбільш надійний контроль присутності у воді практично всіх представників кишкових бактерій.

Термотолерантні коліформні бактерії володіють тими ж характеристиками, але додатково зброджують лактозу з утворенням кислоти і газу при 44,5 °С через 24 год. Термотолерантні коліформні бактерії швидко відмирають у зовнішньому середовищі, тому їх виявлення свідчить про свіже фекальне забруднення води.

Виявлення у воді БГКП слід розглядати як показник фекального забруднення води, а їх кількість дозволяє судити про ступінь цього забруднення.

Кількість БГКП визначають двома методами:

1. *Бродильний метод.* Суть методу полягає в посіві певних об'ємів аналізованої води і підрощуванні при 37 °С в середовищах накопичення (глюкозо-пептонне середовище (ГПС) Ейкмана або середовище Кесслера (лактозо-пептонна вода з жовчю і генціанвіолетом для пригнічення росту грампозитивних бактерій)) з подальшим висівом бактерій на середовище Ендо, диференціюванням бактерій, що вирости, і визначенням найбільш вірогідного числа БГКП в 1 л води (колі-індекс). При виявленні бактерійного забруднення води вище допустимих норм повинен проводитися повторний відбір проб з додатковим дослідженням на наявність бактерій-показників свіжого фекального забруднення. Свіже фекальне забруднення у воді встановлюють, визначаючи наявність грамнегативних термотолерантних коліформних бактерій, фекальних кишкових паличок, ферментуючих лактозу до кислоти і газу при температурі 43- 44°С протягом 24 годин у присутності інгібіторів сторонньої мікрофлори (0,32 % борної кислоти) і що не ростуть на цитратному середовищі Симонса або Козера. Про свіже фекальне забруднення свідчить також виявлення ентерокока. На давнє фекальне забруднення указує відсутність БГКП і наявність певної кількості клостридії перфрінгенс, тобто найбільш стійких спороутворюючих бактерій.

Відповідно до нормативних документів (Державних стандартів) регламентуються наступні показники питної води при централізованому водопостачанні:

- Загальне мікробне число води (кількість всіх мікроорганізмів, що виявляються в 1 мл води) - не повинно перевищувати 100 мікробів в 1 мл досліджуваної води;
- Колі-титр води (найменший об'єм води, в якому виявляються БГКП) - не менше 300 мл;
- Колі-індекс (кількість БГКП в 1 л води) - не більше 3;
- Загальні коліформні бактерії, термотолерантні коліформні бактерії, коліфаги, кишкова паличка - повинні бути відсутніми в 100 мл досліджуваної води.

2. *Метод мембранних фільтрів.* Для цього методу застосовують мембранні ультрафільтри з нітроцелюлози, не проникні для кишкової палички. Фільтри стерилізують шляхом кип'ячення, потім закладають у воронку фільтру Зейтца, вмонтовану в колбу, сполучену з насосом Камовського. Через фільтр пропускають певний об'єм води (1 л), потім виймають фільтр і поміщають його в чашку з середовищем Ендо так, щоб він прилягав до середовища нижньою стороною. Чашку поміщають в термостат при $t=37$ °С на добу. Так, наприклад, якщо на фільтрі спостерігається зростання двох колоній *E. coli*, то колі-титр буде рівний 500, а колі-індекс - 2.

Основне завдання санітарно-бактеріологічного дослідження повітря - гігієнічна і епідеміологічна оцінка повітряного середовища, а також розробка комплексу заходів, направлених на профілактику аерогенної передачі збудників інфекційних хвороб. При оцінці санітарного стану закритих приміщень залежно від завдань дослідження визначають ЗМЧ, наявність СПМ (стафілококів, альфа- і бета-гемолітичних стрептококів, що є показниками контамінації мікрофлорою носоглотки людини).

Мікрофлора повітря закритих приміщень одноманітніша, порівняно з мікрофлорою атмосферного повітря, і відносно стабільніша. Серед мікроорганізмів домінують мешканці

носоглотки людини, зокрема патогенні види, що потрапляють в повітря при кашлі, чханні або розмові. Основне джерело забруднення повітря патогенними видами - бактеріоносії. Рівень мікробного забруднення залежить головним чином від щільності заселення, активності руху людей, санітарного стану приміщення, зокрема пилової забрудненості, вентиляції, частоти провітрювання, способу прибирання, ступеня освітленості і інших умов. Самоочищення повітря закритих приміщень не відбувається.

Умови циркуляції мікроорганізмів в повітрі. Контамінація повітря патогенними мікроорганізмами відбувається в основному краплинним шляхом у складі аерозоля, що утворюється при розмові, кашлі, чханні. Рідше мікроби потрапляють в повітря з епітелієм шкірних покривів, що злущується, з пилом забрудненої постільної білизни і зараженого ґрунту. Аерозоль є колоїдною системою, що складається з повітря, крапельок рідини або твердих частинок, що включають різні мікроорганізми. Розмір аерозольних частинок може бути різним (від 10-100 до 2000 нм). При чханні може утворюватися до 40 000 крапель. Залежно від розміру крапель, їх електричного заряду, швидкості руху в повітрі виділяють три основні фази бактерійного забруднення.

Краплинна, або крупноядерна фаза складається з бактерійних клітин, оточених водно-сольовою оболонкою. Діаметр частинок близько 0,1 мм і більше. Частинки осідають досить швидко: тривалість перебування в повітрі складає декілька секунд, а швидкість переміщення - в середньому 30 см/с.

Дрібноядерна фаза утворюється при висиханні частинок і складається з бактерійних клітин, що зберегли тільки хімічно зв'язану воду на своїй поверхні і вільну воду усередині клітин. У цій фазі частинки мають найменші розміри, легко переміщуються потоками повітря, тривалий час знаходяться в ньому в зваженому стані. Це найбільш стійка фаза, оскільки діаметр більшості частинок не перевищує 0,05 мм, а швидкість осідання частинок складає в середньому 0,013 см/с. При цьому швидкість їх пересування перевищує 30 см/с, тому вони можуть розсіюватися на великі відстані. Ця фаза представляє найбільшу епідеміологічну небезпеку, оскільки в її складі розповсюджуються більшість збудників повітряно-краплинних інфекцій, особливо малостійких до зовнішніх факторів (наприклад, збудник кашлюку).

Фаза «бактерійного пилу». З перших двох фаз бактерії можуть переходити до складу крупніших частинок, що осідають у вигляді пилу на різних предметах, утворюючи так званий «бактерійний пил». Його важлива властивість - здатність легко диспергуватися під впливом навіть малих потоків повітря. Розмір частинок варіює від 0,01 до 1 мм. Залежно від розміру частинок і швидкості повітряних течій, швидкість їх переміщення знаходиться в межах 0,5-30 см/с. Унаслідок тривалого перебування в зваженому стані і здатності частинок проникати в дистальні відділи легенів, дрібнодисперсний «бактерійний пил» також представляє епідеміологічну небезпеку. Ця фаза бактерійного аерозолю переважає в повітрі житлових приміщень і з нею розсіваються патогенні мікроорганізми, стійкі до висушування (мікобактерії, клостридії, стафілококи, стрептококи, гриби).

Санітарно-показові мікроорганізми (СПМ) повітря закритих приміщень. До СПМ повітря відносять золотистий стафілокок, стрептококи, грамнегативні бактерії, гриби. Санітарно-мікробіологічні показники повітря нормуються залежно від типу і призначення приміщень.

В повітрі лікарняних приміщень домінують золотистий стафілокок і стрептококи. При цьому в 1 м³ повітря операційних залів, післяопераційних палат, перев'язувальних, відділень реанімації, пологових залів вони повинні бути відсутніми.

У зв'язку із зростанням частоти захворювань, що викликаються грамнегативними бактеріями, в нормативи включено визначення їх кількості в 1 м³ повітря приміщень лікувальних установ.

Особливий випадок - повітря аптечних приміщень, де із-за наявності антимікробних препаратів можуть швидко гинути бактерії, але зберігатися гриби, тому їх обов'язково необхідно виявляти при дослідженні повітря аптек.

Методи виділення мікроорганізмів з повітря. Відомо два методи забору проб для бактеріологічного аналізу повітря. Найпростіший, такий, що не вимагає спеціальної апаратури, - метод седиментації Коха, за яким про ступінь мікробного обсіменіння судять по кількості колоній, що вирости, на МПА в чашці Петрі після того, як 2 чашки витримують відкритими на повітрі протягом 30 хв, потім посіви інкубують в термостаті при 37°C і виявляють видову приналежність мікроорганізмів. Найчастіше в повітрі визначають ЗМЧ (застосовують чашки з МПА), вміст стафілококів (застосовують чашки з жовтково-сольовим агаром), за епідемічними показаннями визначають вміст стрептококів (застосовують чашки з кров'яним агаром). При обстеженні повітря аптек проводять визначення вмісту грибів, використовуючи чашки з середовищем Сабуро. Результати оцінюють за сумарним числом колоній, що вирости на обох чашках. При спокійному стані повітря на площу 100 см² осідає стільки мікроорганізмів, скільки їх міститься в 0,01 м³ повітря. Цей метод використовується як орієнтувальний. Визначення мікробного числа повітря проводять за формулою Омелянського:

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

де а - кількість колоній, що вирости на чашці; b - площа чашки; t - час протягом якого чашка була відкрита; 5 - час за розрахунком Омелянського; 10 - об'єм повітря (у літрах), з якого проходить осідання мікробів за 5 хв; 100 - площа в см², на яку відбувалося осідання; 1000 - шуканий об'єм повітря в літрах.

Досконалішим є **аспіраційний метод** з використанням апарату Кротова, який заснований на ударній дії струменя повітря. Принцип дії приладу заснований на механічному прокачуванні повітря через клиновидну щілину в кришці, розташовану над поверхнею живильного середовища в чашці Петрі, що обертається. За 1 хв через вузьку щілину пластини плексигласу пропускається 25 л повітря, мікроби з якого осідають на поверхню живильного середовища в чашці Петрі, при цьому завдяки постійному обертанню чашки під вхідною щілиною, мікроорганізми рівномірно фіксуються по всій поверхні середовища. Як живильне середовище для визначення мікробного числа використовується МПА, а для визначення СПМ - кров'яний агар. Великою перевагою цього методу є можливість посіви визначеного об'єму повітря.

Після інкубації посіви в термостаті підраховують кількість колоній і проводять розрахунок мікробного числа за формулою:

$$x = \frac{a \times 10000}{V},$$

де а - кількість колоній, що вирости на чашці; V - об'єм пропущеного повітря через прилад, дм³; 1000 - шуканий об'єм повітря, дм³.

Основні показники санітарного стану повітря.

Загальне мікробне число (ЗМЧ) повітря - кількість колонієутворюючих одиниць (КУО) в 1 м³ повітря (підраховують колонії, що зростають на поверхні живильного агару при посіви певного об'єму повітря і інкубації протягом 24 год при 37 °C і 24 год при кімнатній температурі).

Присутність *Staphylococcus aureus*. У певному об'ємі повітря визначають наявність золотистого стафілокока (повітря засівають на жовтково-сольовий агар, де зростають характерні колонії грампозитивних коків, що володіють ферментом плазмокоагулазою).

Присутність грибів. Визначають наявність в повітрі дріжджеподібних і цвілевих грибів - підраховують кількість колоній, що зростають на середовищі Сабуро за 96 год при 22-28 °С.

Присутність патогенних мікроорганізмів. За епідеміологічними показаннями в повітрі визначають наявність сальмонел, мікобактерій, вірусів.

Індекс санітарно-показових мікроорганізмів - кількість золотистого стафілокока і гемолітичних стрептококів в 1 м³ повітря. Ці бактерії є представниками мікрофлори верхніх дихальних шляхів і мають загальний шлях виділення з патогенними мікроорганізмами, що передаються повітряно-краплинним шляхом.

Теоретичні питання:

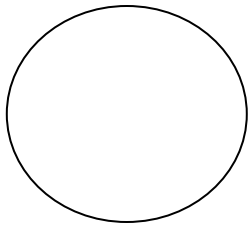
1. Предмет, методи і об'єкти вивчення санітарної мікробіології.
2. Які санітарно-показові мікроорганізми використовують для характеристики об'єктів навколишнього середовища при санітарно-мікробіологічних дослідженнях? Які пред'являють до них вимоги? Яке вони мають значення для характеристики об'єктів навколишнього середовища?
3. У чьому складаються принципи санітарно-мікробіологічних досліджень об'єктів навколишнього середовища?
4. Вода як середовище мешкання і збереження мікроорганізмів, автохтонна і алохтонна мікрофлора відкритих водоймищ.
5. Що таке сапрофітність? Які мікроорганізми є показниками процесу самоочищення води?
6. У чьому складається санітарно-мікробіологічний контроль якості питної води?
7. Які використовуються методи для санітарно-мікробіологічного дослідження води?
8. Які санітарно-показникові мікроорганізми використовують при оцінці якості питної води?
9. Які вимоги СанПіна (санітарних правил і нормативів) до питної води?
10. Чи є повітря приємним середовищем для розвитку мікроорганізмів?
11. Яка роль повітря у передаванні інфекційного захворювання?
12. Дайте характеристику мікрофлори повітря.
13. У яких установах проводять планові дослідження мікрофлори повітря?
14. Назвати санітарно-показові мікроорганізми повітря закритого приміщення, методи їх виявлення.
15. Які критерії оцінки повітря у закритих приміщеннях?

Протокол № 24

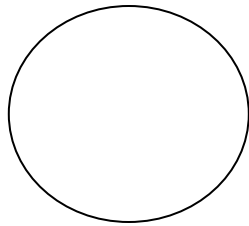
Тема: *Клінічна мікробіологія. Внутрішньолікарняні інфекції.*

Мета: *Вивчення поняття клінічної мікробіології, ознайомлення з методами профілактики шпитальних інфекцій.*

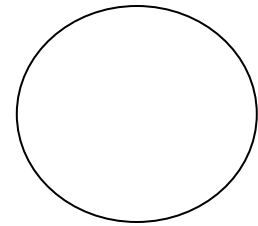
1. Мікроскопія і замальовання демонстраційних препаратів чистої культури патогенних і умовно-патогенних бактерій – збудників внутрішньолікарняних інфекцій:



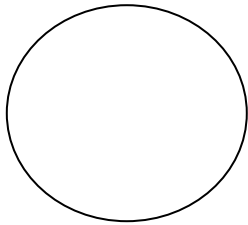
()



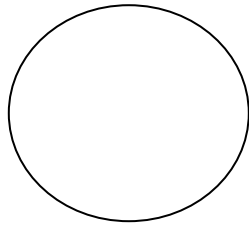
()



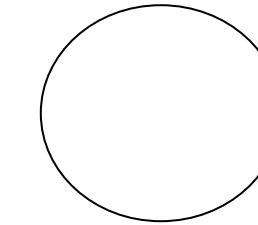
()



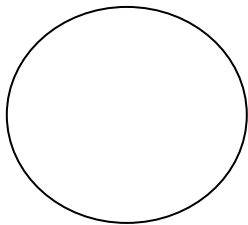
()



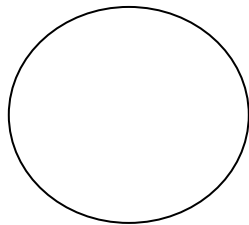
()



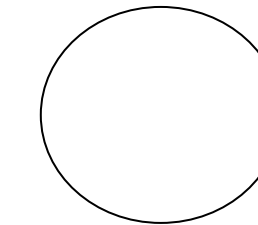
()



()



()



()

2. Вивчення етіології, патогенезу і мікробіологічної діагностики шпитальних інфекцій, викликаних патогенними і умовно-патогенними мікроорганізмами.

3. Вивчення мікробіоценозів здорових і патологічно змінених біотопів тіла людини.

4. Дизбактеріози (дизмікробіоценози): умови виникнення, класифікація, методи діагностики і санації (реабілітації).

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Клінічна мікробіологія - це розділ медичної мікробіології, присвячений вивченню захворювань, викликаних умовно-патогенними мікроорганізмами. Розвиток подібних захворювань пов'язаний зі зниженням імунного статусу людини, розвитком імунодефіцитних станів, інтенсивною антибіотикотерапією, порушенням екологічного балансу у складі нормальної мікрофлори і ін. Дані інфекції нерідко виникають у хворих в хірургічних, дитячих і інших відділеннях, а також серед новонароджених в акушерських клініках. У цих випадках їх називають внутрішньолікарняними або шпитальними інфекціями. Таким чином, захворювання, пов'язані з наданням медичної допомоги, позначають терміном ятрогенія, внутрішньолікарняні (нозокоміальні) інфекції.

Завдання клінічної мікробіології - вдосконалення лабораторних методів бактеріологічної діагностики, вивчення ролі окремих видів умовно-патогенних мікроорганізмів і їх асоціацій в етіології, патогенезі запальних процесів екзогенного і ендогенного походження, обґрунтування методів раціональної специфічної і неспецифічної терапії, а також розробка методів профілактики.

Значення клінічної мікробіології в роботі лікаря: знання про видовий склад мікрофлори при гнійно-запальних захворюваннях і внутрішньолікарняних інфекціях, про частоту стійких до антибіотиків штамів, причини антибіотикостійкості, ступінь вірулентності мікроорганізмів і факторів, що їх визначають, має велике значення для розробки профілактики і лікувальних методик.

Епідеміологія. Практично будь-який пацієнт стаціонару схильний до розвитку інфекційних процесів. Внутрішньолікарняні інфекції (ВЛІ) характеризує висока контагіозність, можливість спалахів у будь-яку пору року, наявність пацієнтів з підвищеним ризиком захворювання, можливість рецидивів, а також широкий спектр збудників. Особливості епідемічного процесу визначають вид етіологічного агента і тип стаціонару.

Серед хворих на ВЛІ виділяють три групи пацієнтів:

- 1) пацієнти, інфіковані усередині стаціонару;
- 2) пацієнти, інфіковані в умовах поліклінік;
- 3) медичний персонал, що заразився при роботі в умовах стаціонару або поліклінік.

Розповсюдженню внутрішньолікарняних інфекцій сприяють порушення правил асептики, будь-які відхилення від санітарно-гігієнічних норм для стаціонарів і поліклінік, а також значна частота носійства патогенної флори серед медичного персоналу.

Етіологія: Спектр збудників ВЛІ надзвичайно широкий і включає віруси, бактерії, гриби і простіші. Основні збудники бактерійних інфекцій - стафілококи, пневмококи, грамнегативні ентеробактерії, псевдомонади і анаероби. На сучасному етапі провідну роль грають стафілококи (60% випадків всіх внутрішньолікарняних інфекцій), грамнегативна мікрофлора, респіраторні віруси і гриби роду *Candida*. Механізми передачі збудників: фекально-оральний, повітряно-краплинний, трансмісивний, побутовий і ятрогенний (в результаті лікувальних і діагностичних процедур).

Штами бактерій, виділені від пацієнтів з нозокоміальними інфекціями, як правило, більш вірулентні і володіють більшою стійкістю до антибактеріальних препаратів. У лікувально-профілактичних установах має місце постійна зміна видового складу збудників внутрішньолікарняних інфекцій за рахунок занесення із зовні, що вимагає постійного контролю за мікробним біоценозом і визначення чутливості до антибіотиків.

Основними джерелами шпитальних інфекцій є хворі, носії, відвідуючі лікувальні установи, і медичні працівники. Роль осіб, повернутих до догляду за хворими, і відвідувачів, що відвідують хворих, у край обмежена.

Клінічні прояви: визначаються локалізацією процесу, кількістю і вірулентністю штамів, що проникли.

Первинні симптоми розвиваються швидко, часто раптово. Перший прояв - підвищенні температури.

Діагностика: Інфекцію слід вважати ятрогенною, якщо вона розвинулася після медичного втручання або відвідування лікувально-профілактичних установ через проміжок часу тривалістю не менш мінімального інкубаційного періоду. Для опортуністичних інфекцій він складає 2-4 діб. Непрямою ознакою розвитку ятрогенної інфекції є раптовий підйом температури у пацієнта, що піддався якій-небудь процедури. Для постановки остаточного діагнозу слід провести забір відповідних проб і провести їх бактеріологічне дослідження.

При заборі зразків для бактеріологічного дослідження необхідно дотримувати наступні правила: 1) зразки слід забирати в стерильні контейнери з дотриманням правил асептики, оскільки потенційним збудником може бути будь-який мікроорганізм; 2) необхідна максимально швидка доставка матеріалу в лабораторію; 3) відбір проб слід проводити регулярно.

При підозрі на конкретне захворювання слід широко використовувати серологічні тести.

Терапія: найважливіша складова специфічної терапії у шпиталізованих пацієнтів з підвищеним ризиком розвитку інфекції - їх профілактика. Украй необхідні часта зміна пов'язок, дренивання і санація ран, забезпечення чистоти навколишнього середовища; слід проводити постійний контроль за носійством потенційно патогенних мікроорганізмів серед медичного персоналу і призначати превентивну санацію при їх виявленні.

Критерії оцінки етіологічної ролі умовно-патогенних мікроорганізмів, виділених з патологічних вогнищ:

1. Віділення мікроорганізмів із крові, спино-мозкової рідини або іншої рідини організму, які у нормі у здорових людей є стерильними.

2. Виявлення у дослідному матеріалі, особливо при дизбактеріозах, умовно-патогенних мікроорганізмах у достатньо великих кількостях (наприклад, $10^5 - 10^7$ мікробних тіл у 1мл). Для цього проводять кількісне визначення мікроорганізмів за числом колонієутворюючих одиниць (КУО) у 1г або 1 мг дослідженого зразку. Ці кількісні показники можуть варіювати в залежності від виду мікроорганізму, типу дослідного матеріалу, характеру і стадії захворювання.

3. Повторне, багаторазове (протягом доби або через добу) виділення тієї ж самої культури мікроорганізму із того ж самого матеріалу від хворого (наприклад, із крові при сепсисі).

4. Виявлення ідентичних умовно-патогенних мікроорганізмів у різних зразках матеріалу (наприклад, при харчових токсикоінфекціях – у промивних водах шлунку, блювотних масах, випорожненнях, харчових продуктах).

5. Нарощування титру антитіл у 4 і більше рази у парних сироватках крові хворого у відношенні умовно-патогенного мікроорганізму, який підозрюється як збудник даного патологічного процесу.

6. Позитивні шкіряно-алергічні реакції у хворих з алергенами, приготованими із умовно-патогенного мікроорганізму.

Теоретичні питання:

1. Поняття клінічна мікробіологія і шпитальні інфекції.
2. Поняття ятрогенні інфекції.
3. Причина виникнення і джерело внутрішньолікарняних інфекцій.
4. Мікроорганізми – збудники внутрішньолікарняних інфекцій.
5. Розбір схем лабораторної діагностики внутрішньолікарняних інфекцій.
6. Нормальна мікрофлора організму людини.
7. Дизбактеріоз.

Протокол № 25

Тема: Підсумкове заняття № 5. Спеціальна, клінічна та екологічна мікробіологія (частина II).

Питання для самопідготовки студентів медичного і стоматологічного факультетів.

1. Збудники анаеробної інфекції ран, властивості, класифікація. Патогенез і мікробіологічна діагностика. Методи специфічної профілактики і терапії анаеробної інфекції ран.

2. Загальна порівняльна характеристика анаеробних бактерій, їх значення в патології людини. Особливості мікробіологічної діагностики захворювань викликаних анаеробами. Бактероїди, їх біологічні властивості.

3. Клостридії правця, їх властивості. Токсинутворення. Патогенез правця у людини. Лабораторна діагностика, специфічна профілактика і терапія, їх теоретичне обґрунтування і оцінка.

4. Клостридії ботулізму. Морфологічні та культурні особливості, антигенна структура, токсинообразование, класифікація. Патогенез, мікробіологічна діагностика і терапія ботулізму.

5. Іерсінії. Збудники чуми. Патогенез, імунітет, методи мікро-біологічної діагностики і специфічної профілактики чуми. Іерсінії - збудники псевдотуберкульозу і ентероколіту, їх властивості, мікробіологічна діагностика іерсиниозов.

6. Збудники туляремії, біологічні властивості. Патогенез, імунітет, методи мікробіологічної діагностики і специфічної профілактики туляремії.

7. Бруцели, види, диференціація. Патогенез та імунітет при бруцельозі. Методи мікробіологічної діагностики бруцельозу, їх оцінка. Препарати для специфічної профілактики і терапії.

8. Бацили сибірської виразки. Біологічні особливості, патогенез, мікробіологічна діагностика і специфічна профілактика сибірки. Роль вітчизняних вчених в розробці і отриманні препаратів для специфічної профілактики сибірки.

9. Збудник сифілісу. Морфологічні та культуральні властивості. Патогенез та імунітет. Лабораторна діагностика та специфічна профілактика сифілісу.

10. Лептоспіри, їх характеристика, класифікація. Патогенез, імунітет і мікробіологічна діагностика лептоспірозів. Специфічна профілактика і терапія.

11. Боррелії, біологічні властивості. Роль в патології людини. Возбудники епідемічного та ендемічного поворотних тифів. Патогенез, імуногенез і мікробіологічна діагностика поворотного тифу. Специфічна профілактика і терапія поворотного тифу.

12. Малярійні плазмодії, їх характеристика. Патогенез малярії. Лабораторна діагностика. Специфічна профілактика і терапія.

13. Токсоплазми, морфологія, особливості культивування. Патогенез захворювання. Лабораторна діагностика. Специфічна терапія.

14. Патогенні найпростіші, біологічні властивості. Класифікація. Роль в патології людини. Лейшманиї, властивості, патогенез захворювання. Лабораторна діагностика лейшманіозів.

15. Патогенні гриби і актиноміцети (збудники кандидозів, дерматомікозів, актімікозів і їх характеристика). Принципи мікробіологічної діагностики мікозів.

16. Мікози: кандидози, аспергільоз, Пневмоцистоз тощо. Етіологія, патогенез, мікробіологічна діагностика. Лікування і профілактика.

17. Рикетсії, біологічні властивості. Класифікація. Рикетсії - збудники захворювань у людини. Збудники Ку-лихоманки. Патогенез захворювання, лабораторна діагностика, специфічна профілактика.

18. Збудники висипного тифу та їх властивості. Патогенез захворювання, оцінка методів. Специфічна профілактика, оцінка препаратів. Лабораторна діагностика.

19. Хламідії, класифікація, біологічні властивості. Методи культивування. Роль в патології людини. Лабораторна діагностика хламидиозів.

20. Мікоплазми, класифікація. Біологічні властивості, методи культивування. Роль в патології людини. Лабораторна діагностика мікоплазмозів.

21. Умовно-патогенні мікроорганізми, біологічні властивості, етіологічна роль у розвитку опортуністичних інфекцій. Характеристика захворювань, викликаних умовно-патогенними мікроорганізмами.

22. Внутрішньолікарняних інфекцій, умови їх виникнення. Властивості лікарняних ековарів мікроорганізмів. Лабораторна діагностика гнійно-запальних, ранових і опікових інфекцій, викликаних "госпітальними" штамами.

23. Клінічна мікробіологія, предмет, завдання, методи. Об'єкт досліджень. Критерії етіологічної ролі умовно-патогенних мікроорганізмів, виділених з вогнища запалення.