

Кафедра микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-
санитарной экспертизы
Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии
Научно-методический центр пищевых инфекций

МЕТОДЫ ЧАСТНОЙ БАКТЕРИОЛОГИИ

Учебно-методическое пособие

Составители:

**Д.А. Васильев, А.А. Щербаков,
Л.В.Карпунина С.Н. Золотухин**



Ульяновск 2004

УДК 619:616

Учебно-методическое пособие по методам частной бактериологии.

Предназначено для студентов факультета ветеринарной медицины специализации ветеринарный врач-бактериолог, врач-ветсанэксперт и студентов факультета биотехнологии специализации технолог.

Составители:

Дмитрий Аркадьевич Васильев, Анатолий Анисимович Щербаков, Лидия Владимировна Карпунина, Сергей Николаевич Золотухин.

Рецензент:

доктор ветеринарных наук, заведующий лабораторией микробиологии ВНИИЗЖ В.С. Русалеев.

Предлагаемое учебно-методическое пособие не может заменить практическую работу в лаборатории кафедры, и это не лабораторный практикум в его классическом понимании, но оно позволит студентам лучше подготовиться к экзаменам как по первому модулю, так и по всему курсу микробиологии. Данное учебно-методическое пособие подготовлено применительно к вузовскому курсу для студентов факультета ветеринарной медицины специализаций ветеринарный врач-бактериолог и ветсанэксперт и для студентов факультета биотехнологии специализации технолог.

Пособие написано заведующим кафедрой микробиологии, вирусологии, эпизоологии, ВСЭ Ульяновской ГСХА, д.б.н., профессором Васильевым Д.А., заведующим кафедрой микробиологии и ВСЭ Саратовского ГАУ, д.б.н., профессором Щербаковым А.А, профессором кафедры микробиологии и ВСЭ Саратовского ГАУ, д.б.н., Карпуниной Л.В, руководителем курса микробиологии Ульяновской ГСХА, доцентом, к.в.н., Золотухиным С.Н.

Составители будут признательны получить отзывы, исправления, дополнения по адресу: 432002, Ульяновск–71, а/я 2683, Д.А. Васильеву.

Предисловие

Методы частной бактериологии являются продолжением первой части, «Методы общей бактериологии», изданной кафедрой микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновской ГСХА в 1998 году. В отличие от первой части, методология данной нацелена на идентификацию конкретного рода или вида микроорганизмов, играющих роль в инфекционной патологии человека и животных, передающихся людям с пищевыми продуктами. В предлагаемой второй части учебного пособия используются методики, приведенные в первой части, но без конкретного описания. Изучавший курс микробиологии уже должен освоить эти методики, и в дальнейшей своей работе по идентификации бактерий, опираясь на них, проводить работу теми методами, что приведены в данной части учебного пособия.

Методический материал, излагаемый в данном учебном пособии, не является каноническим, инструктивным, нормативно-техническим, что позволило составителям продемонстрировать разнообразие схем исследования и методологических приемов, опирающихся на физиологические и биохимические свойства тех или иных микроорганизмов. К тому же нормативно-технические инструкции зачастую не отражают современную тенденцию лавинообразного появления новых таксонов, расширения тестов бактериологического исследования, позволяющих проводить идентификацию микроорганизмов, что обусловлено расширяющимся спектром бактериальных культур, причисляемых к патогенным или условно-патогенным видам, или появлением новых патогенных биовариантов и штаммов.

«...Также наставлю тебя в причинах и знаках болезней...
Бури, предвестницы зим, не чаще бросаются с моря,
Чем нападают на скот болезни: и не одиночек
Губит коварный недруг, но стадо целое сразу, –
Скот и надежду его и все со старшими племя...
Смерти весь род предала животных домашних и диких,
И отравила пруды, и заразой луга напитала...
Целые толпы зараз предают она смерти и в самых
Стойлах груды валит, гниющих в гнусном распаде
Тел, пока их землей не засыпят и в яму не скроют.
Даже нельзя было кож применять и внутренних вымыть
Чистой водою частей, иль пламенем справится с ними.
Также нельзя было стричь изъеденной грязью и хворью
Шерсти, касаться нельзя никому испорченной волны.
Если же кто надевать пытался лихие одежды,
То пупыри у него горячие, с мерзостным потом
Вдруг возникали на членах зловонных, и через немного
Времени хворую плоть священным огнем разъедало...»

ВЕРГИЛИЙ «Сельские поэмы»
(перевод С.Шервинского)

«...отчего происходят болезни, откуда
Может внезапно прийти и повеять поветрием смертным
Мора нежданного мощь, и людей и стада поражая,
Я объясню. Существует немало семян всевозможных,
Из которых одни животворны,
Но и немало таких, что приводят к болезни и смерти...»

ТИТ ЛУКРЕЦИЙ КАР «О природе вещей»
(перевод Ф. Петровского).

Введение

Заселившие Землю примерно 4 миллиарда лет назад микроорганизмы и в настоящее время являются самой многочисленной группой живых существ, составляя третье царство, которое по предложению Геккеля (1866) имеет собирательное название – **протисты**. В свою очередь, протисты подразделяются на высшие и низшие. Высшие протисты, клетки, которых сходны с животными и растительными клетками, являются **эукариотами**. К низшим протистам относятся бактерии (включая и риккетсии) и сине-зеленые водоросли, сильно

отличающиеся по строению своих клеток от всех других организмов и имеющие общее название – **прокариоты**.

По своему химическому составу все живые существа нашей планеты во многом сходны. Их важнейшими компонентами являются ДНК, РНК, белок. Основная физическая единица живого так же универсальна – это клетка. Однако строение клеток прокариот (бактерий и сине-зеленых водорослей), с одной стороны, и клеток животных и растений (в том числе микроскопически малых) – эукариот, с другой стороны, позволяют говорить о весьма существенных различиях между двумя этими группами.

Прокариотов можно рассматривать как реликтовые формы, сохранившиеся с давних времен, а появление эукариотических форм рассматривают как гигантский скачок в эволюции организмов. Однако микроорганизмы, и, в частности, прокариоты, испытывая непрерывное влияние окружающей среды, пожалуй, как ни одна другая форма жизни, постоянно эволюционируют. Заполняя на планете все сколько-нибудь пригодные для жизни экологические ниши, они проходят отбор на выживание, изменяя свои свойства – фенотипические признаки. В свою очередь, измененные прокариоты (в том числе и патогенные для животных и людей) влияют на эволюционные изменения этих животных и человека, являясь одним из факторов естественного отбора. Создание и развитие научно-технологической цивилизации позволяет человеку в какой-то степени влиять на данный фактор эволюционного процесса, сдерживая, а в некоторых случаях и ликвидируя те или иные причины естественного, биологического отбора. **Инфекционная микробиология**, изучающая микроорганизмы патогенные или условно-патогенные для человека и животных, и является тем инструментом, что позволяет сдерживать или ликвидировать некоторые причины биологического отбора. Одной из задач инфекционной микробиологии является установление наиболее оптимальных схем и методов идентификации бактерий, изучение их биологических свойств, разработка способов быстрого типирования инфекционного агента. Для искомой типизации можно использовать различные способы: серологические (РА, РСК, РНГА, РДП и т.п.), иммуноаналитические (ИФА, РИА, ФИА и т.п.), генетические (ДНК-ДНК гибридизация, ПЦР и др.), но в любом случае первоначальные исследования по выявлению инфекционного агента и его идентификации будут чисто бактериологическими. Опираясь эти исследования должны на фенотипические признаки, характерные для того или иного рода, вида, биотипа бактерий. В предлагаемом учебном пособии приводятся наиболее характерные из доступных для исследований бактериологические тесты, а также фенотипические признаки патогенных и условно-патогенных бактерий. Для описания более детальных исследовательских тестов, направленных на изучение таксономического положения бактерий в систематике, их номенклатуры, существует специальная литература.

Бактерии рода *Bacillus*

Прямые палочки до 10 мкм, с закругленными или обрубленными концами, часто в парах или цепочках. Подвижные (кроме *B. anthracis*) за счет перитрихальных жгутиков. Образуют эндоспоры, характеризующиеся повышенным коэффициентом светопреломления, устойчивостью к повреждающим агентам и высоким содержанием дипиколиновой кислоты (5-20% сухой массы). Клетка-спорангий образует одну эндоспору. Род включает 48 видов; некоторые виды — строгие аэробы, другие — факультативные анаэробы. Возможно изменение окрашивания по Граму, но на ранних стадиях роста бактерии грамположительны. Хемогетеротрофы, метаболизм строго дыхательный или дыхательный и бродильный одновременно (редко строго бродильный); большинство видов образуют каталазу. Род *Bacillus* содержит несколько патогенных для человека видов (табл. 1); типовой вид — *Bacillus subtilis*.

Таблица 1. Поражения, вызываемые различными видами рода *Bacillus*

Поражение	Возбудитель	Образцы для исследования
Сибирская язва	<i>B. anthracis</i>	Отделяемое из очагов поражения*, кровь, СМЖ, сыворотка (для серологии)
Бактериемии, септицемии	<i>B. alvei</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. sphaericus</i> , <i>B. subtilis</i>	Кровь
Менингиты	<i>B. alvei</i> , <i>B. circulans</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. sphaericus</i> , <i>B. subtilis</i>	СМЖ
Глазные инфекции**	<i>B. brevis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. thuringiensis</i>	Биоптаты роговицы и стекловидного тела
Пневмонии	<i>B. cereus</i> , <i>B. sphaericus</i> , <i>B. subtilis</i>	Мокрота, промывная жидкость бронхов, биоптаты легочной ткани, плевральная жидкость (при наличии)
Эндокардиты	<i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i>	Кровь
Пищевые токсикоинфекции	<i>B. cereus</i> , <i>B. megaterium</i>	Подозрительная пища (25-50 г), Испражнения, рвотные массы***.

* — один образец для выделения и один для микроскопии.

** — включают язвы роговицы, эндофтальмиты, кератиты, иридоциклиты, панфтальмиты и абсцессы глазницы.

*** — следует определить количественные соотношения с прочими бактериями.

Bacillus anthracis

Возбудитель сибирской язвы у человека и животных. Заболевание известно с глубокой древности, со времен Гиппократ и Гомера, Галена, Цельса и Вер-

гилия болезнь фигурирует под названием «священный огонь» (*ignis sacer*) или «персидский огонь» (*ignis persicus*). Русские врачи Кольвано-Воскресенских заводов на Алтае А. Эшке (1758) и Н. Ножевщиков (1762) представили в медицинскую коллегияю подробные сведения о данном заболевании, включая клинику, эпидемиологию и связь с аналогичной болезнью у животных. В 1766 году Моран доложил о данной болезни в Академии наук в Париже, что является первой научной работой по сибирской язве за рубежом. В 1769 г. Фурнье выделил сибирскую язву в отдельную нозологическую единицу. С.С. Андриевский, изучавший заболевание во время эпидемии на Урале (1786-1788), дал ему название «сибирская язва», а в 1788 г. путем самозаражения доказал единство этиологии сибирской язвы у людей и животных. Возбудитель впервые описали Поллендер, Брауэлл (1849) и Давэн (1850). Чистую культуру возбудителя описал профессор Дерптского русского ветеринарного училища Ф. Брауэль (1857-1858). В своих опытах ему удалось заразить различных животных. Кох (1876) предложил питательные среды для размножения данных микроорганизмов, а в 1881г. Пастер предложил живую вакцину для иммунопрофилактики заболевания. В связи с монополизацией ее производства Пастеровским обществом, Л.С. Ценковский независимо создал отечественную живую вакцину. В 1902 г. Асколи разработал диагностическую реакцию преципитации, широко используемую на практике.

Распространение

Сибирская язва — типичный зооантропоноз; среди животных наиболее восприимчивы травоядные, но отмечены случаи заболевания среди зайцев, кошек и собак; у человека носит выраженный профессиональный характер (сельскохозяйственные рабочие, работники боен, шерстобиты и щеточники). Наиболее интенсивные очаги заболевания находятся в Азии (Турция, Иран, Китай, Монголия, Индия), Южной Африке, Южной Америке (Аргентина) и Австралии; спорадические случаи регистрируют в Европе, России и США. Ежегодно сибирской язвой заболевает около 1 млн. животных и регистрируется около 40 тыс. случаев заболевания у людей.

Животные заражаются при заглатывании спор во время выпаса или при поедании загрязненных кормов. У животных преобладают ангинозная, карбункулезная, кишечная и септическая формы заболевания, т.е. возбудитель проникает через микротравмы ротовой полости или стенку кишечника. Больные животные выделяют сибиреязвенные палочки с мочой и испражнениями. Болезнь быстро прогрессирует в течение 2-3 суток, а при молниеносных формах — в течение нескольких часов; летальность достигает 80%. Клинические признаки болезни (судороги, диарея с кровью) проявляются непосредственно перед гибелью животного.

Человек заражается при контакте с инфицированным материалом (уход за больными животными, переработка шерсти, шкур, щетины, кож и костей), либо при употреблении в пищу мяса больных животных. Пути заражения —

ингаляция, заглатывание или проникновение через порезы и ссадины кожи спор *Bacillus anthracis*. Различают профессиональные (сельскохозяйственные, промышленные) и непрофессиональные (бытовые, случайные) группы заболевания. Ежегодно в мире регистрируют 25-100 тыс. случаев заражения.

Значительную эпидемическую опасность представляют скотомогильники, особенно если трупы животных, павших от сибирской язвы, были зарыты без надлежащих предосторожностей.

В сельских районах заболеваемость носит сезонный характер, пик заболеваемости приходится на летние месяцы.

Морфология возбудителя

Крупная толстая палочка (5-10×1-2 мкм) с закругленными концами (при образовании цепочек — с обрезанными под прямым углом концами); неподвижна (абсолютный дифференциально-диагностический признак); легко окрашивается по Граму (грамположительна) и анилиновыми красителями. В клиническом материале располагается парами или в виде коротких цепочек, окруженных общей капсулой; на питательных средах образует более длинные цепочки; при этом морфология палочек несколько изменяется — они слегка утолщены на концах и образуют сочленения («бамбуковая трость»). Подобные морфологические изменения еще более явно проявляются при температурной фиксации для окрашивания по Граму. Обработка культур пенициллином приводит к разрушению клеточных стенок и образованию цепочек, состоящих из протопластов («жемчужное ожерелье»). Для защиты от факторов резистентности (фагоцитов, АТ) образуют капсулы, наблюдаемые только у бактерий, обитающих в живых организмах либо на средах, содержащих нативную сыворотку (например, среда ГКИ). Капсулы более устойчивы к действию гнилостной микрофлоры, чем микробные тела, и в материале из разложившихся трупов нередко можно обнаружить лишь пустые капсулы («тени» микробов). Для более быстрого обнаружения капсул можно окрасить мазки полихромным метиленовым синим Леффлера (клетки синие, капсулы красно-малиновые). Образуют центрально расположенные эндоспоры, для чего необходимы кислород и определенная температура (12-42°C); в живом организме спор не образуют; также не образуют спор в нескрытых трупах, что обусловлено поглощением свободного кислорода в процессе гниения. Споры отличает высокая устойчивость к внешним воздействиям; в воде они сохраняются до 10 лет, в почве — до 30 лет (возможно и дольше).

Культуральные свойства

Рост. *Bacillus anthracis* хорошо растет на обычных питательных средах: бактерии можно даже выращивать на сыром или вареном картофеле, настое соломы, экстрактах злаков и бобовых. Температурный оптимум на агаре 35-36°C, на бульоне 32-33°C, оптимум рН 7,0. На жидких средах растет в виде ватных хлопьев, взвешенных комков, не вызывает помутнения среды. Дает

характерный рост при посеве уколом в желатин («перевернутая елочка»); позднее верхний слой желатина разжижается, образуя воронку. На твердых средах образует крупные шероховатые серовато-белые колонии (R-формы) диаметром 2-3 мм, типичными считают характерные волокнистые колонии («голова Медузы» или «львиная грива»), образованные переплетающимися цепочками бактерий. Рост вирулентных штаммов на плотных средах и желатине настолько характерен, что может служить диагностическим признаком. На свернувшейся (30 минут при 80°C) лошадиной сыворотке растет в виде гладких прозрачных S-колоний, тянущихся за петлей.

Потребность в кислороде. Палочка сибирской язвы — аэроб или факультативный анаэроб; в анаэробных условиях (либо при значительном варьировании температурного режима) образует мелкие единичные колонии. При культивировании в микроаэрофильных условиях всегда образует гладкие (S), слизистые (M) или смешанные (SM) колонии.

Спорообразование. Споры *Bacillus anthracis* овальной формы, размером 0,8-1,0 × 1,5 мкм; сильно преломляют свет. Они очень легко образуются на бедных питательных средах, а при свободном доступе кислорода — даже в дистилляте или нефиксированных мазках (последнее следует иметь в виду при работе с вирулентными штаммами). На плотных средах спорообразование идет быстрее, чем на жидких; через 32-48 ч при 37°C оно бывает практически полным. Прекращается полностью при 15°C и 42-43°C. Скорость прорастания зависит от температуры (оптимум 37°C) и возраста спор; молодые споры в оптимальных условиях прорастают за 1-1,5 ч, старые — за 2-10 ч.

Биохимия. Возбудитель образует кислоту без газа на средах с глюкозой, фруктозой, мальтозой и декстрином. Слабое или отсроченное образование газа наблюдают на средах с глицерином и салицином (не у всех штаммов). Кислотообразования не находят на средах с арабинозой, рамнозой, маннозой, галактозой, раффинозой, лактозой, инсулином, маннитом, дульцитом, сорбитом и инозитом. Гидролизует крахмал; образует ацетилметилкарбинол и лецитиназу. *Bacillus anthracis* очень медленно и слабо коагулирует жидкую желточную среду; нередко изоляты вообще лишены такой способности. Положительный результат можно ожидать не ранее 5-7 сут. инкубирования при 37°C; в то же время сапрофитные бактерии разлагают ее за 6-10 ч. В отличие от сапрофитов, палочки сибирской язвы лишены фосфатазы и не разлагают фосфаты, содержащиеся в питательной среде. Молоко свертывают за 3-5 сут.; затем сгусток медленно пептонизируется и разжижается; выделяется аммиак и (в связи с окислением тирозина) накапливается бурый пигмент.

Антигенная структура. Выделяют 3 группы основных антигенов (Ag) *Bacillus anthracis*, 2 из которых (капсульные Ag и токсин) кодируются плазмидами; отсутствие одной или обеих делает бактерии авирулентными.

Капсульные Ag заметно отличаются по химической структуре от прочих капсулярных Ag бактерий; представлены полипептидами, соединенными с

молекулами D-глутаминовой кислоты. По антигенным свойствам выделяют один серотип. АТ к капсульным Аг не проявляют защитное действие.

Соматические Аг представлены полисахаридами клеточной стенки; состоят из D-галактозы и N-ацетилглюкозамина в эквимолярных соотношениях; перекрестно реагируют с АТ к капсульному полисахариду пневмококков типа 14; введение Аг вызывает синтез АТ, не проявляющих защитное действие.

Токсин обычно образуют *in vivo* (можно выделить из плевральных и перитонеальных экссудатов зараженных животных); *in vitro* образование токсина можно индуцировать культивированием на средах, содержащих сыворотку; пик образования приходится на 18-20 ч инкубирования.

Токсин имеет сложную структуру: включает протективный Аг (взаимодействует мембранами клеток и опосредует проявление активности других компонентов); летальный фактор (проявляет цитотоксический эффект и вызывает отек легких) и отечный фактор (проявляет эффект кальмодулиннезависимой аденилатциклазы, повышает концентрацию цАМФ, вызывает развитие отеков); эти компоненты по отдельности не способны проявлять токсическое действие. Структуры компонентов токсина представлены белками или липопротеинами; их молекулы термолabile, серологически дифференцируемы и иммуногенны.

Патогенность *Bacillus anthracis* прямо зависит от капсуло- и токсинообразования; штаммы, не проявляющие подобных свойства, обычно авирулентны.

Капсула защищает бактерии от действия вне- и внутриклеточных продуктов фагоцитов и препятствует поглощению бактерий; на начальных этапах заболевания капсула — важнейший фактор вирулентности. Способностью к капсулообразованию также обладают некоторые вакцинные штаммы (например, Пастера или второй вакцинный штамм Ценковского).

Токсин опосредует проявление признаков и симптомов сибирской язвы. Аккумуляция токсина в тканях и его воздействие на ЦНС приводят к летальному исходу на фоне легочной недостаточности и гипоксии. Разработаны сибирезывенные анатоксины, но их структура и механизмы действия изучены не полностью.

Лабораторная диагностика в определенной степени зависит от клинической формы заболевания. Для исследования берут содержимое пустулы, гнойное отделяемое из карбункула, кровь, мочу, мокроту, испражнения и рвотные массы. При патологоанатомическом исследовании забирают кусочки органов или целые органы. Все образцы следует помещать в герметичные сосуды и транспортировать закупоренными в опломбированные боксы. Анализы предусматривают не только проведение рутинных бактериологических исследований, но и заражение лабораторных животных для окончательного уточнения диагноза.

Выделение возбудителя проводят по стандартной схеме (рис. 1) с посевом на обычные питательные среды, определением подвижности, окраской по Граму и изучением биохимических особенностей (дифференциально-

диагностические признаки *Bacillus anthracis* и родственных спорообразующих анаэробов представлены в табл. 2 и 3).

Серологические исследования позволяют идентифицировать инфекцию у больных и реконвалесцентов; возбудитель можно выявлять АТ, мечеными флюоресцеинами (особенно в смешанных культурах), диффузией в геле, в РСК, РНГА и ИФА.

Кожные пробы (реакция ГЗТ) проводят внутрикожным введением 0,1 мл бактериального аллергена (антраксин); применяют для ретроспективной диагностики при эпидемиологических исследованиях.

Реакция Асколи имеет большое значение, т.к. позволяет идентифицировать возбудитель при отрицательных результатах бактериологических исследований. Однако для прижизненной диагностики она не имеет серьезных преимуществ перед вышеуказанными бактериологическими и серологическими методами.

Типирование бактериофагом. Возможно проведение дифференциальной диагностики с помощью бактериофагов.

Отличительная особенность возбудителя — высокая чувствительность к пенициллину; выращивание на средах, содержащих пенициллин, приводит к проявлению феномена «жемчужного ожерелья».

Биологическая проба. Заражение подопытных животных проводят одновременно с посевом на питательные среды. Материал можно вводить белым мышам (по 0,1-0,2 мл в спину), кроликам и морским свинкам (по 0,2-0,5 мл в область живота). Обычно мыши погибают через 1-2 суток, морские свинки и кролики — через 2-4 суток. Наблюдение продолжают в течение 10 дней. У павших животных обычно исследуют печень, селезенку, лимфатические узлы, почки, кровь из полостей сердца, места введения заразного материала. Делают посевы на питательные среды.

Профилактика

Иммунизация. Для профилактики зоонозов иммунизируют животных живой вакциной, приготовленной из некапсулированного штамма *Bacillus anthracis*, или протективным Аг.

Таблица 2. Морфология, особенности роста и патогенность *B. anthracis* и родственных спорообразующих анаэробов

Признак	<i>B. anthracis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. mesentericus</i> <i>B. pumilus</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. mycoides</i>
Капсулообразование в атмосфере с повышенным содержанием CO ₂	+	–	–	–	–	–
Подвижность (висячая капля)	–	+	+	+	+	+
Гемолиз ЭБ	–	+	–	±	–	+
Рост на жидких средах:						
на бульоне	Среда с осадком (хлопьевидным), прозрачная, без пленки, кольцо около стенок легко смывается	Среда мутная, осадок труднорастворимый, крошковатый, прочные пленка и пристеночное кольцо	Бульон мутный, при образовании пленки среда просветляется	Бульон остается почти прозрачным, на поверхности среды морщинистая пленка	Помутнение среды, пленки не образует, осадок незначительный	Помутнения среды нет, на дне ватообразный осадок, пленки не образует
на молоке	Подкисление, свертывание и пептонизация (медленная)	Пептонизация быстрая, со свертыванием или без него	Подщелачивание, медленная пептонизация	Пептонизация медленная, иногда свертывание	Пептонизация	Пептонизация, иногда, может быть без свертывания
на твердых средах:						
на агаре	Серо-белые, как пушинки, колонии, при увеличении вид «львиной гривы»	Колонии белые, твердые, круглые, иногда окрашенные в желтоватый цвет, по краям извитые нити	Колонии белые или сероватые, ползущие на стенку пробирки, в конденсатной воде пленка	Толстый матово-белый морщинистый налет, образует пленку в конденсатной воде	Колонии слизистые, желтовато-белые, темнеют при наличии тирозина в среде	Войлоковидные наложения, ползущие по поверхности среды
на желатине	Медленное разжижение, образует фигуру «перевернутой елочки»	Разжижение быстрое и сильное, вдоль укола образует горизонтальные отростки	Колония окружена венком из отростков, на поверхности разжиженного желатина образует пленку	Колонии круглые, разжижение медленное	Медленное воронкообразное разжижение	Быстрое разжижение
Патогенность:						
для мышей	+	+	–	–	–	–
для морских свинок и кроликов	+	–	–	–	–	–

ЭБ — эритроциты барана.

Таблица 3. Метаболические особенности *B. anthracis* и родственных спорообразующих анаэробов

Признак	<i>B. anthracis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. mesentericus</i> <i>B. pumilus</i>	<i>B. megateritum</i>	<i>B. mycoides</i>
Лакмусовая сыворотка	Краснеет	Синеет	Синеет	Краснеет	—	—
Ферментация:						
Свернутой яичной среды	± (медленно)	+	—	+	—	+
Арабинозы	—	—	+К	+К	±К	—
Ксилозы	—	—	+К	+К	±К	—
Крахмала	+	+	+	—	+	+
Салицина	± (медленно)	+	Сведений нет	+	Сведений нет	Сведений нет
Восстановление метиленового синего в среде (через 48ч)	—	+	±	—	Сведений нет	—
Образование уреазы	—	±	~	—	±	±
Редукция нитратов	±	±	+	—	±	±
Реакция Фогеса-Проскауэра	+	-Т	+	+	—	±
Чувствительность к пенициллину	+	~	—	—	~	—

К — ферментация с образованием кислоты.

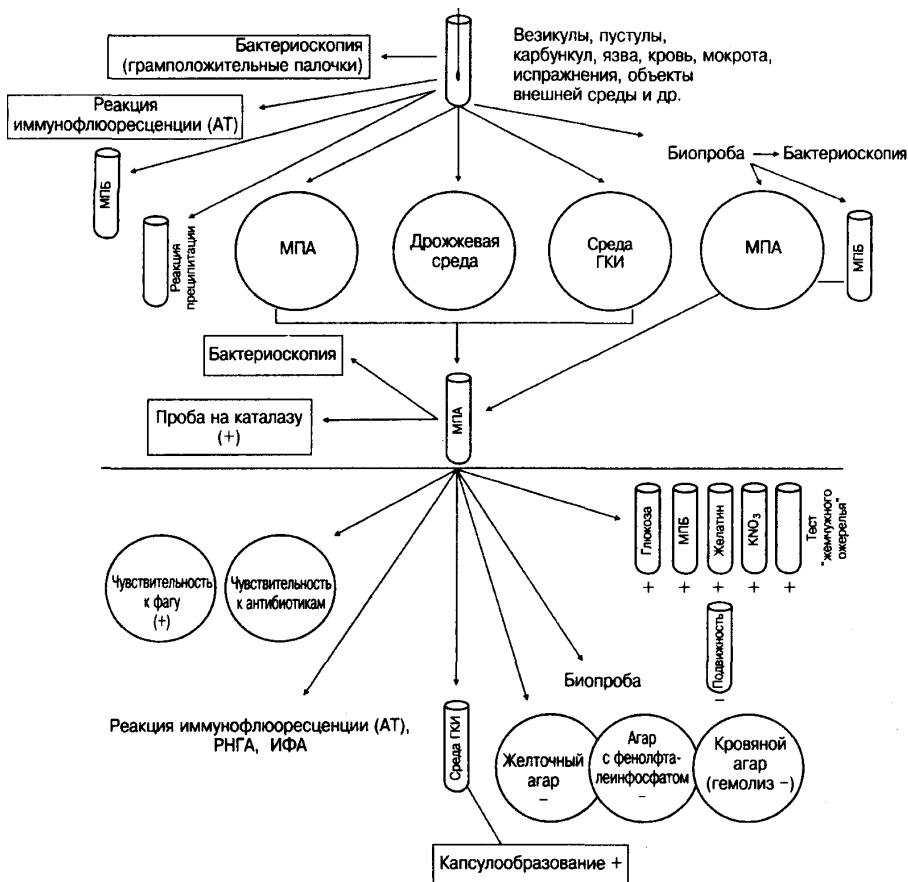


Рисунок 1. Принципиальная схема бактериологического выделения возбудителя сибирской язвы

Bacillus cereus

Bacillus cereus (от лат. *sega* — воск, свеча) широко распространена в природе, морфологически сходна с *Bacillus anthracis* (характерно расположение микробных тел в виде штакетника), но обладает подвижностью, чувствительна к действию γ -фага бацилл и гемолизует эритроциты барана. Вызывает спорадические случаи пищевых отравлений у человека. Температурный оптимум роста 30°C, оптимум pH 7-9,5. На МПА образует «распластанные» колонии с неровными краями; на КА колонии «распластанные», зернистые, с широкой зоной гемолиза, на яичном агаре образует широкую зону преципитации белого цвета (эффект бактериальной лецитиназы), зона быстро растет, и через не-

сколько суток инкубации охватывает всю поверхность чашки. Колонии, выросшие на агаре, имеют характерный восковидный вид. На жидких средах бацилла образует белый хлопьевидный осадок, нежную пленку на поверхности и вызывает помутнение бульона. Следует отметить высокую протеолитическую активность микроорганизма — разжижает желатин в течение 1-4 сут (80% штаммов); все штаммы образуют лецитиназу и ацетилметилкарбинол, расщепляют до кислоты глюкозу и мальтозу, а часть штаммов — также и сахарозу, глицерин, лактозу, галактозу, инулин, дульцит и декстрин.

Bacillus cereus вызывает два типа пищевых отравлений (гастроэнтеритов); интоксикацию опосредует энтеротоксин, образуемый вегетирующими формами, прорастающими из спор устойчивых к определенным термическим режимам обработки пищевых продуктов (обычно овощей). Бациллы образуют токсины только *in vivo*, во время прорастания спор.

Первый тип отличает укороченный инкубационный период (около 4-5 ч), характерны изнуряющие диарея и рвота. Заболевание развивается при употреблении пищи, обсемененной большим количеством микроорганизмов. Часты случаи отравлений в связи с употреблением жареного риса, содержащего проросшие споры *Bacillus cereus*, эти случаи не менее часто ошибочно связывают с отравлениями стафилококковым энтеротоксином. Подобные отравления можно считать токсикозами (или гнилостной инфекцией), связанными не столько с активностью токсина, сколько с действием метаболитов, накапливающихся в пищевых продуктах.

Второй тип отравлений характеризует более продолжительный инкубационный период (около 17 ч); патогенез полностью опосредован действием энтеротоксина, больные жалуются на схваткообразные боли в животе, диарею; этот комплекс симптомов часто и ошибочно принимают за пищевые отравления, вызванные клостридиями.

Патогенез обоих типов отравления в большей или меньшей степени связан с действием энтеротоксина; механизмы его действия остаются до конца не изученными, но его активность не связана со стимуляцией аденилатциклазы.

Предрасполагающие факторы — различные нарушения иммунитета.

Вторичные иммунодефициты, вызванные применением цитостатиков и иммунодепрессантов, а также различными патологическими состояниями, сопровождаемыми иммунодепрессиями (например, острыми лейкозами), могут быть причиной тяжелых, часто фатальных инфекций *Bacillus cereus* с массивными бактериемиями, эндокардитами и менингитами.

Применение β -лактамовых антибиотиков для подавления роста *Bacillus cereus* может вызвать бурный рост резистентных штаммов.

Протезы. Вероятность развития непищевых инфекций также велика у лиц с протезированными органами, катетерами, а также у пациентов с гемодинамическими нарушениями.

Диагностика

Диагностическим признаком считают обнаружение в подозрительных продуктах более 10^5 бактерий в 1 г/мл продукта либо 10^2 - 10^3 бактерий в 1 г/мл каловых и рвотных масс или промывных вод.

Прочие виды, имеющие значение

Включают *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *B. alvei*, *B. laterosporus*, *B. pumilus*, *B. thuringiensis* и *B. sphaericus*. Два первых вида — широко распространенные сапрофиты, остальные виды — энтомопатогены. Они могут вызвать заболевания человека в составе микробных ассоциатов, особенно у лиц с иммунными расстройствами. Значительная часть героина, продаваемого уличными торговцами, обсеменена *Bacillus subtilis*, отсюда тяжелые глазные инфекции и бактериемии у наркоманов. Также следует упомянуть *B. stearothermophilus*, патогенную для насекомых и применяемую в качестве средства биологического воздействия в первую очередь на гусениц чешуекрылых (Lepidoptera). Механизм энтомоцидного действия связан со способностью образовывать белковые кристаллические структуры (гранулы) при спорообразовании, они высвобождаются при прорастании споры и выделяют бактериальные токсины под действием пищеварительных ферментов желудочно-кишечного тракта гусеницы.

Питательные среды для культивирования бактерий рода *Bacillus*

Среда ГКИ (Шляхов, 1973). К раствору Хенкса добавляют 40% (объем/объем) стерильной сыворотки крови крупного рогатого скота, инактивированной при 56°C 30 мин. Раствор Хенкса можно заменить бульоном Хоттингера (рН 7,2—7,4). Среду используют для обнаружения способности капсулообразования у *B. anthracis*.

Среда Томова (Шляхов, 1973). В состав среды входят 50 мл пептонного агара (10%-ный раствор агара, 2,5%-ный раствор пептона, 0,5%-ный раствор натрия хлорида), 100 мл сыворотки крови крупного рогатого скота, 50 мл куриного белка, 25 мл 0,4% гемина в 0,01 н растворе натрия гидроксида, 25 мл 0,01 н уксусной кислоты. В стерильной колбе смешивают сыворотку крови, белок, подогревают до 50°C и добавляют к расплавленному пептонному агару, имеющему температуру 50°C. Затем добавляют раствор гемина, уксусную кислоту, компоненты перемешивают и стерильно разливают в чашки Петри. На данной среде возбудитель сибирской язвы растет в S-или SM-форме. Среда обладает селективными свойствами: растут *B. anthracis*, *B. cereus*, не растут *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. brevis*, *B. mycoides*.

Среда Knisely (1966). К расплавленному питательному агару добавляют 40 мг/мл лизоцима, 30 ЕД/мл полимиксина, 300 мг/мл натриевой соли этилендиаминотетрауксусной кислоты (ЭДТА), 40 мг/мл таллия ацетата. Растворы пред-

варительно стерилизуют фильтрацией. Устанавливают pH 7,35. Через 24-48 ч инкубирования при 37°C *B. anthracis* вырастает в виде мелких, гладких колоний. Другие виды бактерий на этой среде обычно не растут.

Лизицимовая среда (Claus, Berkeley, 1986). Первоначально готовят раствор лизоцима, содержащий 10000 ЕД/мл в дистиллированной воде, и стерилизуют фильтрацией. 1 мл раствора лизоцима смешивают с 99 мл стерильного питательного бульона и разливают по 2,5 мл в пробирки. При изучении бактерий, патогенных для насекомых, 1 мл лизицимового раствора (0,1%) смешивают с 99 мл полужидкого агара, который готовят следующим образом. В 1 л дистиллированной воды растворяют 10 г агара, 3 г Na_2HPO_4 , по 5 г дрожжевого экстракта и триптона; фильтруют, устанавливают pH 7,3-7,5 и стерилизуют при 121°C 20 минут. Затем стерильно добавляют раствор глюкозы из расчета 2 г/л. Глюкозу предварительно стерилизуют в виде 10%-ного раствора при 115°C 20 минут. Используют для идентификации видов рода *Bacillus*.

Дифференциально-диагностическая среда. К 100 мл питательного агара, расплавленного и имеющего температуру 45—50°C, добавляют следующие растворы: 0,5 мл полимиксина М сульфата, 0,5 мл невидграмона, 1,0 мл гризеофульвина, 10 мл моющего средства «Прогресс», 0,1 мл натрия фенолфталеинфосфата. Компоненты перемешивают, разливают в чашки Петри. Среда пригодна 1—2 суток при хранении в условиях холодильника. Через 18—24 ч культивирования посевов в крышку чашки Петри вносят 1-2 мл 25%-ного водного раствора аммиака. Чашку выдерживают (крышкой вниз) при 20°C 1 минуту и учитывают результат. Колонии бактерий с фосфатазной активностью розовеют, остальные колонии, в том числе *B. anthracis*, остаются бесцветными. Среда обладает селективными свойствами.

Приготовление растворов. Полимиксина М сульфат растворяют в физиологическом растворе с расчетом 10000 ЕД/мл. Невидграмон растворяют в 25%-ном водном растворе аммиака, затем разводят стерильным 0,9%-ным раствором натрия хлорида до концентрации 100 мкг/мл. Моющее средство «Прогресс» разводят стерильной дистиллированной водой до концентрации 0,1%. Гризеофульвин растирают в ступке, растворяют в стерильной дистиллированной воде до концентрации 100 мкг/мл. Натрия фенолфталеинфосфат (коммерческий 10%-ный раствор) прогревают на водяной бане при 56°C 30 минут. Среду используют для выделения из загрязненного материала возбудителя сибирской язвы.

Среда Буза (Шляхов, 1973). К 3%-ному голодному (без пептона) агару (pH 7,2-7,4) добавляют 15% дефибрированной крови барана. Используют для культивирования возбудителя сибирской язвы.

Селективный агар для выделения и идентификации *B. cereus* (Hoibrook, Anderson, 1980). В 1000 мл дистиллированной воды растворяют 1 г пептона, 10 г маннита, 2 г натрия хлорида, 0,1 г магния сульфата, 2,5 г Na_2HPO_4 , 0,25 г KH_2PO_4 , 0,12 г бромтимолового синего, 10 г натрия пирувата,

14 г агара. Стерилизуют автоклавированием при 121°C 15 минут. К расплавленному и охлажденному до 50°C агару добавляют стерилизованный фильтратом раствор полимиксина В на дистиллированной воде из расчета конечного содержания 100 ЕД в 1 мл среды. Компоненты перемешивают и среду разливают в чашки Петри. Типичные колонии *B. cereus* диаметром около 5 мм с характерным синеватым оттенком (расщепление маннита), окружены зоной преципитации желточной эмульсии аналогичного цвета. По этим признакам *B. cereus* можно отличить от других бацилл, кроме *B. thuringiensis*. Изменение желточного компонента в среде вызывают также *S. aureus*, *S. marcescens*, *P. vulgans*, но они имеют другую форму колоний и зону просветления вокруг них.

Жидкая среда обогащения для выделения *B. cereus* (Claus, 1955). В 100 мл дистиллированной воды растворяют 10 г KNO_3 , 5 г пептона, 3 г мясного экстракта. Устанавливают рН 7,0, стерилизуют при 120°C 15 минут. Исследуемый материал предварительно прогревают при 80°C 10 минут. Через 24 ч инкубирования при 30°C одну бактериологическую петлю засевают на питательный агар с желточной эмульсией. Культивируют при 37°C для подавления роста *B. mycoides*.

Бактерии рода *Clostridium*

К роду *Clostridium* относятся подвижные палочки (реже неподвижные), величиной 1,5-20,0 мкм, с закругленными, иногда с заостренными концами, часто расположенные в парах или короткими цепочками. Образуют овальные или круглые эндоспores, придающие клеткам веретенообразную форму (от гр. *kloster* — *веретено*). С возрастом могут изменять отношение к окрашиванию по Граму, но на ранних стадиях культивирования всегда грамположительны. Большинство видов хемоорганотрофы, но некоторые могут расти хемоавтотрофно или хемолитотрофно; одни виды проявляют сахаролитическую, другие — протеолитическую активность (возможно сочетание этих свойств либо их полное отсутствие). Наиболее характерные признаки — способность вызывать маслянокислое брожение и анаэробный распад углеводов с образованием масляной кислоты и газов (CO_2 водород, иногда метан). Восстанавливают сульфиты до сульфидов. Обычно каталазоотрицательные. Большинство видов — строгие анаэробы; также имеются аэротолерантные виды или отдельные штаммы. Типовой вид — *Clostridium butyricum*; вызывает маслянокислое брожение углеводов, открытие этой палочки позволило Пастеру (1861) выделить анаэробные микроорганизмы. Термин «кlostридии» ввел Трекюль (1863). Род включает виды, обитающие в почве, на дне пресных и соленых водоемов, в кишечнике человека и животных; некоторые виды патогенны, а некоторые нашли применение в промышленном производстве некоторых органических кислот и спиртов. Современная систематика выделяет 5 групп микроорганизмов, разделяемых по расположению спор, способности гидролизовать желатин и особым требованиям для роста. По экологическим свойствам выделяют 3

группы клостридий: возбудители бродильных процессов (с преобладанием сахаролитических свойств); возбудители процессов гниения (с преобладанием протеолитических свойств); патогенные виды (могут быть протеолитическими и сахаролитическими) Последнюю группу составляют возбудители травматических клостридиозов (газовой гангрены, столбняка), возбудители энтеральных клостридиозов и непатогенные виды, вызывающие патологические процессы в ассоциациях с другими патогенными клостридиями. Клостридиозы, как правило, имеют экзогенное происхождение. Число видов в роде достигло 100, из них менее 20 выделяют при различных поражениях животных и человека; их основные идентифицирующие признаки представлены в табл. 4.

Clostridium perfringens — один из основных видов рода. Возбудитель злокачественного отека, инфекционной энтеротоксемии животных, анаэробной дизентерии молодняка сельскохозяйственных животных, пищевых токсикоинфекций человека. По способности образовывать 4 главных токсина (α -, β -, ϵ - и ι -) микроорганизмы разделяют на 6 сероваров — А, В, С, D, Е и F (представители последнего, по-видимому, принадлежат к типу С). Основным возбудитель заболеваний человека — *Clostridium perfringens* типа А (*C. welchii*); при некротических энтеритах иногда выделяют микроорганизмы типов С и F; возбудители типа D вызывают инфекционные энтеротоксемии. *Clostridium perfringens* типа А открыли американские патологи Уэлч и Нэталл (1892), в чистой культуре получили Вейон и Жубер (1893), давшие ему название *perfringens*.

Распространение

Микроорганизмы широко распространены в окружающей среде, их выделяют из воды, почвы и сточных вод, часто обитают в кишечнике людей и животных; *Clostridium perfringens* также способны вегетировать в почве, богатой гумусом. Наиболее часто в почве и испражнениях обнаруживают серотип А. Место постоянного обитания представителей серотипа С, ответственных за пищевые токсикоинфекции у человека, пока не установлено, возбудителей выделяют из мясных и рыбных консервов и органов людей, умерших от «некротического энтерита».

Таблица 4. Идентифицирующие признаки патогенных для человека видов рода *Clostridium*

Вид	Споры	Аэроб- ный рост	Лецитин	Липаза	Желатин (гидролиз)	Индол	Основные продук- ты метаболизма	Комментарии
<i>C. botulinum</i> :								
I группа	OC	–	–	+	+	–	УК, МК, иМК, иВК	
II группа	OC	–	–	+	+	–	УК, МК	
III группа	OC	–	+	+	+	–	УК, ПК, МК	
IV группа	КС	–	–	–	+	–	УК, ПК, МК, иМК, ФУК	Синоним — <i>C. argentiense</i>
<i>C. tetani</i>	OC	–	–	–	+	±	УК, МК, ПК	Дает феномен роения на КА
<i>C. perfringens</i>	OC	–	+	–	+	–	УК, МК	Редко образует споры, дает двойную зону гемолиза на КА неподвижны
<i>C. difficile</i>	OC	–	–	–	±	–	УК, МК, иМК, ВК, иВК, иКК	
<i>C. sordellii</i>	OC	–	+	–	+	+	УК	Уреаза-положительна
<i>C. novyi</i> A	OC	–	+	+	+	–	УК, ПК, МК	Особо чувствительна к O ₂ Дает β-гемолиз
<i>C. novyi</i> B	OC	–	+	–	+	–	УК, ПК, МК	
<i>C. histolyticum</i>	OC	±	–	–	+	–	УК	Не ферментирует углеводы
<i>C. septicum</i>	OC	–	–	–	+	–	УК, МК	Дает феномен роения на КА
<i>C. bifermentans</i>	OC	–	+	–	+	+	УК	Уреаза-отрицательна
<i>C. sporogenes</i>	OC	–	–	+	+	–	УК, МК, иВК	
<i>C. tertium</i>	OC	+	–	–	–	–	УК, МК	
<i>C. ramosum</i>	КС/OC	–	–	–	–	–	УК	Редко образует споры, часто окрашива- ется грамотрицательно
<i>C. butyricum</i>	OC	–	–	–	–	–	УК, МК	
<i>C. bryantii</i>	КС/OC/ТС	–	+	–	–	–	УК, МК, МолК	

Примечание. Споры: OC — овальные; КС — круглые; С — субтерминальные; ТС — терминальные. Метаболиты: УК — уксусная кислота; МК (иМК) — масляная (изомаляная) кислота; ПК — пропионовая кислота; ВК (иВК) — валериановая (изовалериановая) кислота; иКК — изокапроновая кислота; МолК — молочная кислота. КА — кровяной агар

Морфология и культуральные свойства возбудителя

Вегетативные клетки — крупные, строго грамположительные, жгутиков не имеют, неподвижны (один из немногих неподвижных видов). Классические формы представлены короткими палочками с обрубленными под прямым углом концами (0,6-1,0 × 1-1,5 мкм). Морфология может варьировать (антибиотики, ионы металлов, радиоактивное облучение), например, *in vitro* на углеводных безбелковых средах могут образовываться коккобациллярные формы, а на белковых безуглеводных средах — нити с заостренными концами длиной до 145 мкм. *In vivo* образуют капсулы (единственный капсулообразующий вид среди патогенных клостридий). В течение некоторого времени капсулы сохраняются и при культивировании на средах, содержащих нативный белок, наиболее выражены у вирулентных штаммов, резистентных к фагоцитарным реакциям. Хорошо окрашиваются анилиновыми красителями, в старых культурах могут быть грамотрицательными.

Споры *Clostridium perfringens* крупные, овальные, расположены центрально (у *C. perfringens* типа А — также субтерминально), клетка-спорангий практически не деформируется. Термоустойчивость спор серотипов В и D относительно невысока (погибают при кипячении в течение 15-30 минут), споры типов А и С более устойчивы и выживают при кипячении и даже автоклавировании в течение 1-6 ч. Спорообразование обычно имеет место в почве и кишечнике, *in vitro* споры можно получить на щелочных средах, богатых белком и не содержащих утилизируемых углеводов (например, на свернувшейся лошадиной сыворотке). Спорообразование стимулирует прогревание при 75°C в течение 10-15 минут.

Тип А. *Clostridium perfringens* типа А — факультативный анаэроб (в сравнении с другими клостридиями) и относительно толерантен к кратковременным кислородным воздействиям, хотя имеются чувствительные штаммы, погибающие при воздействии O₂ на культуру в течение 3 минут. Способен расти в высоких столбиках сред без герметизации вазелином.

Морфология колоний

У *Clostridium perfringens* типа А значительно варьирует от условий выращивания. На плотных питательных средах обычно образуются S- и R-колонии. S-колонии круглые, сочные, куполообразные, с гладкими ровными краями, в начале роста прозрачные, напоминающие капли росы, позднее становятся мутными, серовато-белыми. R-колонии неправильной формы, бугристые, с неровными шероховатыми краями, в глубине агара напоминают комочки ваты. У некоторых штаммов отмечают слизистые M-колонии, особенно у слизистых вариантов *C. perfringens* типа А, образующих густую слизь на жидких средах, они напоминают S-колонии с более высоким куполом и слизистой консистенцией; представлены капсулированными клетками. Иногда можно наблюдать смешанные O-колонии.

На агаре Цейслера через 12-18 ч образует гладкие сероватые колонии с ровными краями и плотным возвышением в центре. Колонии окружены зоной гемолиза, он может быть полным либо частичным. Зона гемолиза может быть двойной: вокруг колоний полный гемолиз (за счет действия гемолизина), на отдалении — неполный (за счет действия лецитиназы). При контакте с кислородом колонии могут приобретать зеленоватую окраску.

На желточном агаре образует колонии, окруженные зоной перламутрового преципитата (фосфорилхолин), образующегося из лецитина куриного желтка под действием лецитиназы.

Характерный признак колоний *Clostridium perfringens* типа А — способность менять серовато-белый цвет на зеленовато-оливковый после кратковременного пребывания в аэробных условиях (может служить дифференциально-диагностическим признаком).

Колонии в толще питательной среды имеют вид чечевичных зерен, дисков или комочков ваты.

Рост на жидких и полужидких средах, особенно содержащих глюкозу, происходит очень бурно с образованием H_2 и CO_2 , и обычно заканчивается через 8-12 ч; при стоянии среда постепенно светлеет и образуется обильный осадок, культуры *Clostridium perfringens* типа А имеют характерный запах масляной кислоты. Оптимум рН 7,2-7,4, но могут расти в интервале 5,0-8,5. Первые признаки роста на среде Китта-Тароцци могут проявляться уже через 1-2 ч (особенно при 43°C); последние проявляются появлением пузырьков газа из-под кусочков печени при встряхивании. Помутнение среды и активное газообразование можно наблюдать через 4-8 ч культивирования.

Антигенная структура

Выделяют 6 сероваров (А-F) *Clostridium perfringens*, различающихся по антигенным свойствам продуцируемых экзотоксинов. Все серовары образуют α -токсин (лецитиназу). Тип А включает много подтипов, идентифицируемых реакциями агглютинации, что облегчает диагностику в случаях пищевых токсикоинфекций и анаэробных раневых инфекций.

Метаболическая активность

Clostridium perfringens расщепляет с образованием кислоты и газа глюкозу, ксилозу, галактозу, сахарозу, мальтозу, лактозу, раффинозу, маннозу, крахмал, гликоген и инозит; глицерин разлагают не все штаммы, не сбраживает маннит, дульцит; редко ферментирует салицин и инсулин. От прочих клостридий *C. perfringens* отличает способность восстанавливать нитраты, расщеплять лактозу, образовывать лецитиназу. Протеолитическая активность слабая; разжижает желатин, не разлагает казеин; только некоторые штаммы медленно разжижают свернувшуюся сыворотку. Интенсивно створаживают молоко с образованием крупноячеистого губчатого сгустка уже через 3 ч (феномен известен как «штормовая реакция»)

Патогенность

Для человека патогенны *Clostridium perfringens* типов А, С и D; типы В, С, D и Е вызывают аналогичные заболевания у сельскохозяйственных животных (табл. 5).

Таблица 5. Заболевания, вызываемые *C. perfringens*

ТИП	Заболевание
А	Газовая гангрена людей и животных, пищевые токсикоинфекции
В	Дизентерия молодняка сельскохозяйственных животных, энтеротоксемия овец и коз
С	Некротический энтерит человека, геморрагическая энтеротоксемия овец, коз, поросят и телят
Д	Инфекционная энтеротоксемия человека, овец, коз, кроликов, телят, «травяная болезнь» лошадей
Е	Энтеротоксемия телят и ягнят

Токсины и клинические проявления

Токсины. *Clostridium perfringens* образует как минимум 12 идентифицированных токсинов (ферментов) и энтеротоксин; у гиалуронидазы и дезоксирибонуклеазы (μ - и ν - токсины) токсичность не доказана; β -, γ -, η -, δ -, ϵ -, θ - и ι -токсины обладают летальным свойством, но их биохимическая активность изучена недостаточно, и только α -, κ - и λ -токсины – ферменты с выраженным токсическим действием. Мишени для действия основных токсинов — биологические мембраны в различных тканях, в основе поражения находятся ферментативные процессы, катализирующие гидролитическое расщепление и нарушение клеточной проницаемости с последующим отеком. Последний сопровождается снижением окислительно-восстановительного потенциала в клетках, активацией эндогенных протеаз, приводящих к аутолизу тканей, характерному для газовой гангрены.

α -Токсин (лецитиназа С) проявляет дерматонекротизирующее, гемолитическое и летальное (убивает лабораторных животных при внутривенном введении) действие, опосредованное лецитиназной (фосфолипазной) активностью (разлагает лецитин на фосфорилхолин и глицериды), продуцируют все типы *Clostridium perfringens*, но наиболее интенсивно тип А.

β -Токсин вызывает некроз тканей и оказывает летальное действие на морских свинок-альбиносов, гемолитического действия не оказывает, активность *in vivo* реализуется в развитии некротических энтеритов, основные продуценты — типы В и С.

δ -Токсин проявляет гемолитическую активность в отношении эритроцитов барана, но не в отношении эритроцитов кролика или лошади, оказывает ле-

тальное действие на лабораторных животных, основные продуценты — типы В и С.

θ-Токсин оказывает гемолитическое (кислород-чувствительное), дермато-некротизирующее и летальное действие, разрушает эритроциты барана и лошади, а также (незначительно) мышцы, основной продуцент — *Clostridium perfringens* типа С, типы А, В, D и Е образуют его в меньших количествах.

ε- и ι-токсины оказывают летальное и дерматонекротизирующее действие, протоксины, выявляемые в фильтратах культур, активируются трипсином. ε-токсин продуцируют типы В и D, ι-токсин — штаммы типа Е.

κ-токсин (коллагеназа и желатиназа) разрушает ретикулярную ткань мышц и коллагеновые волокна соединительной ткани, активно усиливает цистеин в присутствии Fe^{2+} , оказывает летальное и некротизирующее действие, продуценты — типы А, С, Е и некоторые штаммы типа D.

λ-токсин (протеиназа) расщепляет денатурированный коллаген и желатин, во многом действует подобно фибринолизину, как и ε-токсин, секретируется в форме протоксина, активируемого трипсином. Проявляет активность экзоэнзима, обуславливающего некротические свойства.

γ- и η-токсины оказывают летальное действие на лабораторных животных; их биохимическая природа остается неизвестной.

μ- и ν-токсины по своей химической природе — гиалуронидаза и дезоксирибонуклеаза, μ-токсин ответствен за повышение проницаемости тканей, ν-токсин расщепляет нуклеиновые кислоты, тем самым нарушая реакции белкового синтеза. Фильтраты микробных культур *Clostridium perfringens* могут содержать также различные токсические вещества (например, фибринолизин и гиалуронидазу).

Энтеротоксин образуют *Clostridium perfringens* типов А и С, вызывающие пищевые токсикоинфекции, по своей природе он термолабильный протеин, продуцируемый при споруляции бактерий в толстой кишке, его практически не образуют лабораторные культуры, и он быстро разрушается при термической обработке пищевых продуктов, что значительно затрудняет его биохимическое изучение и идентификацию; вызывает рвоту и диарею, оказывает летальное действие, а также обуславливает появление эритематозной кожной сыпи у лабораторных животных. Диарея развивается вследствие потери воды и электролитов за счет дилатации и повышения проницаемости капилляров.

Газовая гангрена развивается при попадании *Clostridium perfringens* на раневые поверхности, где бактерии активно размножаются в условиях пониженного содержания кислорода. Микроорганизмы, а чаще их споры, могут быть занесены в раны из внешней среды, а также с кожи или из ЖКТ пациента. Для поражений характерны некроз тканей и образование газа с гнилостным запахом. Обильное образование газа характерно преимущественно для анаэробных раневых инфекций, вызванных данным микроорганизмом, известным также как палочка газовой гангрены. Характерная особенность гистологи-

ческих препаратов, полученных из очагов поражения — практически полное отсутствие фагоцитов в очаге некротических поражений.

Пищевые токсикоинфекции, вызванные серотипами А и С, приобретают все большую значимость и представляют актуальную проблему для здравоохранения большинства стран мира.

Clostridium perfringens типа А вызывает преимущественно токсикоинфекции легкой и средней тяжести, инкубационный период составляет 6-24 ч; заболевания развиваются остро, с ощущениями боли в животе, рвотой (иногда с кровью) и диареей (до 20 раз в сутки), общие нарушения проявляются слабостью, головокружениями, повышение температуры наблюдают редко. Симптомы исчезают в последующие 12-24 ч. Летальные исходы наблюдают редко, обычно у ослабленных пациентов — пожилых лиц, хронических больных и детей с нарушениями питания. Следует помнить о способности микроорганизмов проникать в кровоток и вызывать тяжелый анаэробный сепсис.

Более тяжело протекает некротический энтерит, вызванный штаммами серотипа С. При острых формах болезнь может закончиться смертью пациента в течение 12-24 ч. Симптомы аналогичны поражениям, вызываемым бактериями серотипа А, и обусловлены действием β -токсина, подобные пациенты нередко попадают на операционный стол с диагнозом «кишечная непроходимость», смертность достигает 35%. Заболевание регистрируют достаточно редко; большое число случаев наблюдали в Германии после второй мировой войны (в 1945-1948 гг. — 1056 случаев), а в настоящее время периодически отмечают в Новой Гвинее, что связано с особенностями национальной кухни.

Термоустойчивость спор. Даже внутри серотипа А она может меняться в зависимости от штамма.

При варке мяса некоторые споры погибают в течение нескольких минут, тогда как другие выдерживают кипячение в течение часа и дольше (особенности штамма). Споры, находящиеся в жировой ткани, выживают на протяжении длительного времени (до 6 часов).

Повышение температуры до 75°C стимулирует прорастание спор, температурный оптимум для роста в вареном мясе 43°C, в оптимальных условиях дочерние популяции образуются в течение 12-13 минут.

Лабораторная диагностика

В соответствии с методическими указаниями по лабораторной диагностике (1979) предусмотрено обнаружение и идентификация токсина в содержимом тонкого кишечника в реакции нейтрализации на белых мышах. Параллельно проводится выделение и идентификация возбудителя по тинкториальным, культуральным и токсигенным свойствам, изучение ферментативных свойств не предусмотрено. Используются лабораторные животные.

Выделение проводят по общепринятой схеме (рис. 2). При смешанных инфекциях можно прогреть исследуемый материал и выделить *Clostridium*

perfringens из термоустойчивых спор, внесенных в питательную среду, с последующим развернутым анализом.

Идентификация микроорганизма осуществляется набором стандартных тестов — подвижность, серологические реакции и др.; *Clostridium perfringens* также можно идентифицировать по росту на яичном агаре: колонии *C. perfringens* окружены опалесцирующим белым «преципитатом», появляющимся под действием α -токсина (лецитиназы C); образование зон преципитации можно ингибировать, наложив на половину чашки специфическую антисыворотку одновременно с посевом тест-культуры.

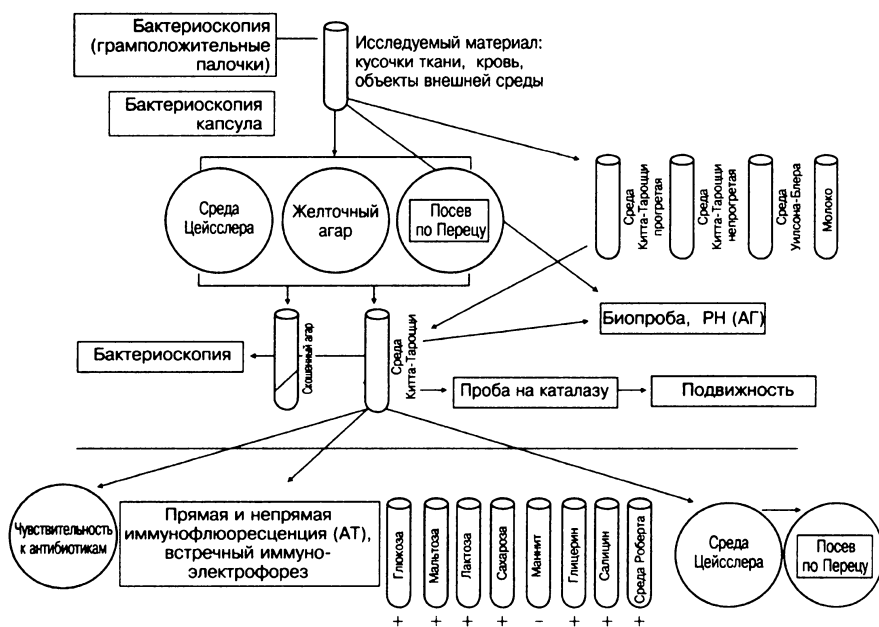


Рисунок 2. Схема бактериологического исследования на *Clostridium perfringens*

Столбнячная палочка

Clostridium tetani вызывает столбняк — тяжелое заболевание, опосредованное нейротоксическим действием бактериального экзотоксина (тетаноспазмина), ведущее проявление — судорожный синдром, включающий болезненные сокращения мышц (тетанус) и длительное напряжение мышц (мышечная ригидность). Характерными проявлениями последнего считаются опистотонус (тетанический спазм, при котором позвоночник и конечности согнуты, боль-

ной лежит на спине и опирается на затылок и пятки) и *risus sardonicus* (*risus caninus*) — подобие оскала, вызванного спазмом мышц головы. Возбудитель столбняка практически одновременно открыли Монастырский (1883) и Николайер (1884), в чистой культуре впервые выделен Китазато (1889).

Распространение

Микроорганизмы встречаются повсеместно, но точных статистических данных об их распространении нет, так как во многих странах болезнь не подлежит обязательной регистрации. Тем не менее, ежегодная смертность от столбняка превышает 100 000 человек.

Естественный резервуар и источник инфекции — почва, хотя многие исследователи более склонны считать резервуаром инфекции толстую кишку сельскохозяйственных и диких животных. Входные ворота инфекции — бытовые и производственные травмы, причем наиболее часто поверхностные, когда больной не обращается за медицинской помощью.

Повышенную заболеваемость отмечают в регионах с теплым климатом, создающим условия не только для длительного сохранения спор в почве, но и для их прорастания и размножения вегетативных форм.

Заболеваемость значительно возрастает во время военных действий у раненых; основная группа риска в мирное время — работники сельского хозяйства (составляют 80-86% заболевших).

Морфология возбудителя

Вегетативные клетки. Бактерии представляют собой грамположительные палочки с закругленными концами длиной 4-8 мкм и толщиной 0,3-0,8 мкм (в молодых культурах иногда образуют нитевидные клетки), располагаются одиночно или цепочками, подвижны (содержат 20 и более жгутиков, расположенных по периферии клетки), но в старых культурах (30 сут. и более) преобладают неподвижные формы. Облигатные (строгие) анаэробы, отличаются высокой чувствительностью к O_2 ; у бактерий отсутствуют цитохромы, цитохромоксидаза, пероксидаза и каталаза.

Споры круглые, реже овальные, расположены терминально, их диаметр в 2-3 раза превышает толщину бактерий, вследствие чего спорангий имеет форму теннисной ракетки или барабанной палочки. Их отличает высокая устойчивость к химическим и физическим воздействиям, в частности, они выживают в течение 8-10 ч в 1% растворе сулемы и 5% растворе фенола, а также выдерживают кипячение в течение 0,5-1 ч. Спорообразование начинается на 2-3 сутки; на 4-6 сутки роста на жидкой среде вегетативные клетки разрушаются, и в среде остаются почти одни споры.

Морфология колоний. На МПА и желатине в строго анаэробных условиях возбудитель растет медленно и образует тонкие прозрачные колонии с ровными или шероховатыми краями, рост колоний характерный — сначала на поверхности среды появляется сеточка, образованная сливающимися колониями

с отростками. Растет в виде прозрачных или серовато-желтых шероховатых (R) и гладких (S) колоний. При посеве столбиком в полужидкий агар через 24-48 ч формирует колонии в виде чечевичек (R-форма) или пушинок с плотным коричневым центром (S-форма).

Антигенная структура

У *Clostridium tetani* выявляют O- и H-Аг. По жгутиковым Аг выделяют 10 сероваров, все серовары продуцируют идентичные по своим антигенным свойствам тетаноспазмин и тетанолизин.

Биохимия

Основные продукты метаболизма — уксусная, масляная, пропионовая кислоты, этанол. Большинство штаммов не обладает сахаролитической активностью, но выделено несколько штаммов, ферментирующих глюкозу. *Clostridium tetani* проявляет слабые протеолитические свойства; медленно расщепляет белки и пептоны до аминокислот (последние разлагаются до угольной кислоты, водорода, аммиака, летучих кислот и индола); для роста необходимы аргинин, гистидин, тирозин, валин, изолейцин, лейцин и триптофан. Бактерии образуют желатиназу и рениноподобный фермент, опосредующий появление затемненных зон вокруг колоний *C. tetani* на молочном агаре.

Патогенность

Патогенность *Clostridium tetani* обусловлена способностью образовывать тетаноспазмин и тетанолизин: действие этих токсинов на организм, в особенности тетаноспазмина, вызывает столбняк у человека и животных.

Тетаноспазмин — полипептид; М_r 150 000 Д; действует дистанционно, т.к. бактерии редко покидают пределы раны. Считают антигенно однородным, хотя обнаружено 4 группы детерминант, но их структура и локализация плохо изучены. Токсин фиксируется на поверхности отростков нервных клеток, проникает в них (за счет лигандопосредованного эндоцитоза) и посредством ретроградного аксонного транспорта попадает в ЦНС. Механизм действия связан с подавлением высвобождения тормозных нейромедиаторов (в частности, глицина и γ -аминомасляной кислоты) в синапсах (токсин связывается с синаптическими белками синаптобrevина и целльбrevина).

Первоначально токсин действует на периферические нервы, вызывая местные тетанические сокращения мышц. Токсин появляется в культурах на 2 сутки, достигая пика образования к 5-7 дню. Разрушается при длительном хранении в термостате, под действием света и кислорода.

Для получения токсина *in vitro* бактерии можно выращивать на мясных средах, например бульоне Мартена с пептоном, среде Мюллера с настоем бычьего сердца и пептоном из триптического гидролизата казеина; в отечественной практике наибольшее распространение получила среда из кислотного

гидролизата казеина, экстракта пшеничных отрубей и дрожжевого экстракта (в среду можно добавлять рыбную муку).

Тетанолизин (тетаногемолизин) *Clostridium tetani* обладает гемолитическим, кардиотоксическим и летальным свойствами, в патогенезе заболевания играет менее важную роль; максимальное накопление токсина в культуре наблюдают уже через 20-30 ч, процессы его образования не связаны с синтезом тетаноспазмина.

Клинические проявления

Легкая форма (локальный столбняк) характеризуется периодическими спазмами в пораженной области.

Мозговые поражения включают поражения черепных нервов (наиболее часто — VII); характерны тонические спазмы мышц головы и глотки.

Генерализованный столбняк — наиболее часто встречаемая форма с характерными мышечными спазмами; из других проявлений можно отметить тахикардию, аритмии, менингит, гипокальциемию.

Иммунитет

Естественный иммунитет к столбняку отсутствует. В отношении постинфекционного иммунитета существуют противоречивые данные: некоторые авторы считают, что он не формируется, тогда как другие выявляли антитоксин в сыворотках переболевших лиц в концентрациях 0,001-1,5 АЕ/мл.

Иммунопрофилактика. Со времен Беринга и Китазато известно, что введение в организм обезвреженного токсина создает выраженный иммунитет к столбняку. Позднее Рамон разработал метод его получения; его высокую эффективность подтвердили единичные случаи столбняка в войсках союзников во время второй мировой войны. Иммуногенные свойства анатоксина увеличивает его сорбция на гидроокиси алюминия. В настоящее время столбнячный анатоксин применяют для активной иммунопрофилактики столбняка, первичную вакцинацию проводят детям в возрасте с 5-6 месяцев до 5 лет (курс включает 3 инъекции с интервалом 30-40 суток); при заболевании применяют столбнячный антитоксин — гипериммунную человеческую антисыворотку (курс — 2 инъекции, в тяжелых случаях — 3 инъекции дробно).

Лабораторная диагностика

Возбудитель обычно обнаруживают в месте проникновения в организм больного. Поэтому наиболее рационально исследование различного материала, взятого в месте ранения. В тех случаях, когда входные ворота неизвестны, следует тщательно осмотреть больного для выявления ссадин, царапин, катаральных и воспалительных процессов, необходимо обратить внимание на старые рубцы после ранения, т.к. возбудитель может долго в них сохраняться; в некоторых случаях исследуют слизь из носа, бронхов, глотки, налет с миндалин, а также выделения из влагалища и матки (при послеродовом столбняке

или аборте). При бактериологическом исследовании трупов также принимают во внимание возможность генерализации инфекции. Для анализа забирают кровь (10 мл) и кусочки печени и селезенки (20-30 г).

Выделение возбудителя проводят по стандартной схеме (рис. 3) Исследованию подлежат материал от больного или трупа, перевязочный и шовный хирургический материал, а также почва, пыль и воздух.

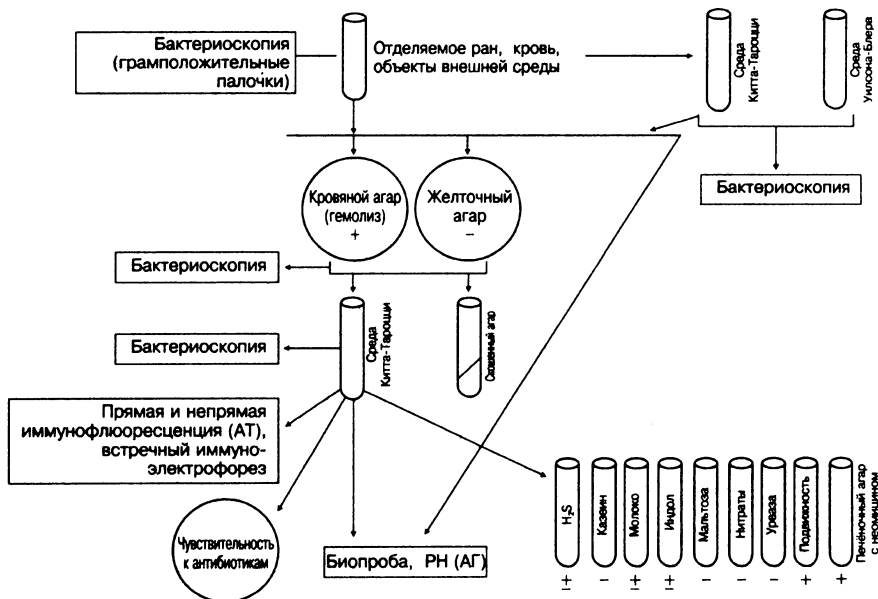


Рисунок 3. Схема бактериологической идентификации *Clostridium tetani*

Биологическая проба. При исследовании материала от больного или трупа параллельно бактериологическому анализу проводят обнаружение столбнячного анатоксина в биологической пробе на мышах. Для этого материал измельчают, добавляют двойной объем физиологического раствора, инкубируют в течение часа при комнатной температуре, фильтруют, часть filtrата смешивают с противостолбнячной сывороткой из расчета 0,5 мл (200 АЕ/мл) сыворотки на 1 мл экстракта и инкубируют 40 минут. Затем одной группе животных вводят экстракт без предварительной инкубации с сывороткой, а другой группе — проинкубированную смесь, при наличии *Clostridium tetani* у животных первой группы развиваются симптомы столбняка.

Clostridium botulinum

Clostridium botulinum — возбудитель ботулизма, тяжелой, часто фатально заканчивающейся пищевой токсикоинфекции. В России первое клинико-эпидемиологическое описание ботулизма привел Зенгбуш (1818); возбудитель открыл ван Эрменген (1869).

Распространение

Clostridium botulinum широко распространены в почве. Заболевание регистрируют повсеместно, исключая районы вечной мерзлоты. Наиболее часто заболевания вызывают типы А и В, тип G первично выявлен в Аргентине, а тип Е более распространен в регионах, включающих большие естественные водоемы, — Северной Японии, области Великих озер (США, Канада), Швеции, Дании, Британской Колумбии (Канада), РФ, где бактерии настолько обильно колонизируют придонный ил, что отмечаются случаи заражения рыб. Периодическое пересыхание водоемов стимулирует рост *Clostridium botulinum*. Для профилактики интоксикаций продуктами промышленного производства при консервировании мяса широко применяют нитриты; в этом плане наибольшую опасность представляют мясные, рыбные и овощные консервы домашнего приготовления.

Естественный резервуар и источник инфекции — почва и различные животные.

Морфология возбудителя

Вегетативные клетки — палочки с закругленными концами размером 4-8×0,6-0,8 мкм, подвижны (перитрихи). При неблагоприятных условиях образуют эндоспоры, расположенные терминально и субтерминально. Строгие анаэробы; молодые культуры окрашиваются грамположительно, 4-5-суточные — грамотрицательно. Оптимум рН для роста 7,3-7,6, для прорастания спор 6,0-7,2.

Морфология колоний. На кровяном агаре с глюкозой образуют очень мелкие сероватые или мутные желтоватые колонии линзообразной формы (на различных средах у одного и того же штамма могут варьировать). Вокруг колонии образуются зоны гемолиза различной ширины. На печеночном агаре образуют полиморфные звездчатые колонии, на желатине — сероватые, окруженные зоной разжиженного желатина. На столбике агара можно обнаружить диссоциаты, R-формы имеют форму чечевичных зерен, S-формы — пушинок. Хорошо растут на жидких средах (обычно на бульоне Тароцци, бульонах из гидролизатов казеина, мяса или рыбы) при условии предварительного удаления O₂ из среды кипячением в течение 15-20 мин с быстрым охлаждением. Вызывают помутнение среды и газообразование, иногда имеется запах прогорклого масла, но этот признак непостоянен.

Антигенный состав

Серологическая идентификация *Clostridium botulinum* основана на выявлении токсинов, по их структуре бактерии разделяют на 8 сероваров — А, В, С_{1(α)}, С_{2(β)}, D, E, F и G. Антигенная структура бактерий остается малоизученной, показано наличие жгутиковых, группоспецифических (H) и соматических, типоспецифических (O) Ag, не проявляющих токсических свойств. Оптимальная температура для токсинообразования переменна для бактерий типов А, В, С и D 35°C, для бактерий типов E и F 28-30°C

Биохимические свойства

Все типы *Clostridium botulinum* образуют желатиназу, лецитиназу и H₂S, проявляют широкий спектр сахаролитической активности (бактерии типов А, В, E и F ферментируют глюкозу, левулезу, фруктозу, мальтозу и сахарозу типов С и D — глюкозу и мальтозу, тип G инертен к углеводам). *Clostridium botulinum* типов А и В обладают выраженными протеолитическими свойствами, разлагают свернувшийся яичный белок и гидролизуют желатин. По биохимическим свойствам выделяют 4 группы.

Бактерии I группы проявляют выраженные протеолитические свойства, гидролизуют желатин и эскулин, ферментируют глюкозу и мальтозу, проявляют липазную активность на яичном агаре.

Бактерии II группы проявляют сахаролитическую активность, но лишены протеолитической.

Бактерии III группы проявляют липазную активность и гидролизуют желатин.

Бактерии IV группы гидролизуют желатин, но, в отличие от прочих возбудителей ботулизма не проявляют сахаролитических свойств и липазной активности, что послужило основанием для предложения выделить их в отдельный вид — *Clostridium argentiense*.

Патогенность

Патогенность *Clostridium botulinum* различна для различных видов млекопитающих; заболевания человека вызывают бактерии типов А, В, E и F; *Clostridium botulinum* типов С и D вызывают заболевания животных и птиц (в редких случаях от больных животных выделяют бактерии типов А и В). Патогенность типа G для человека и животных не доказана.

Клинические проявления преимущественно обусловлены действием нейротоксина (т.к. в условиях организма размножение вегетативных форм *Clostridium botulinum* затруднено) и включают:

- классическую пищевую токсикоинфекцию, более распространенную под названием «ботулизм»;
- раневой ботулизм (возникает при загрязнении некротизированных тканей почвой);

- ботулизм новорожденных (у детей от 3 до 20 недель), характерны генерализованная гипотония и амиотрофия, развивается при заглывании спор с последующим развитием вегетативных форм (в США ежегодно регистрируют около 70 случаев);
- неопределенно классифицируемый ботулизм (у детей старше одного года и взрослых), не связанный с указанными факторами риска (пища, рана).

Фармакокинетическая активность токсинов различных типов *Clostridium botulinum* практически одинакова: все они сорбируются на клетках слизистой оболочки кишечника, проникают в кровь (где их можно выявить серологически) и в периферические нервные окончания. Фармакологическое действие включает связывание N-цепи токсина с мембраной, поглощение токсина и формирование пор в синаптических пузырьках (каждую пору формируют 4 молекулы токсина), что приводит к блокированию слияния синаптических пузырьков с мембраной; мишень для действия — интегральные синаптические белки. В частности, токсины серотипов B, D и F расщепляют синаптобrevин, A и E — SNAP-25, C — синтаксин, D и F — целлюбrevин. Избирательно поражают α -моторные нейроны передних рогов спинного мозга, что обуславливает характерные параличи мышц. Токсины термолabileны, но для полной инактивации требуется кипячение в течение 20 минут.

Клинические проявления. Временной интервал между попаданием токсина в организм и появлением первых признаков ботулизма обычно не превышает 24 ч, но может варьировать от 4-6 до 96 ч и более. Проявления зависят от природы продукта, ставшего причиной отравления, количества токсина, поступившего в организм, и состояния больного. Первые, но непостоянные признаки — расстройства ЖКТ (тошнота, рвота, боли в животе). Часто больные жалуются на сухость во рту или гиперсаливацию. Одновременно развиваются головная боль и нервно-паралитические явления — нарушение глотания, дисфагия и офтальмоплегический синдром; часто наступают односторонний или двусторонний блефароптоз и анизокория — результат поражения сфинктера зрачка. Циркуляция токсина в кровотоке приводит к уменьшению притока крови к правому предсердию. Кроме поражения ЦНС, ботулотоксин вызывает периферические поражения нервно-мышечной передачи, проявляющиеся сначала вялостью движений или полной адинамией с последующим развитием парезов и/или параличей глазных, глоточных и гортанных мышц, а также мышц шеи и конечностей.

Довольно часто случаи детского ботулизма связаны с кормлением детей медом. Первый такой случай зарегистрирован в 1943г.; симптоматика раневого ботулизма аналогична таковой при пищевом отравлении и обусловлена действием токсина, выделяемого бактериями в ране.

Токсин *Clostridium botulinum* — белок, оказывающий нейротоксическое действие. В зависимости от типа возбудителя, идентифицируемого по антигенной структуре токсина, M_r может варьировать от 60 до 150 кД. Представлен

Zn²⁺-зависимыми эндопептидазами, при протеолизе разлагается на 2 связанных дисульфидной связью фрагмента (L- и H-цепи). Механизм биологической активности реализуется через связывание H-цепи с мембраной, проникновение токсина в клетку, формирование пор в пузырьках (каждую пору формируют 4 молекулы токсина), что приводит к блокированию слияния синаптических пузырьков с мембраной. Токсин разрушается при кипячении, легко кристаллизуется в белый хлопьевидный порошок. Токсины всех типов также оказывают гемолизирующее действие.

Иммунитет

Чувствительность к ботулиническому токсину у различных животных (в том числе одного вида) подвержена резким колебаниям. Абсолютно резистентные виды неизвестны, но всеядные животные обладают меньшей чувствительностью. Динамика заболевания не сопровождается выработкой значимых титров АТ, что связано с незначительной (с точки зрения иммуногенных свойств) дозой токсина, вызвавшей поражение. Перенесенное заболевание не оставляет антитоксического иммунитета. У выздоровевших пациентов в сыворотке определяют АТ к токсинам и микробным клеткам, что свидетельствует о комплексном характере иммунного ответа, направленного как на связывание токсина, так и на элиминацию возбудителя. Следовательно, ботулизм можно рассматривать не только как интоксикацию, но и как токсикоинфекцию (конечно, не отрицая ведущей роли токсина в патогенезе заболевания).

Лабораторная диагностика

Выделение возбудителя проводят по общепринятой схеме (рис. 4). Лабораторному исследованию подлежат остатки пищевых продуктов, материал, полученный от больного, секционный материал. Кровь берут из вены пациента в количестве 5-10 мл и разводят 3-4% раствором цитрата натрия в соотношении 2:1, промывные воды из желудка забирают в объеме 50-100 мл, кал — 50-60 г. На секции забирают кусочки печени (50-60 г), отрезки кишечника и желудка и их содержимое. До поступления в лабораторию образцы хранят на холоде.

Кровь исследуют только на наличие токсина с помощью биологической пробы на мышах (вводят 2 мл) или морских свинках (вводят 5-8 мл). Испражнения исследуют только на наличие возбудителя посевом на питательные среды, весь остальной материал — на наличие токсина и возбудителя. Банки с консервами выдерживают в термостате 10-12 суток, стерильно отбирают 50-100 г, растирают и центрифугируют, в надосадочной жидкости определяют токсин, в осадке — возбудитель. Мясо и рыбу обрабатывают спиртом и забирают пробы из внутренних частей (пробы рыбы рекомендуют брать от хребта и внутренних органов). Пробы изучают аналогично исследованиям консервированных продуктов.

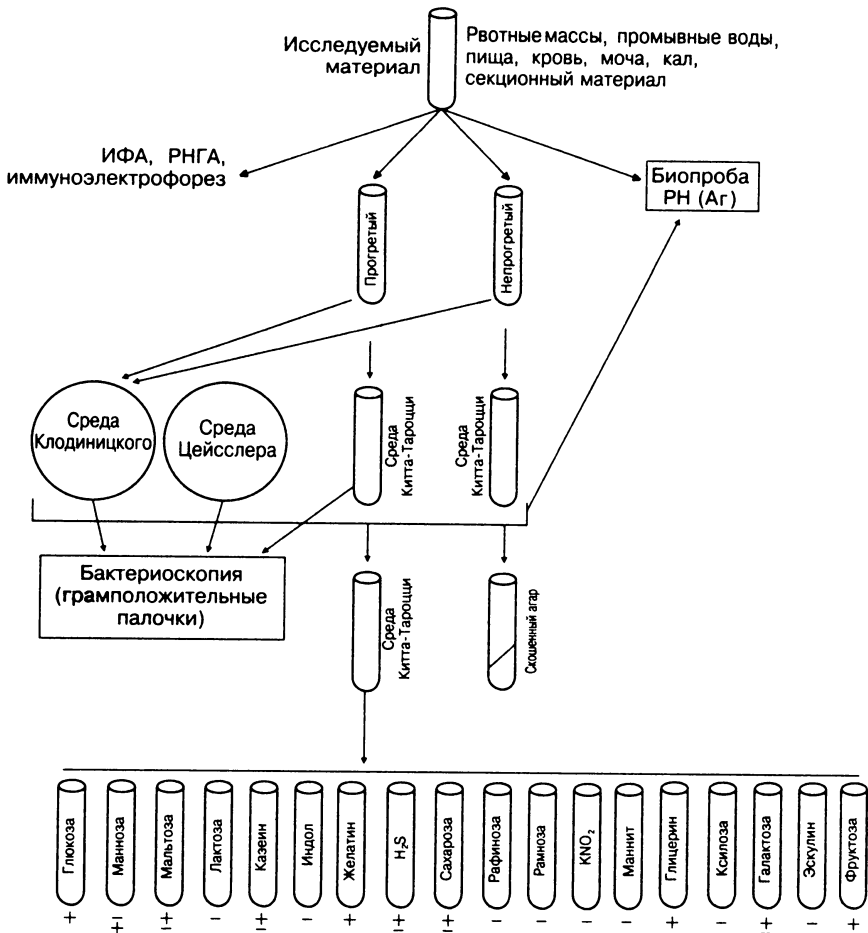


Рисунок 4. Принципиальная схема бактериологического выделения *Clostridium botulinum*

Clostridium novyi

Clostridium novyi (*Clostridium oedematiens* типа А) — как и *Clostridium perfringens* — основной возбудитель анаэробной раневой инфекции, также известной как газовая гангрена, газовый или злокачественный отек, инфекционного некротического гепатита овец. Впервые раневая госпитальная гангрена была описана Парре в 1562 г, через 3 столетия Вельпо (1839) опубликовал свои наблюдения над подобным заболеванием, названным им «травматическая эм-

физема». Полное описание клинической картины и течения разлитых форм газовой инфекции, наблюдаемых им во время Севастопольской и Кавказской кампаний, дал Н.И. Пирогов. Позднее Веинберг и Сэган (1891) установили, что открытая ими бактерия злокачественного отека (*Clostridium oedematiens* типа А) способна вызывать инфекции у человека; возбудитель позднее (1894) был охарактеризован Нови и получил его имя. В годы второй мировой войны инфекции, вызванные *Clostridium novyi*, составляли 42% случаев гангрены. Микроорганизм широко распространен в природе, может быть выделен из почвы, осадочных отложений, а также из органов ЖКТ здоровых животных.

Морфология и культуральные свойства

Вегетативные клетки. Крупные или слегка изогнутые подвижные грам-положительные палочки размером 4-10×1-2мкм; перитрихи (20-25 жгутиков). Обладают выраженным полиморфизмом (некоторые штаммы образуют короткие цепочки или нити); при старении теряют способность окрашиваться по Граму, но хорошо красятся анилиновыми красителями. В молодых культурах похожи на *Clostridium perfringens*, но отличаются подвижностью. облигатный анаэроб (при пересевах колонии, выросшие на поверхности питательных сред, следует как можно меньше держать на воздухе). Молодые клетки хорошо окрашиваются основными анилиновыми красителями, бактерии из старых культур могут изменять отношение к окраске по Граму.

Споры овальные, расположены центрально или субтерминально. На мясных и казеиновых средах спорообразование наблюдают на 2-6 сутки. Лучше всего споры образуются на средах, бедных утилизируемыми углеводами и другими питательными веществами. На обогащенных средах спорообразование менее обильное и более медленное. Устойчивы к нагреванию (выживают при кипячении в течение 1-2 ч), в костях животных сохраняются до 10 лет.

Морфология колоний. На плотных средах в анаэробе уже через 48 ч образуют круглые сочные сероватые полупрозрачные колонии, иногда с зернистой поверхностью и неровными краями. Различают несколько типов бактерий. Бактерии типов А, В и С имеют тенденцию к образованию дочерних и подвижных колоний. На кровяном агаре возбудитель склонен образовывать шероховатые колонии, у бактерий типов А, В и С они окружены зоной гемолиза. Бактерии типа D эритроциты не разрушают. Колонии типов А и В, выросшие на кровяном агаре с бензидином, быстро чернеют на воздухе (за счет образования H_2O_2). В глубине агара образуются колонии, напоминающие линзы, комочки ваты, снежные хлопья и т. д., часто окрашены в желтоватый или коричневатый цвет. На жидких средах колонии растут сравнительно медленно и вызывают сдвиг pH в кислую сторону (за счет образования органических кислот и H_2S). На мясо-пептонных бульонах с 0,5% глюкозы или 3% декстрина при 37°C происходит равномерное помутнение среды, затем образуется рыхлый осадок.

Антигенная структура

Серологическая идентификация основана на выявлении соматических Ag; у штаммов типов А, В и D антигенная структура представлена 2 одинаковыми соматическими Ag, находящимися в различных соотношениях, антисыворотки к штаммам типа В могут иногда перекрестно реагировать с Ag других типов.

Биохимические свойства

Бактерии типов А, В и С ферментируют глюкозу, фруктозу и мальтозу, а тип D — только глюкозу, глицерин разлагают все микроорганизмы (кроме нескольких штаммов типа В). Показано наличие у бактерий типа А глицерокиназы, α -амилазы и α -глюкозидазы, что указывает на способность разлагать полисахариды путем гидролиза и фосфорилирования. Протеолитические свойства у *Clostridium novyi* выражены сравнительно слабо, все штаммы разлагают желатин, свертывают молоко (медленно), но не разлагают свернувшийся яичный белок (исключая несколько штаммов), бактерии типа D образуют индол и H_2S .

Патогенность

Clostridium novyi типов А и В вызывают газовую гангрену у человека и животных (наиболее частый возбудитель — тип А). Бактерии вырабатывают 8 токсинов, определяющих их патогенность (табл. 6). γ -токсин (фосфолипаза) и β -токсин (некротическая, гемолитическая лецитиназа С) не тождественны одноименным токсинам *Clostridium perfringens*. α -токсин — термолабильный, некротизирующий токсин (его продуцируют культуры типа А и В), кроме того, *Clostridium novyi* образует гиалуронидазу, идентичную μ -токсину *C. perfringens*. Культуры патогенны для многих лабораторных животных (мыши, морские свинки, кролики, крысы). У морских свинок на месте инъекции образуется желатинозный, студенистый отек. У 50% штаммов культуральная жидкость токсична для мышей.

Лабораторная диагностика

Лабораторная диагностика включает серологическую идентификацию Ag возбудителя и АТ к ним в различных биологических жидкостях организма и выделение культуры возбудителя (аналогично бактериологическому исследованию на наличие *Clostridium perfringens*), что в случае *Clostridium novyi* представляет определенные трудности. Дифференциальную диагностику от прочих клостридий, вызывающих анаэробные инфекции, проводят оценкой сахаролитических, протеолитических и некоторых других биохимических свойств (табл. 7).

Таблица 6. Токсины, вырабатываемые различными типами *Clostridium novyi*

Токсин	Биологическая активность	Тип А	Тип В	Тип С	Тип D
α	Термолабильный, летальный, некротический	+	+	-	-
β	Лецитиназа С, летальный, некротический, гемолитический	-	+	-	+
γ	Лецитиназа, некротический, гемолитический	+	-	+(?)	-
δ	O ₂ -лабильный, гемолизин	+	-	-	-
ϵ	Липаза	+	-	-	-
ξ	Гемолизин, O ₂ -стабильный	?	+	-	-
η	Тропомиозиназа	-	+	-	+
θ	Активность неизвестна, вызывает помутнение лецитовителлина	-	+	-	+
Вызываемые заболевания		Анаэробная инфекция	Анаэробная инфекция, «черная болезнь» травоядных	Хронический остеомиелит буйволов	Бациллярная гемоглобинурия телят

Таблица 7. Признаки некоторых патогенных клостридий

Признак	<i>C. perfringens</i>	<i>C. novyi</i>	<i>C. septicum</i>	<i>C. histolyticum</i>	<i>C. sporogenes</i>	<i>C. bifermentans</i>	<i>C. sordellii</i>	<i>C. fallax</i>
Подвижность	–	+	+	+	+	+	+	+
Сахаролитические свойства:								
глюкоза	+	+	+	±	+	+	+	+
левулеза	+	±	+	±	–	–	+	+
лактоза	+	±	+	±	–	–	–	±
сахароза	+	±	±	±	–	–	+	+
галактоза	+	±	+	±	+	–	–	±
мальтоза	+	±	+	±	+	–	+	+
инулин	–	–	–	±	–	–	–	±
маннит	±	±	±	±	–	–	±	–
дульцит	–	–	–	–	–	–	–	–
салицин	–	±	+	±	–	+	–	±
глицерин	±	+	±	±	–	–	+	–
крахмал	+	–	–	–	–	–	–	–
Свернувшаяся сыворотка	±	–	–	+	+	+	+	–
Гемолитическая активность	±	+	+	+	+	+	+	±
Лакмусовое молоко	КГ, сгусток через 3-16 ч	Свертывание за несколько сут	То же	Пептонизация	То же	То же	То же	Медленная пептонизация
Агар с бензидином	–	Почернение	–	–	–	–	–	

КГ — ферментация с образованием кислоты и газа.

Прочие возбудители анаэробной раневой инфекции

Помимо *Clostridium perfringens* и *Clostridium novyi*, патологические процессы у человека и животных могут вызывать и другие клостридии. Исторически многообразие форм анаэробных поражений привело к тому, что к началу первой мировой войны имелось 71 наименование, обозначающее анаэробную инфекцию, за время войны их дополнили 20 названиями, а к концу войны — еще 16. В 1861 г. Пастер описал «септический вибрион», а со времени выделения культуры совместно с Жубером (1977) *Vibrion septique* длительное время оставался единственным идентифицированным патогенным микробом, с действием которого связывали многие заболевания. Дальнейшая история открытия возбудителей анаэробных инфекций включает выделение сапрофитов *C. pulrificus* (Биншток, 1883) и *Clostridium sporogenes* (И. И. Мечников, 1908), а в 1915 г. Вейнберг и Сэгэн выделяют *C. fallax*, «бациллу злокачественного отека» *Clostridium oedematiens* (1915) и «тканерастворяющую» бациллу *Clostridium histolyticum* (1917). Характерная особенность микроорганизмов — способность проявлять патогенное свойство в условиях смешанных раневых инфекций. Все они грамположительные анаэробы (но некоторые относительно толерантны к O₂), образуют споры, форма которых варьирует от круглой до цилиндрической. Принцип выделения возбудителей напоминает таковой при выделении культуры *C. perfringens*.

Clostridium histolyticum

Подвижная палочка (также встречаются неподвижные изоляты) размером 3-5×0,5-0,8 мкм; грамположительна, но в старых культурах может быть грамотрицательной. В мазках часто образует пары или короткие цепочки, иногда единичные бактерии. Очень подвижна в молодых культурах, клетки из старых культур неподвижны (также известны изначально неподвижные штаммы). Почти на всех средах быстро образует субтерминальные споры («игольное ушко») с трехслойной оболочкой, не деформирующие клетку. Строгий анаэроб, растет при давлении 3-15 мм рт.ст. (оптимум 8 мм рт.ст.), но обладает аэротолерантностью, оставаясь жизнеспособной в аэробных условиях в течение 10 ч. В аэробных условиях растет плохо и не образует спор и образует колонии меньшего размера. В анаэробных условиях на кровяном агаре образует прозрачные выпуклые колонии диаметром 0,5-1 мм, окруженные тонкой зоной гемолиза. При продолжительном отборе можно получить штаммы, формирующие колонии в виде головы Медузы. В толще агара неподвижные штаммы образуют «пушинки» с уплотненным центром, подвижные — чечевицеобразные колонии или колонии с протуберанцем. Вызывают сплошное помутнение жидких сред с протеолизом кусочков мяса и печени на дне. Через 2 сут среда становится прозрачной, а на дне образуется осадок. рН почти не меняется; запах отсутствует. Инертны к углеводам (к ферментации без образования кисло-

ты способны лишь некоторые штаммы); не образуют индол, но вырабатывают в больших количествах сероводород. Проявляют выраженные протеолитические свойства — разлагают желатин, свернувшуюся сыворотку, яичный белок и коллаген (табл. 7). Продуцируют 5 серологически идентифицируемых токсинов: α -токсин (основной токсин), оказывающий летальное и некротическое действие; β -токсин (коллагеназа), расщепляющий азоколл и желатин; γ -токсин (протеиназа), активируемый восстановителями и не разрушающий нативный коллаген, но расщепляющий азоколл, желатин и казеин; δ -токсин (эластаза), проявляющий аналогичную активность; ϵ -токсин, проявляющий O_2 -зависимую гемолитическую активность (лабилен к кислороду, в антигенном отношении близок к стрептолизину O). У животных *Clostridium histolyticum* — один из возбудителей злокачественного отека (газовой гангрены), обычно в ассоциации с прочими анаэробами. *Clostridium histolyticum* патогенны для лабораторных животных. Морские свинки при внутримышечной инъекции свежей вирулентной культуры, выращенной на мясной среде, погибают в период от нескольких часов до нескольких дней. В зоне инъекции наблюдается расплавление мышц, газа не образуется, гнилостного распада нет.

В соответствии с действующей инструкцией при лабораторной диагностике злокачественного отека проводится микробиологическое исследование, подкожное заражение морских свинок изучаемым материалом в область брюшных мышц, изучение тинкториальных и культуральных свойств выделенной культуры.

***Clostridium septicum* (палочка Гона-Сакса)**

Возбудитель злокачественного отека, браздота овец. Обнаруживается в почве, кишечном тракте домашних животных, при соответствующей патологии животных и человека. Полиморфные подвижные палочки размером $4-5 \times 0,8$ мкм; в тканях способны образовывать нити длиной до 500 мкм. В культурах клетки могут быть яйцевидные, веретеновидные, образуют цепочки. При контакте с O_2 теряют подвижность, но не так быстро, как *C. oedematiens*. Через 24 ч культивирования образуют субтерминальные споры. Строгие анаэробы; растут при давлении 8-15 мм рт.ст. (выдерживают до 25 мм рт.ст.). Остаются жизнеспособными при доступе O_2 в течение 10 ч. На поверхности твердых сред образуют блестящие полупрозрачные колонии (диаметром до 4 мм) с неровными краями (имеют тенденцию к ползучему росту). На агаре Цейслера через 48 ч палочки образуют сплошной нежный налет, окруженный зоной гемолиза. В столбике 1% агара формируют колонии с отходящими переплетающимися нитями, на 2% агаре колонии имеют вид дисков, иногда с протуберанцем. Ферментируют некоторые углеводы и не разлагают (практически все штаммы) сахарозу (что используют для дифференциальной диагностики с *C. chavoei*); протеолитическая активность выражена умеренно (см. табл. 7). На среде Китта-Тароцци дает обильный рост; газообразование переменное; че-

рез 2 суток образует осадок. Продуцируется 4 экзотоксина: α -токсин, основной фактор патогенности, проявляющий летальную, некротизирующую и гемолитическую активность; β -токсин, обладающий свойствами ДНКазы; γ -токсин (гиалуронидаза); δ -токсин, проявляющий свойства O_2 -лабильного гемолизина. При дифференциации от *Clostridium chavoëi* используют следующие тесты: гемагглютинация эритроцитов барана, гемолиз эритроцитов курицы (Матвеев, Быченко 1973).

Clostridium chavoëi

Возбудитель эмфизиматозного карбункула крупного рогатого скота и овец. Бактериальные клетки отличаются полиморфизмом, особенно в живой ткани, могут иметь форму лимона, груши, в мазках чистой культуры - прямые или слегка изогнутые палочки, одиночные, пары, реже короткие цепочки. По своим биологическим и антигенным свойствам мало отличается от *Clostridium septicum*, некоторые авторы рассматривают его как подвид *C. septicum*: *C. septicum* тип А и *C. chavoëi* тип В. Однако каждый из этих микроорганизмов полностью нейтрализует только гомологичная сыворотка, а при дифференциальной диагностике этих микроорганизмов необходимо учитывать отсутствие полной перекрестной нейтрализации токсинов, слабую терморезистентность у *C. septicum* и высокую у *C. chavoëi*, длительный инкубационный период при инфекции, вызванной первым микроорганизмом, и практически полное его отсутствие при заболеваниях, вызванных *C. chavoëi*, способность *C. septicum* агглютинировать эритроциты барана и лизировать эритроциты кур. Молоко створаживает за 3-6 суток; казеин и свернувшуюся сыворотку не разжижает; желатин не гидролизует. На кровяном агаре, среде Цейсслера образует характерные слабо выпуклые колонии в виде перламутровой пуговицы или с изрезанными краями – напоминающие виноградные листья, нежного фиолетового цвета; на средах с кровью дает α -гемолиз. На среде Китта-Тароцци характерен обильный рост, споры образует через 24 ч, колонии не имеют неприятного запаха, но старые культуры могут иметь запах прогорклого масла. Строгий анаэроб. Температурный оптимум 36-37°C. Слабо растет при 25°C и не растет при 45°C. В соответствии с методическими указаниями по диагностике эмкара, исследования включают изучение тинкториальных и культуральных свойств выделенного микроорганизма (без изучения биохимических свойств) и определение ее патогенности для морской свинки. Характерным изменением у морских свинок, зараженных подкожно в области брюшных мышц является наличие гемморагического выпота или точечных кровоизлияний на месте инъекции. Кожа от пораженных мышц отделяется с трудом, мышцы темно-красного цвета. В подкожной клетчатке обнаруживают небольшое количество пузырьков газа.

Clostridium sporogenes

Ассоциируется с возбудителем злокачественного отека. Выделяется из почвы, фекалий овец, собак и при патологических состояниях человека и животных. Подвижные палочки размером 3-6×0,5 мкм; проявляют выраженные протеолитические свойства и биохимически инертны в отношении большинства углеводов (табл. 7). Температурный оптимум 30 – 40°C. Анаэроб. На кровяном агаре формирует колонии неправильной формы с ризоидными краями, серого цвета, выпуклые, обычно с зоной гемолиза. В агаре столбиком рост напоминает комочки ваты с плотным центром. При смешанных анаэробных инфекциях увеличивают вирулентность *Clostridium perfringens* и *Clostridium septicum*; при попадании жизнеспособных спор в мышцы способны вызывать гнойные процессы. Палочка не образует токсинов, участвующих в патогенезе анаэробной раневой инфекции.

Clostridium sordellii

Выделена Сорделли от больного газовой гангреной в Буэнос-Айресе; (1922). Один из возбудителей злокачественного отека. Обнаруживают в почве и при патологических состояниях человека и животных. Подвижная палочка размером 2-4×0,6-1 мкм; факультативный анаэроб; на плотных питательных средах уже через 24-48 ч образует выпуклые сероватые колонии с неровными краями. На агаре с эритроцитами лошади дает узкую зону гемолиза, а на шоколадном агаре образует узкую зону просветления (за счет протеолиза). На агаре с куриным желтком, молоком и лактозой формирует зону опалесценции вокруг колоний. На жидких мясных средах дает интенсивный рост, часто с образованием слизи. Ферментирует многие углеводы, но не лактозу и сахарозу, проявляет выраженные протеолитические свойства (табл. 7). Вирулентные штаммы продуцируют высоколетальный некротизирующий токсин, напоминающий α-токсин *Clostridium novyi*; также образует лецитиназу С, серологически сходную с лецитиназой *C. perfringens* типа А, но проявляющую меньшую активность; продуцирует гемолизин типа θ-токсина *C. perfringens* типа А и δ-токсина *Clostridium novyi* и *Clostridium septicum*.

Clostridium fallax

Впервые выделена Прево из почвы тропических районов Африки. Один из возбудителей газовой гангрены. Подвижная прямая палочка (в молодых культурах) с закругленными концами, 2-5×0,5 мкм; строгий анаэроб, температурный оптимум 37°C; на поверхности агара через 24-48 ч образует мелкие плоские прозрачные колонии с неровными краями, по мере старения колонии становятся матовыми; в агаре с высоким столбиком образует чечевицеобразные колонии, на кровяном агаре дает узкую полосу гемолиза. Ферментирует углеводы; проявляет умеренную протеолитическую активность (табл. 7), свертывает молоко с образованием кислоты. Не образует индола и не восстанавливает

нитраты. По мнению ряда авторов, способна вырабатывать летальный токсин, серологически не идентифицированный до настоящего времени. Свежевыделенные штаммы вирулентны для морских свинок и мышей, вызывают серозно-фибринозный отек и некроз мышц. При пассаже вирулентность штаммов быстро теряется.

Clostridium bifermentans

По морфологии и биохимическим свойствам похожа на *Clostridium sordellii*, дифференциальная диагностика основана на серологической идентификации агглютининов спор; образует лецитиназу С. Иногда вызывает газовую гангрену у человека; вместе с *Clostridium novyi*, *C.septicum*, *C.histolyticum* и *C.perfringens* типа А (продуцирующими α -токсин) относится к так называемым гистотоксическим клостридиям. Неподвижная палочка размером $4-8 \times 1-1,5$ мкм, в молодом возрасте грамположительная; в мазках располагается цепочками. Быстро образует центральные или субтерминальные споры, не деформирующие клетку. На агаре Цейслера обуславливает нежный рост, напоминающий рост *C. oedematiens*. На средах с кровью дает α -гемолиз; проявляет лецитиназную активность (лецитиназа С). Разжижает свернувшуюся сыворотку, гидролизует желатин, ферментирует глюкозу, левулезу и мальтозу. На среде Китта-Тароцци газ не образуется, через 24 ч культивирования появляется осадок. Рост сопровождается гнилостным запахом.

Clostridium difficile

Среди прочих патогенных клостридий следует упомянуть открытую Холлом и О'Тулом (1935) *Clostridium difficile*. Возбудитель вызывает псевдомембранозный энтероколит на фоне нерациональной терапии антибиотиками (клиндамицином, ампициллином и цефалоспоридами) и цитостатиками, вызывающими глубокий дисбаланс микрофлоры и колонизацию кишечника *C.difficile*. Бактерии продуцируют 2 вида экзотоксина — токсин А (энтеротоксин) с M_r 44 000-50 000 Д (оказывает диареогенное и летальное действие, стимулирует гуанилатциклазу) и токсин В (цитотоксин) с M_r 47 000 Д (оказывает летальное действие, значительно превосходящее действие токсина А, нарушает функции мембран с потерей K^+ и фибронектина, ингибирует синтез белка). Проявляет высокую резистентность к антибиотикам широкого спектра действия, что создает предпосылки для обширной колонизации кишечника и секреции больших доз токсинов, вызывающих изменения кишечной стенки; чувствительна к действию ванкомицина. Носительство *C. difficile* особенно распространено у новорожденных (до 50%), но именно у них наблюдают самый низкий уровень поражений. По мере развития нормальной микрофлоры (6-12 месяцев) число носителей уменьшается и среди взрослых лиц не превышает 3%. Следует помнить, что псевдомембранозный колит — сугубо госпитальная инфекция, доминирующая среди прочих госпитальных кишечных поражений, превышая в 2-3 раза число инфекций, вызванных сальмонеллами. Среди ново-

рожденных возможна контактная передача от ребенка ребенку или с руками персонала (при пеленании, кормлении и купании одними и теми же руками); среди взрослых доминируют контактно-бытовые пути госпитального распространения.

Антибиотиковый энтероколит характеризуется профузными водянистыми диареями; у 50% пациентов выявляют лейкоциты в кале и лейкоцитоз. Больные жалуются на коликообразные боли в животе, температура тела может достигать 39°C и выше.

Псевдомембранозный энтероколит характеризуется образованием и выделением с калом пленчатого материала — структур, представленных фибрином и слизью.

Питательные среды для культивирования клостридий

Среда Китта-Тароцци. Мясо или печень крупного рогатого скота нарезают мелкими кусочками, заливают трехкратным объемом МПБ или бульона Хоттингера (рН 7,4—7,6) и 30 минут кипятят. Затем среду фильтруют, печень (мясо) промывают водопроводной водой, подсушивают фильтровальной бумагой. По 3—4 кусочка мяса (печени) помещают в пробирку, наливают 7—8 мл бульона, покрывают слоем вазелинового масла и стерилизуют при 120°C 20 минут. Перед использованием среду регенерируют (кипятят с последующим охлаждением).

Кровяной агар с глюкозой. К 3%-ному МПА (рН 7,2—7,4), расплавленному и охлажденному до 50°C, добавляют до 1—2% стерильного раствора глюкозы, 15—20% свежей дефибринированной крови барана или лошади. Разливают по чашкам Петри, подсушивают 20—30 минут в термостате. Культивирование проводят в анаэробе.

Полужидкий агар для строгих анаэробов (Тароцци). В бульон Мартена (рН 7,2-7,4) с 0,3-0,5% глюкозы добавляют 0,1% агара. Среду разливают по 9 мл в стерильные пробирки с кусочками вареного мяса, печени или фарша, стерилизуют при 120°C 30 минут. Среду можно использовать, не заливая поверхность вазелиновым маслом.

Агар для трубок Виньял-Вейона. В бульоне Мартена (рН 7,4) растворяют 2% агара, 0,1% глюкозы. Среду разливают в узкие тонкостенные пробирки и стерилизуют дробно, текучим паром в течение 3 дней.

Бульон Вейнберга для анаэробов. 1 кг бычьего сердца пропускают через мясорубку, добавляют к фаршу 1 л воды, нагревают до кипения, охлаждают, снимают жир. Смешивают 400 г печени, 400 г свиных желудков, 40 г соляной кислоты, 4 л воды, подогретой до 50°C, и выдерживают при этой температуре 18-24 ч. Затем подогревают до 100°C, жидкость сливают, фильтруют, добавляют 0,2% двуосновного фосфорнокислого натрия и устанавливают рН 7,4. Смешивают 1 л мясной воды из сердца быка и 2 л полученного пептона, устанавливают рН 7,8—8,2 и стерилизуют при 120°C 30 минут. Бульон разливают

по пробиркам с кусочками вареной печени, наливают стерильное вазелиновое масло слоем 0,5 см и вновь стерилизуют при 120° С 30 минут. Перед посевом к бульону добавляют стерильный раствор глюкозы до 0,5%.

Среда Виллиса и Хоббе. Смешивают 400 мл бульона Хоттингера, 4,8 г агара, 4,8 г лактозы, 1,3 мл 1%-ного раствора нейтрального красного. Стерилизуют при 115°С 15 минут, охлаждают до 50°С и добавляют 15 мл стерильной желточной суспензии (смешивают поровну куриный желток и физиологический раствор) и 60 мл стерильного обезжиренного молока.

Железо-сульфитный агар (Вильсон, Блер, 1924). К 100 мл 3%-ного МПА (рН 7,4) с 1% глюкозы при температуре 60°С добавляют 10 мл 20%-ного раствора сернокислого натрия (Na_2SO_3) и 1 мл 8%-ного раствора хлористого железа (FeCl_3), приготовленного на стерильной дистиллированной воде. Раствор Na_2SO_3 предварительно стерилизуют 1 ч текучим паром. Затем среду, не стерилизуя, разливают по чашкам Петри. Сернистокислый натрий можно заменить серноватистокислым натрием ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), а хлористое железо—сернокислым (FeSO_4). При восстановлении Na_2SO_3 сульфат натрия соединяется с хлорным железом и образуется черный осадок сернистого железа (FeS). Этой способностью обладают анаэробы и некоторые аэробные бактерии, вследствие чего колонии таких микроорганизмов окрашиваются в черный цвет. *S. perfringens*, обладающий большой скоростью роста, изменяет цвет среды через 1-2 ч культивирования. Другие анаэробы формируют зеленовато-черные колонии через 6-7 ч.

Железо-сульфитное молоко (Робинзон, Стоваль, 1937). К 100 мл обезжиренного молока добавляют 10 мл 20%-ного раствора сернистокислого натрия и 1 мл 8%-ного хлористого железа. Среду готовят непосредственно перед использованием и разливают по пробиркам. На данной среде *S. perfringens* можно обнаружить в смеси со стрептококками, которые на других средах способны заметно тормозить его рост.

Бензидино-красный агар (Гордон, Мак Леод, 1940). К 3%-ному МПА (рН 6,4) с 1% глюкозы, подогретому до температуры 50°С, добавляют бензидин до концентрации 9% и 10% стерильной дефибрированной крови барана. Компоненты перемешивают до приобретения средой шоколадного оттенка, разливают по чашкам Петри и подсушивают 4-5 ч в термостате. Засеянные чашки выдерживают в анаэробных условиях в термостате 12-24 ч, а затем переносят в аэробные условия. Колонии *S. поуу* окрашиваются в черный цвет за 15-30 минут. Раствор бензидина готовят следующим образом: к 50 мл дистиллированной воды добавляют 0,25 г основного бензидина, 0,3 мл 1% HCl и нагревают до растворения. Раствор пригоден для употребления в течение 2 недель.

Желточно-красный агар (Шапина-Вегина, 1962). К 2,5%-ному МПА добавляют 10% дефибрированной крови барана, 10% желточной взвеси. Среда предназначена для выявления *S. поуу*. Через 16 ч выращивания колонии ок-

ружены непрозрачной зоной гемолиза с наличием на поверхности среды вокруг колоний непрозрачной пленки с жемчужным блеском. Другие бактерии (аэробы, анаэробы), как правило, не дают одновременно перламутрового слоя и зоны редукции.

Полусинтетическая среда (Bonnel, Burgian, Raby, 1959). Используют для культивирования и быстрой селекции анаэробных бактерий. В 1000 мл дистиллированной воды растворяют 15 г пептона, 5 г дрожжевого экстракта, 2,5 г натрия хлорида, 1,3 г агар-агара и подщелачивают Na_2CO_3 . Смесь автоклавировуют при 120°C в течение 15 минут, фильтруют и добавляют 5,5 г глюкозы, 0,5 г гидросульфита натрия (предварительно растворенные в небольшом количестве воды), устанавливают рН 7,1. Добавляют 0,001 г резазурина и встряхивают смесь в течение нескольких минут. Среду разливают в пробирки по 15 мл, стерилизуют при 110°C 30 минут, охлаждают под холодной водой. При росте анаэробов среда окрашивается в нижней части пробирки, факультативных анаэробов — весь столбик среды. Среду используют 3 недели при хранении в условиях комнатной температуры.

Перфрингенс-агар (O.P.S.P.-агар, пропись фирмы «Дифко», 1982). В 1000 мл дистиллированной воды растворяют 15 г триптона, 5 г дрожжевого экстракта, 5 г соевого пептона, 7 г печеночного экстракта, 1 г железа аммонийно-цитратного, 1 г натрия метабисульфита, 1,5 г трис-буфера, 10 г агара, устанавливают рН 7,3. Стерилизуют автоклавированием при 121°C 15 минут, затем охлаждают до 50°C , вносят добавки (стерильно), обеспечивающие среде селективные свойства, и разливают по чашкам Петри. Добавка «А» содержит 100 мг натрия судьфадиазина, добавка «В» — 0,5 г олеандомицина фосфата и 10000 ЕД полимиксина В сульфата. Среда состоит из 100 мкг/мл натрия сульфадиазина, 0,5 мкг/мл олеандомицина фосфата и 10 ЕД полимиксина В сульфата. Данный состав обеспечивает селективные свойства, оптимальные для изоляции *S. perfringens*.

Натрия метабисульфат и железо аммонийно-цитратное являются индикаторами редукции сульфита, что влияет на формирование колоний возбудителя черного цвета диаметром 2-4 мм. Рост других сульфатредуцирующих бактерий (сальмонеллы, протей, цитробактер, стафилококки, бациллы) ингибируется. На среде могут расти энтерококки, но их колонии по внешнему виду отличаются от колоний *S. perfringens*.

Анаэробный агар Шадпера (пропись фирмы «Дифко», 1982). В 1000 мл дистиллированной воды растворяют 10 г триптического соевого бульона, 5 г пептона, 5 г дрожжевого экстракта, 5 г декстрозы, 0,4 г цистеина гидрохлорида, 0,01 г гемина, 0,75 г трис-буфера, 13,5 г агара. Устанавливают рН 7,6, стерилизуют автоклавированием при 121°C 15 минут.

С селективными добавками среду используют для выделения клостридий, бактероидов, флавобактерий, лактобацилл, стрептококков (анаэробных) из проб фекалий и кишечного тракта.

Для изоляции клостридий и бактериоидов к 1000 мл основного анаэробного агара добавляют 10 г порошка плаценты и 0,002 г неомидина. С целью выделения флавобактерий в 1000 м³ вносят 7 мл 0,5%-ного тиротрицина в этаноле. Для анаэробных лактобацилл и стрептококков в 1000 мл вносят 10 г натрия хлорида и 0,002 г неомидина. Посевы инкубируют при 37°C в анаэробных условиях.

Основной перфрингенс-агар (пропись фирмы «Дифко», 1982). Среда используется для изготовления TSC- или SFP-агара при предварительной идентификации и подсчете *S. perfringens*.

В 1000 мл дистиллированной воды растворяют триптозы—15 г, соевого пептона — 5 г, мясного экстракта (сухого) — 5 г, дрожжевого экстракта — 5 г, натрия метабисульфита — 1 г, железа аммонийно-цитратного — 1 г, агара — 14 г. Устанавливают pH 7,6, стерилизуют при 121°C 10 минут. Затем среду охлаждают до 50°C и вносят соответствующие селективные добавки.

Триптозо-сульфитный циклосериновый агар (TSC-агар). В основной перфрингенс-агар вносят D-циклосерин из расчета 400 мг/л и 50 мл/л желточной эмульсии. Компоненты перемешивают и готовую среду разливают в чашки Петри.

Перфрингенс-агар Шахиди—Фергусона (SFP-агар, пропись фирмы «Дифко», 1982). В основной перфрингенс-агар вносят следующие антибиотики: 12 мг/л канамицин-сульфат, 30000 ЕД/л полимиксин В сульфата и 50 мл/л желточной эмульсии. Готовую среду разливают в чашки Петри. На обеих указанных средах вокруг черных колоний *S. perfringens* образуется опалесцирующая зона, указывающая на лецитиназную активность микроорганизма.

Анаэробный бульон Шадлера (пропись фирмы «Дифко», 1982). По составу среда аналогична анаэробному агару Шадлера, но из нее исключен агар. Используют для выращивания патогенных анаэробов, для определения антибиотикоустойчивости анаэробов методом разведений с выражением результата в виде МИК.

Тиогликолевый бульон (пропись фирмы «Дифко», 1982). В 1000 мл дистиллированной воды растворяют 0,5 г L-цистина, 2,5 г натрия хлорида, 5,5 г декстрозы, 5 г дрожжевого экстракта, 15 г панкреатического перевара казеина, 0,5 г натрия тиогликолята. Устанавливают pH 7,1, разливают по емкостям и стерилизуют при 121°C 15 минут. Перед использованием среду кипятят и охлаждают.

Рекомендуется для контроля на контаминацию различных материалов анаэробными бактериями.

Анаэробный агар Уилкинс-Чангрена (пропись фирмы «Дифко», 1982). В 1000 мл дистиллированной воды растворяют 10 г триптона, 10 г желатинового пептона, 5 г дрожжевого экстракта, 1 г декстрозы, 5 г натрия хлорида, 1 г L-аргинина, 1 г натрия пирувата, 0,0005 г менадиона, 0,005 г гемина, 10 г агара. Устанавливают pH 7,1, стерилизуют при 121°C 15 минут.

Среда рекомендуется для изоляции анаэробных микроорганизмов из клинических материалов, является стандартной для определения антибиотикочувствительности анаэробных бактерий. При исключении агара среда может быть использована как питательный бульон.

Обогащенный клостридиальный агар (RCM-агар, пропись фирмы «Дифко», 1982). В 1000 мл дистиллированной воды растворяют 3 г дрожжевого экстракта, 10 г мясного экстракта, 10 г пептона, 5 г декстрозы, 1 г растворимого крахмала, 5 г натрия хлорида, 3 г натрия ацетата, 0,5 г цистеина гидрохлорида, 15 г агара. Устанавливают pH 6,8, стерилизуют при 121°C 15 минут.

Среда рекомендуется для исследования кишечной микрофлоры. Perry et al. (1955) использовали ее для изучения рубцовых стрептококков, Bornes, Goldberg (1962), внося в состав хлортетрациклина гидрохлорид или натрия азид, применяли среду для исследования фекал кур. С добавками крови она пригодна для обнаружения в фекал животных и людей лактобацилл, с добавками крови и неомидина — бактероидов.

Грамположительные, аэробные и факультативные кокки.

К данной группе отнесены достаточно различающиеся роды микроорганизмов, собранные для удобства в одну группу на основании двух общих признаков — сферическая форма тела и положительная окраска по Граму. Эти микроорганизмы не образуют спор, подавляющее большинство их не обладает подвижностью. Роды распадаются на подгруппы – аэробные, факультативно анаэробные и строго анаэробные. Другими удобными признаками для разделения родов служат расположение клеток и каталазная активность. Каталазоположительные кокки дифференцируют с помощью бензидиновой пробы, положительной у цитохромсодержащих микроорганизмов

Таблица 8. Отличительные признаки патогенных кокков

Признак	Staphylococcus	Micrococcus	Stomatococcus
Каталаза	+	+	±
Наличие капсулы	–*	–	+
Рост на среде с 5% NaCl	+	+	–
Способность к анаэробному росту на среде с глюкозой	+	–	+
Чувствительность к лизостафину	+	–	–
Чувствительность к бацитрадину (0,04 ЕД)	–	+	+

* – Подавляющее большинство видов

Микроорганизмы рода Staphylococcus

Микроорганизмы данного рода представлены примерно 30 видами, которые по фенотипическим признакам условно подразделяются на 4 группы.

Стафилококки — клетки сферические, повсеместно распространенные микроорганизмы, некоторые виды вызывают инфекционные заболевания у человека и животных.

Первых представителей рода выделил в 1880 Л. Пастер из гноя фурункула, в 1881 г. А. Огстон дал ему название *Staphylococcus*. В 1884 из очагов гнойных поражений человека Ф. Розенбах выделил виды *S. albus*, *S. aureus*. Данные микроорганизмы в основном ассоциированы с кожными покровами и слизистыми оболочками теплокровных. Но их выделяют и из пищевых продуктов и воды, что обуславливает пищевые токсикозы и токсикоинфекции.

Род образуют неподвижные кокки диаметром 0,5-1,5 мкм, располагающиеся в мазках одиночно, парами или гроздьями, что обусловлено способностью делиться во взаимно перпендикулярных плоскостях. Стафилококки неподвижны; факультативные анаэробы; хемоорганотрофы с окислительным и ферментативным метаболизмом, каталазоположительны; содержат цитохромы, но обычно оксидазоотрицательны, чувствительны к действию лизостафина, но не лизоцима (*Schleifer, Kloos*), это обусловлено лабильностью пентаглициновых мостиков, соединяющих мурамовую кислоту и тетрапептиды в пептидогликанах клеточной стенки.

Растут на средах содержащих до 10% NaCl, температурный оптимум роста — 30-37 °С; предпочтительна слабощелочная реакция среды. На плотных средах образуют мутные круглые ровные колонии кремового, желтого или оранжевого цвета. Цвет колоний обусловлен наличием липохромного пигмента, его образование происходит только в присутствии кислорода и наиболее выражено на средах, содержащих кровь, углеводы или молоко. Вызывают характерное разжижение желатина с образованием воронки, заполненной жидкостью (на 4-5 сут.) На жидких средах дают равномерное помутнение, а затем рыхлый осадок, превращающийся в тягучую массу. Восстанавливают нитраты, образуют H₂S, разлагают глюкозу, ксилосу, сахарозу, мальтозу, глицерин, маннит с выделением кислоты; уреазы-положительны; крахмал не гидролизуют; индол не образуют. Видоспецифичными Аг являются тейхоевые кислоты; для *S. aureus* — рибитейхоевые, для *S. epidermidis* — глицеринтейхоевые; у *S. saprophyticus* выявляют оба типа кислот. Типовой вид — *S. aureus*. Стафилококки хорошо переносят высушивание, сохраняя вирулентность; погибают при прямом воздействии солнечного света в течение 10-12 ч. Довольно устойчивы к нагреванию — при 70-80 °С погибают за 20-30 минут, при 150 °С — за 10 минут; сухой жар убивает их за 2 ч. Менее устойчивы к действию дезинфектантов, но резистентны к воздействию чистого этанола. 14 из 27 известных видов обнаружены на коже и слизистых оболочках (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. capitis*, *S. saccharolyticus*, *S. auricularis*, *S. simulans*, *S. cohnii*, *S. xylosus*, *S. lugdunensis* и *S. schleiferi*); большинство из них лучше растет в аэробных условиях (исключая *S. saccharolyticus*, предпочитающих анаэробные условия). По наличию коагула-

зы все стафилококки разделяют на две группы; среди патогенных видов коагулаза-положителен лишь *S. aureus*. остальные виды называют коагулаза-отрицательными. Основные поражения вызывают *S. aureus*, *S. epidermidis* и *S. saprophyticus*.

Staphylococcus aureus

Распространение. Золотистый стафилококк распространен повсеместно и часто входит в состав нормальной микрофлоры макроорганизма. Микроорганизм выделяют у 15-30% клинически здоровых взрослых людей. В большинстве случаев носительство ограничено несколькими неделями или месяцами; хроническое носительство типично для персонала медицинских учреждений; пациентов, страдающих атопическими дерматитами, а также регулярно использующих инъекции различных препаратов (наркоманы, больные сахарным диабетом, лица с повторными гемодиализами и др.). Подавляющее число инфекций носит эндогенный характер, механизм инфицирования обычно связан с переносом возбудителя из участков колонизации на травмированную поверхность (например, кожные покровы); существенную роль играют также тесные контакты с носителями и лицами, страдающими стафилококковыми поражениями.

Патогенез поражений

Факторами патогенности являются микрокапсула, компоненты клеточной стенки, ферменты и токсические субстанции.

Микрокапсула защищает бактерии от комплемент-опосредованного поглощения полиморфноядерными фагоцитами, способствует адгезии микроорганизмов и их распространению по тканям. При выращивании *in vitro* обычно не образуется.

Компоненты клеточной стенки стимулируют развитие воспалительных реакций: усиливают синтез ИЛ-1 макрофагами, активируют систему комплемента и являются мощными хемоаттрактантами для нейтрофилов. Тейхоевые кислоты запускают комплементарный каскад по альтернативному пути, активируют свертывающую и калликреин-кининовую системы, а также облегчают адгезию к эпителиальным поверхностям. Белок А (агглютиноген А) неспецифически связывает Fc-фрагменты молекул IgG (что активирует компоненты комплемента по классическому и альтернативному пути) и усиливает активность естественных киллеров. Активация комплемента приводит к проявлению различных местных и системных реакции, например анафилаксии, феномена Арлтюса, угнетению активности фагоцитов и т.д.

Ферменты проявляют разнонаправленное действие: каталаза защищает бактерии от действия O₂-зависимых микробицидных механизмов фагоцитов; β-лактамаза разрушает молекулы β-лактамных антибиотиков; липазы облегчают адгезию и проникновение в ткани. Коагулаза, существующая в 3 анти-

генных формах, вызывает свертывание сыворотки; сам фермент не взаимодействует с фибриногеном, а образует тромбиноподобное вещество, предположительно взаимодействующее с протромбином.

Гемолизины. Выделяют 4 антигенных типа гемолизин, вызывающих полный гемолиз кровяных сред; золотистые стафилококки способны одновременно синтезировать несколько подобных продуктов.

α -Гемолизин (α -токсин) наиболее часто выявляют у бактерий, выделенных из клинических образцов; неактивен в отношении эритроцитов человека, но быстро лизирует эритроциты барана. При введении подопытным животным вызывает кожные некротические реакции и гибель животных после внутривенного введения.

β -Гемолизин (сфингомиелиназа) оказывает умеренное действие на эритроциты человека, выявляют у 20% изолятов. Проявляет выраженные свойства холодого гемолизина (максимальная активность проявляется при низких температурах).

γ -Гемолизин — двухкомпонентный гемолизин с умеренной активностью в отношении эритроцитов человека, поскольку один из компонентов инактивируют содержащие серу полимеры, присутствующие в агаре, то эффект этого гемолизина на кровяных средах обычно не проявляется.

δ -Гемолизин — агрегат низкомолекулярных соединений, проявляющих дергентные свойства, последние обуславливают цитотоксичность широкого спектра.

Токсины. Наибольшее значение имеют: эксфолиатины А и В, обуславливающие развитие синдрома «ошпаренной кожи»; токсин синдрома токсического шока (TSST-1), ответственный за развитие специфического симптомокомплекса (предположительно за счет стимулирования выделения фактора некроза опухоли); δ -токсин (лейкоцидин), ингибирующий всасывание воды и активирующий образование цАМФ (что имеет значение при стафилококковых диареях), а также оказывающий цитотоксическое действие на полиморфноядерные лейкоциты, энтеротоксины А-Е, ответственные за развитие пищевых интоксикаций (энтеротоксины В и С также приводят к развитию синдрома токсического шока).

Лабораторная диагностика

Включает выделение возбудителя из образцов.

Рост. Через 24 ч *S.aureus* образует гладкие выпуклые мутные колонии обычно желтоватого цвета около 4 мм в диаметре (бактерии вырабатывают желтый пигмент, и цвет колонии варьирует от белого до оранжевого); наиболее интенсивно пигмент образуется на агаре, дополненном 10% снятого молока. На кровяном агаре они окружены зоной полного гемолиза.

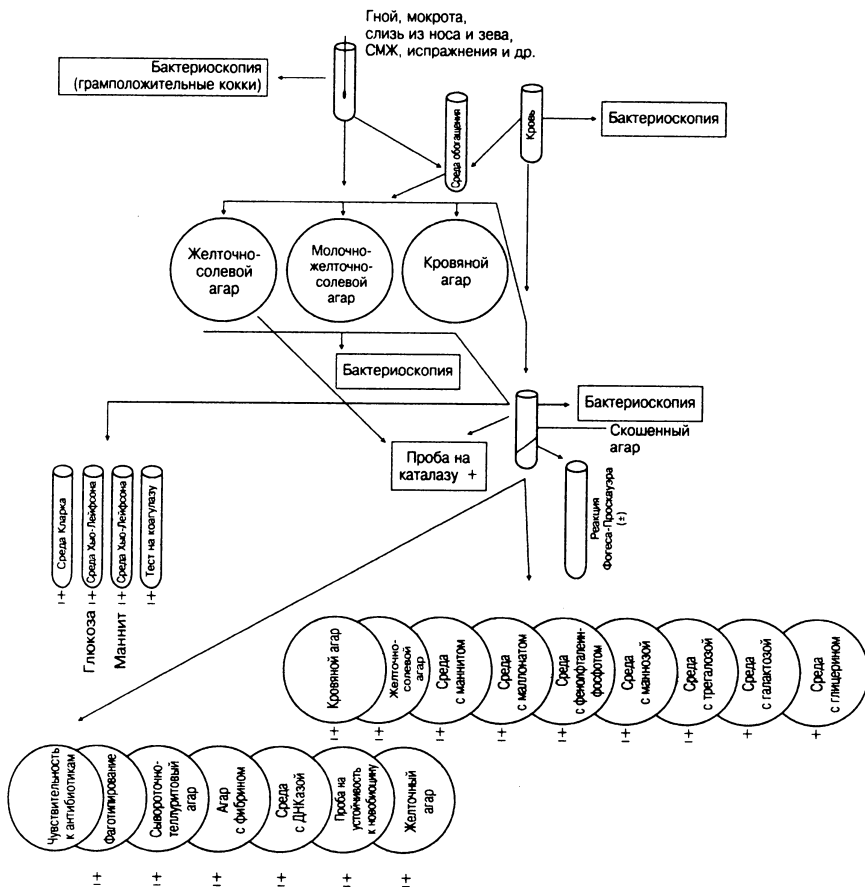


Рисунок 5. Принципиальная схема выделения стафилококков

Иногда, особенно на бедных средах, лишенных необходимых ростовых факторов (гемин, тиамин, пантотенат и др.), может формировать карликовые G-колонии (менее 1% изолятов), лишенные зон гемолиза и часто растущие в виде сателлитных колоний вокруг других бактерий в смешанных культурах. Также следует помнить о способности стафилококков образовывать полиморфные L-формы, для возврата к исходным формам проводят посев на тиогликолевую среду. Хорошо растут на бульоне, образуя сначала равномерное помутнение, а затем рыхлый хлопьевидный осадок. Дают весьма характерный рост на желатине: через 24-28 ч (наряду с обильным ростом по уколу) можно наблюдать начальное разжижение среды, а на 4-5 сутки образуется направленная вниз воронка, наполненная жидкостью.

Дифференцировка. Применяют коагулазный тест на наличие свертывающего фактора, положительный для 95% изолятов (желательно исследовать наличие свободного и связанного с клетками фермента), а также определяют способность ферментировать маннит; исследуют способность синтезировать термостабильную ДНКазу и агглютинировать частицы латекса или сенсibilизированные эритроциты барана. Последний тест позволяет выявлять белок А и свертывающий фактор, либо оба продукта. Следует помнить о возможных ложноположительных результатах при наличии *S. epidermidis* и микрококков, а также ложноотрицательных, обычных для метициллин (оксациллин) резистентных штаммов *S. aureus* (MRSA). В редких случаях инфекций, вызванных *S. intermedius* (обычно после укусов собак), также выделяют коагулаза-положительные стафилококки, отличающиеся от *S. aureus* способностью синтезировать пироглютамил-β-нафтиламидаминопептидазу

Серологические исследования (например, идентификация АТ к тейхоевым кислотам) не имеют принципиального значения, а результаты часто носят противоречивый характер. До настоящего времени реагенты для идентификации TSST-1 и АТ к нему остаются недоступными.

Идентификация с помощью типовых бактериофагов. Метод типирования патогенных стафилококков бактериофагами достаточно широко применяют в клинической эпидемиологии. Для фаготипирования используют стандартный набор из 20 бактериофагов, разделенных на 4 группы: 1-я группа включает фаги 29, 52, 52А, 79, 80, 2-я — 3А, 3С, 55, 71, 3-я — 6, 42Е, 47, 53, 54, 75, 77, 83А, 84, 85, 4-я — 42D. С помощью соответствующих бактериофагов удается типировать 60-80% изолятов: установлены особые штаммы (например, фаготипов 80 и 77), наиболее часто выделяемые при вспышках.

При проведении лечения необходимо исследование чувствительности возбудителя к различным антибиотикам. Значительная часть изолятов продуцирует β-лактамазу, либо ее синтез индуцируют β-лактамы антибиотиков; исследование проводят методом Кирби-Бауэра или серийных разведений. Важное значение имеет типирование штаммов бактериофагами (22 фага стандартного набора) либо изучение плазмидного профиля *S. aureus*, обеспечивающего устойчивость к антибиотикам.

Большие (2×10^7 Д) плазмиды кодируют образование β-лактамаз и резистентность к эритромицину. Мелкие (3×10^6 Д) плазмиды кодируют резистентность к тетрациклину и хлорамфениколу (левомецетину)

В отличие от грамотрицательных бактерий, образование золотистым стафилококком β-лактамаз и хлорамфениколтрансфераз - индуцибельный процесс, т.е. они образуются только в присутствии антибиотиков.

S. epidermidis

Распространение. Наиболее часто колонизирует гладкую кожу и поверхность слизистых оболочек; микроорганизм характеризуется слабой вирулент-

ностью, подавляющее большинство инфекций носит нозокомиальный характер, их чаще наблюдают у пациентов с пониженной резистентностью. Типичными для эпидермального стафилококка считают поражения, обусловленные инфицированием различных устройств (протезов, катетеров, дренажей) либо гематогенным диссеминарованием возбудителя после хирургических вмешательств. Важнейшими факторами вирулентности считают гидрофобные свойства поверхности, облегчающие адгезию к субстратам, и поверхностный полисахаридный слизистый слой, предохраняющий бактерию от действия антибиотических и цитотоксических защитных механизмов. Подобно поражениям, вызываемым *S. aureus*, важное патогенетическое значение имеют компоненты клеточной стенки *S. epidermidis*, стимулирующие развитие воспалительных реакций и оказывающие многостороннее действие на ткани. Диагностика поражений включает выделение возбудителя по стандартной схеме.

Микроорганизм не проявляет гемолитическую активность и на кровяном агаре образует беловатые гладкие выпуклые колонии. Основным методом дифференцировки от *S. aureus* считают определение коагулазной активности.

Выделенный коагулазоотрицательный стафилококк следует дифференцировать от микрококков, чаще образующих желтые негемолизирующие колонии, и от прочих стафилококков, выделяемых из мочи (например, *S. saprophyticus*, *S. cohnii*, *S. lenthus*, *S. sciuri* и *S. xylosum*) по нечувствительности к новобиоцину, к которому *S. epidermidis* чувствителен.

S. saprophyticus

Колонизирует кожные покровы гениталий и слизистую оболочку уретры; укреплению и росту на эпителии мочевыводящих путей способствуют олигосахаридные поверхностные рецепторы, а также способность к выделению ферментативного комплекса, подавляющего рост прочих бактерий. Выделение проводят по стандартной схеме, идентификацию — по чувствительности к новобиоцину, бацитрацину (чувствителен) и некоторым особенностям физиологии и метаболизма (табл. 9).

Питательные среды для культивирования стафилококков

Для выделения культур стафилококков обычно используют 5%-ный кровяной агар (кровь овцы, кролика, крупного рогатого скота). При исследовании образцов, содержащих постороннюю микрофлору, целесообразно использовать селективные среды.

Таблица 9. Дифференциальные признаки стафилококков, имеющих основное медицинское значение

Признак	S. aureus		S. epidermidis	S. saprophyticus
	Anaerobius	Aureus		
Наличие каротиноидного сегмента	–	±	–	+
Способность к росту в анаэробных условиях (тиогликолевая среда)	+	+	+	±
Рост на средах с 10% NaCl	+	+	± (слабо)	+
Рост при:				
15 °С	?	+	– (слабо)	+
45 °С	–	+	+	±
Образование кислоты при ферментации углеводов в аэробных условиях:				
ксилоза	–	–	–	–
арабиноза	–	–	–	–
раффиноза	–	–	–	–
сахароза	+	+	+	+
маннит	–	+	–	±
манноза	–	+	±	–
трегалоза	–	+	–	+
лактоза	–	+	±	±
галактоза	–	+	±	–
фруктоза	+	+	+	+
ксилит	–	–	–	±
Восстановление нитратов	–	+	+	–
Щелочная фосфатаза	+	+	+	–
Гиалуронидаза	+	+	+	?
Уреаза	?	±	+	+
Коагулаза (на сыворотке кролика)	+	+	–	–
Фибринолизин	?	±	±	?
Гемолитическая активность	+	+	– (слабо)	–
ДНКаза	+	+	– (слабо)	–
Чувствительность к новобицину (МИК >1,6 мкг/мл)	+	+	+	–

С целью дифференциации патогенных стафилококков от сапрофитных, а также от микрококков, используют среды, позволяющие одновременно опре-

делить один из признаков, характеризующих патогенные стафилококки. Приводим рецепты некоторых питательных сред.

Молочно-солевой агар

В 100 мл МПБ растворяют 6,5 г хлорида натрия, 20 г агар-агара. Устанавливают рН 7,4, стерилизуют при 121°C 20 минут. Перед использованием агар расплавляют, охлаждают до 45°C, добавляют 10% стерильного обезжиренного молока и разливают по чашкам Петри. На этой среде определяют пигментообразование и способность к росту при наличии 6,5% хлорида натрия.

Лактозо-солевой бульон с фенолротом

В 1000 мл дистиллированной воды растворяют 10 г триптона, 5 г мясного экстракта, 1 г дрожжевого экстракта, 5 г хлористого лития, 20 г агара. Устанавливают рН 6,8, разливают по пробиркам и стерилизуют при 121°C 15 минут. При росте коагулазоположительных стафилококков среда желтеет (тест на коагулазу положительный).

Теллуригит-полимиксин-желточный агар Крисли

В 1000 мл дистиллированной воды растворяют 10 г триптона, 5 г дрожжевого экстракта, 5 г маннита, 20 г хлорида натрия, 2 г хлористого лития, 18 г агара. Устанавливают рН 7,3, стерилизуют 15 минут при 121°C. Перед использованием в среду добавляют 100 мл 30%-ной желточной эмульсии (на физиологическом растворе), 0,4 мл стерилизованного фильтрацией 1%-ного водного раствора полимиксина М, 10 мл стерилизованного автоклавированием (121°C 15 мин) 1%-ного водного раствора теллурита натрия.

Среда Джиолиотта и Кантони

В 1000 мл дистиллированной воды растворяют 10 г триптона, 5 г мясного экстракта, 5 г дрожжевого экстракта, 5 г хлористого лития, 20 г маннита, 5 г хлористого натрия, 1,2 г глицина, 3 г пирувата натрия. Устанавливают рН 6,9, стерилизуют при 115°C 20 мин. Перед употреблением к среде добавляют 0,1 мл 1%-ного водного раствора теллурита натрия, стерилизованного фильтрацией. При росте коагулазоположительных стафилококков наблюдается почернение среды или черный осадок.

Среда Бэрда-Паркера

К 90 мл основной среды с температурой 45°C добавляют 6,3 мл глицинового раствора, 1 мл раствора теллурита натрия, 5 мл эмульсии желтка, перемешивают и разливают в чашки Петри. Среда пригодна к использованию в течение 28 дней (хранение при 4°C). Перед посевом на поверхность среды наносят 0,5 мл 20%-ного водного раствора пирувата натрия, стерилизованного фильтрацией; распределяют по поверхности, подсушивают. Колонии коагула-

зоположительных стафилококков черные, блестящие, с узкой серо-белой полосой и окружены прозрачной зоной.

Желточная эмульсия. Свежее куриное яйцо выдерживают в 0,001%-ном растворе HgCl_2 . Соблюдая требования асептики, отделяют желток и эмульгируют его в 200 мл физиологического раствора.

Глициновый раствор. Глицин — 20 г, дистиллированная вода — 100 мл. Стерилизуют при 120°C 15 минут.

Раствор теллурита натрия. Теллурит натрия — 1 г, дистиллированная вода — 100 мл. Стерилизуют фильтрацией.

Желточно-солевой агар Чистовича

В расплавленный МПА с 10% хлорида натрия (рН 7,2), охлажденный до температуры 60°C, добавляют желточную эмульсию. После тщательного перемешивания питательную среду разливают в чашки Петри.

Среда Чаплина-Бернса

К 100 мл МПА добавляют 3,3 мл 0,1%-ного водного раствора кристаллического фиолетового и 5 г лактозы. Устанавливают рН 6,8. Стерилизуют автоклавированием (110°C 30 минут). Колонии патогенных стафилококков растут быстрее, чем непатогенных, и приобретают фиолетовый или оранжевый цвет.

Среда Чемпена (для выделения патогенных стафилококков)

Вариант 1: пептон — 1%, D-маннит — 1%, натрия хлорид — 7,5%, дрожжевой экстракт — 0,25%, двузамещенный фосфорнокислый калий — 0,5%, агар-агар — 1,5%. Среду стерилизуют 90 минут при 110°C, устанавливают рН 7,0 и добавляют 10% стерильного обезжиренного молока (молоко способствует лучшему образованию пигмента).

Вариант 2: пептон — 1%, дрожжевой экстракт — 0,25%, желатин — 3%, лактоза — 0,2%, D-маннит — 1%, натрия хлорид — 7,5%, двузамещенный фосфорнокислый калий — 0,5%, агар-агар — 1,5%. Стерилизуют 90 минут при 110°C, устанавливают рН 7,0.

Микроорганизмы рода Streptococcus

Микроорганизмы указанного рода, по данным определителя бактерий Берджи, обладают не ясным до конца систематическим положением. В частности, в данный род в настоящее время объединены энтерококки, молочнокислые стрептококки, стрептококки ротовой полости, пиогенные и анаэробные стрептококки. Однако в предлагаемом учебном пособии мы будем придерживаться традиционной систематики указанной группы кокков.

Стрептококки впервые обнаружены в тканях человека при рожистом воспалении и раневых инфекциях (Бильрот, 1874), септицемиях и гнойных поражениях (Пастер, 1879, Огстон, 1881); в чистой культуре их выделили Феяйзен (1883) и Розенбах (1884). Род образуют сферические или овоидные микроор-

ганизмы, размером 0,5-2,0 мкм, в мазках располагаются парами или короткими цепочками (особенно при выращивании на жидких средах) под различными воздействиями могут приобретать вытянутую или ланцетовидную форму, напоминая коккобациллы. Неподвижны, спор не образуют; некоторые виды имеют капсулу. Хемоорганотрофы, метаболизм бродильный, виды, играющие роль в патологическом процессе, ферментируют глюкозу с образованием молочной кислоты. Каталазоотрицательны; большинство видов проявляет гемолитическую активность. Факультативные анаэробы; предпочтительно содержание 5% CO₂; некоторые – микроаэрофилы, предпочитают анаэробные условия. Растут в интервале 25-45 °С, температурный оптимум роста 37°С. Паразиты млекопитающих; типовой вид – *S.pyogenes*. По предложению Ребекки Лэнсфилд (1933) стрептококки классифицируют по наличию специфических углеводов в клеточной стенке, выделяют 17 серогрупп, обозначаемых заглавными латинскими буквами (по специфичности белковых Аг М, Р, и Т стрептококки внутри групп разделяют на серовары) Также используют классификацию Брауна (1919), основанную на особенностях роста на агаре с кровью барана. Соответственно выделяют α- (дают частичный гемолиз и позеленение среды), β- (полностью гемолизирующие) и γ- (дающие визуально невидимый гемолиз) стрептококки, основными возбудителями болезней человека являются β-гемолитические виды, большая часть которых относится к серогруппе А.

Стрептококки группы А.

Большинство изолятов принадлежит к виду *S. pyogenes*, оба термина рассматривают как синонимы. Микроорганизмы известны с глубокой древности, но своего пика заболеваемости достигла в XIX веке. На этот период приходятся известные эпидемии скарлатины, часто осложнявшейся абсцессами паратонзиллярных пространств, клетчатки подъязычного, поднижнечелюстного пространств, многочисленные случаи фарингитов, нередко заканчивавшихся пневмониями, ревматизмом и острым гломерулонефритом. Также широко распространились инфекции кожи и мягких тканей — от стрептококкового импетиго до рожи, часто заканчивавшейся фатально. Последняя была неизбежным спутником войн и, по словам американского историка Д. Макферсона, «косила северян и южан» во время Гражданской войны. Не менее драматична история послеродового сепсиса, печально известной родильной горячки, жертвой которой стали сотни тысяч матерей, а также пионер борьбы с этим недугом — Земмельвайс, жестоко поплатившийся за свои воззрения. Следует отметить, что стрептококковые поражения дают подъем заболеваемости и в настоящее время даже во вполне благополучных странах [например, эпидемическая вспышка в Солт-ЛейкСити (штат Юта, США)] в 1985 г. Зарегистрированы относительно новые формы поражений, например стрептококковый токсический синдром, напоминающий аналогичное поражение, вызываемое стафилококками.

Распространение

Стрептококки группы А — убиквитарные (встречающиеся повсеместно) микроорганизмы, часто колонизирующие кожные покровы и слизистые оболочки, в частности, в холодный сезон частота носительства в носоглотке у школьников может достигать 25%. Резервуар — больной или носитель, основные пути передачи — контактный (с заносом в рот грязными руками) и воздушно-капельный, а также через инфицированные пищевые продукты, хранящиеся при комнатной температуре (например, молоко).

Патогенез поражений

Сложен, многие его звенья изучены плохо. Первым этапом инфекционного процесса является адгезия микроорганизма к эпителию слизистых оболочек; эффективность адгезии снижает вероятность элиминации с секретом и обеспечивает возможность быстрой колонизации. Основным адгезином является липотейхоевая кислота, покрывающая поверхностные фимбрии.

Фимбриальный белок (или белок М) — основной фактор вирулентности и типоспецифический Ag; АТ к нему обеспечивают длительную невосприимчивость к повторным заражениям, однако выделяют более 80 серотипов белка М, что значительно снижает эффективность гуморальных защитных реакций. Белок М препятствует реализации фагоцитарных реакций; связывает фибриноген, фибрин и продукты его деградации; адсорбирует их на своей поверхности, маскируя рецепторы для компонентов комплемента и опсоинов. Белок М проявляет свойства суперантигена, вызывая поликлональную активацию лимфоцитов и образование АТ с низким аффинитетом; подобные свойства играют существенную роль в нарушении толерантности к собственным тканевым Ag и развитии аутоиммунопатологии.

Вторым по значимости фактором вирулентности является **капсула**, защищающая стрептококки от антимикробного потенциала фагоцитов и облегчающая адгезию к эпителию; поскольку капсула образована гиалуроновой кислотой, то она проявляет минимальную иммуногенную активность. Интерес представляет способность бактерий самостоятельно разрушать капсулу при инвазии в ткани за счет синтеза гиалуроновой кислоты. Тем не менее, микроорганизмы, выделенные во время ревматических атак, обладали выраженной капсулой. Роль гиалуронидазы в патогенезе поражений остается плохо изученной; с одной стороны, она участвует в разрушении соединительнотканной стромы, с другой — имеет сходство со многими аутоантигенами и, возможно, участвует в запуске аутоиммунных реакций.

Третьим фактором, подавляющим активность фагоцитов, является **C5a-пептидаза**. Фермент расщепляет и инактивирует C5a компонент комплемента, являющийся мощным хемоаттрактантом.

Перекрестные реакции. Несмотря на способность подавлять или снижать активность фагоцитов, стрептококки инициируют выраженную воспалитель-

ную реакцию, во многом обусловленную секрецией более 20 растворимых продуктов. Часть из них составляют ферменты (стрептолизины S и O, гиалуронидаза, ДНКазы, НАДазы и стрептокиназа), другую часть — эритрогенные токсины. Патогенез ревматических поражений, особенно кардитов, существенно отличается от наблюдаемых при большинстве инфекций, сопровождаемых бактериемиями. Основные повреждения вызывают иммунные механизмы, в частности, перекрестная реакция с миокардиоцитами и белком M возбудителя. Весьма сходны механизмы повреждения почек при острых гломерулонефритах, обусловленные депонированием иммунных комплексов (стрептококк — IgG) на базальной мембране, с одной стороны, они активируют комплементарный каскад, что стимулирует воспалительный ответ, с другой — за счет нарушения аутоотолерантности и антигенной мимикрии индуцируют клеточные цитотоксические реакции.

Стрептолизин O чувствителен к кислороду; проявляет иммуногенные свойства и вызывает гемолиз эритроцитов в глубине кровяного агара; стрептолизин S резистентен к O₂, не несет антигенной нагрузки и вызывает поверхностный гемолиз на кровяных средах. Оба фермента разрушают не только эритроциты, но и другие клетки, в частности, продуценты стрептолизина S способны уничтожать фагоциты, поглотившие их. Их роль в патогенезе поражений остается недостаточно изученной, но их активируют многие сывороточные агенты (например, фосфолипиды).

Эритрогенные (пирогенные) токсины весьма схожи с токсинами стафилококков, иммунологически разделяются на 3 типа (A, B и C); способность к образованию детерминирована инфекцией умеренным фагом. Проявляют пирогенную активность (за счет непосредственного действия на гипоталамус), а также ведут к появлению обусловленных иммунными механизмами высыпаний на коже. Интерес представляет тот факт, что с XVII до середины XX века среди возбудителей скарлатины доминировал серотип A, открытый супругами Дик, а начиная с 70-х гг., преобладают поражения, вызываемые стрептококками типов B и C. Тем не менее, бактерии-продуценты токсина A продолжают часто выявляться при поражениях мягких тканей и синдромах токсического шока. Эритрогенные токсины проявляют суперантигенные свойства, оказывая митогенное действие на T-клетки, а также стимулируют секрецию макрофагами ИЛ-1 и фактора некроза опухолей, являющихся медиаторами септического шока.

Кардиогепатический токсин продуцируют некоторые штаммы стрептококков группы A, токсин вызывает поражения миокарда и диафрагмы, а также образование гигантоклеточных гранулем в печени.

Среди прочих ферментов существенную роль в патогенезе поражений играют **стрептокиназа** (активирует плазминоген, что приводит к образованию плазмина и растворению фибриновых волокон) и **гиалуронидаза** (облегчает перемещение бактерий по соединительной ткани). Роль ДНКаз (**стрептодор-**

наза) и НАДаз неизвестна, но выявление АТ к стрептодорназе В используют в диагностике различных осложнений, вызванных стрептококками группы А. Медицинское применение нашла очищенная смесь стрептокиназы, стрептодорназы и других протеолитических ферментов стрептококков (стрептокиназа-стрептодорназа), используемая для рассасывания тромбов, фибриновых и гнойных экссудатов.

Лабораторная диагностика

«Золотым стандартом» считают выделение возбудителя (рис. 6), т.к. прочие методы диагностики имеют различные ограничения.

Через 24 ч. На кровяном агаре стрептококки группы А образуют колонии 3 типов: крупные, блестящие, вязкие, напоминающие каплю воды (характерны для свежeweделенных вирулентных изолятов, имеющих капсулу; наиболее часто образует *S. pyogenes*); серые, матовые, зернистые, с неровным краем (характерны для свежeweделенных вирулентных изолятов, имеющих М-Аг), выпуклые прозрачные колонии диаметром около 0,1-0,3 мм (характерны для авирулентных лабораторных штаммов). Колонии окружены зоной полного гемолиза (ее размеры в 2-4 раза превышают диаметр колонии). На жидких средах дают придонный, иногда поднимающийся вверх рост. В мазках выявляют типичные грамположительные кокки, образующие короткие цепочки, также можно обнаружить полиморфные формы, напоминающие коринебактерии или лактобациллы, либо грамотрицательные формы (из старых культур или от лиц, получавших антибиотики), также следует помнить о способности стрептококков образовывать L-формы. Для дифференцировки выделенные микроорганизмы засевают на тиогликолевую среду, полужидкий агар, выросшие стрептококки отличаются типичной морфологией. Также можно произвести посев на кровяной агар и нанести на его поверхность диск, пропитанный пенициллином (10 ЕД), через 24 ч исследуют мазки из колоний (стрептококки принимают сферическую форму, а лактобациллы сохраняют вытянутую форму). Более 99% изолятов чувствительны к бацитрацину и гидролизуют пирролидонил-р-нафтиламид (ПИР-тест). Стрептококки группы А также можно легко выявить в мазках из зева, используя коммерческие наборы; групповой А-Аг экстрагируют химическими реагентами или ферментами и идентифицируют в реакциях латекс-агглютинации, коагглютинации или ИФА.

Для экспресс-диагностики ревматической лихорадки и гломерулонефрита можно определять АТ к стрептолизину О или стрептодорназе; серологические исследования также позволяют выявлять носителей. Следует помнить, что АТ к стрептолизину О не образуются при кожных инфекциях, вызываемых стрептококками группы А.

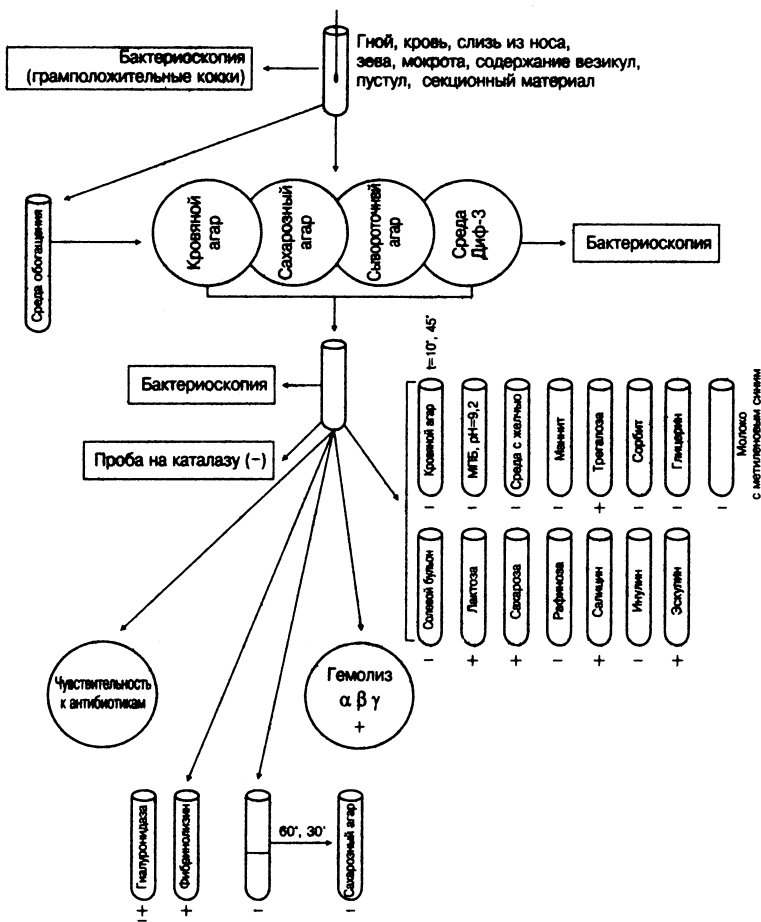


Рисунок 6. Принципиальная схема бактериологического выделения стрептококков группы А

Стрептококки группы В

Колонизируют носоглотку, ЖКТ и влагалище; значительная часть изолятов идентифицирована как *S. agalactiae*. Его основным резервуаром считают ЖКТ. Серологически стрептококки группы В разделяют на серовары Ia, Ib, Ic, II и III, бактерии сероваров Ia и III тропны к тканям ЦНС и дыхательных путей и наиболее часто вызывают менингиты у новорожденных. Вертикальный путь заражения — прохождение плода по родовым путям, инфицированным стрептококками; подобным образом инфицируются не менее 50% детей, со-

ставляющих группу риска. У детей, родившихся у матерей со значительной колонизацией родовых путей, чаще наблюдают раннее развитие менингита (в течение первых 5 суток), а у детей, инфицированных большой дозой, подобные поражения наблюдают позднее (от 6 суток до 3 месяцев). Факторами, предрасполагающими к ранним проявлениям, считают затяжные роды (более 24 ч), раннее вскрытие плодного пузыря, наличие эндометритов и амнионитов; на тяжесть заболевания влияет содержание специфических АТ, полученных от матери. Горизонтальную передачу возбудителя наблюдают значительно реже. Тем не менее стрептококки группы В также вызывают достаточно разнообразные поражения, большинство из которых обусловлено проникновением в кровоток. Особо необходимо отметить стрептококковые пневмонии, развивающиеся на фоне респираторных вирусных инфекций; «чистые» бактериальные поражения наблюдают редко, но как осложнения ОРВИ пневмонии отмечают так часто, что создается впечатление, что сами стрептококки группы В не способны вызывать поражения легких. В подавляющем большинстве эти инфекции обусловлены активацией микрофлоры в зеве и носоглотке, реже регистрируют заражение от больного вирусом в ассоциации с высококовирулентными стрептококками. Несмотря на то, что подобные пневмонии вызывают различные виды микроорганизмов, имеются данные, свидетельствующие о прямой связи между вирусами и стрептококками группы В; так, летальный синергизм с вирусом гриппа известен еще с 30-х гг. Массовое заражение респираторными вирусами увеличивает чувствительность легочной ткани к бактериальным суперинфекциям уже через несколько часов после проникновения первичного инфекционного агента.

Патогенез поражений, вызванных гематогенной диссеминацией возбудителя, во многом обусловлен дефицитом специфических АТ, С1q и С4 компонентов комплемента (низкие уровни последних коррелируют с низкой бактерицидной активностью в целом). Определенную роль играет полисахаридная капсула, снижающая эффективность фагоцитарных реакций. Последняя, в отличие от стрептококков группы А, проявляет иммуногенные свойства, и АТ к ее Аг (в достаточном количестве) способны оказывать протективное действие. Однако иммунизация беременных не обеспечивает образования достаточных титров АТ. Как патогенетический фактор следует рассматривать и нейраминидазу, модифицирующую мембрану клеток хозяина, что облегчает адгезию микроорганизмов, первичного звена бактериальной агрессии. Скорость заселения дыхательных путей стрептококками группы В указывает не столько на дефекты в функционировании систем защиты, сколько на повышение чувствительности легочной ткани.

Развитие экссудативного воспаления в зонах газообмена создает условия для размножения микроорганизмов, размножение вируса в эпителии тормозит метаболизм клеток, вследствие чего они экспрессируют дефектные рецепторы, нейраминидаза вирусов (например, гриппа) и стрептококков изменяет струк-

туру гликопротеиновых рецепторов клеток и повышает тем самым прочность связи с микробными лигандами.

Синергизм вирусно-бактериальных поражений носит двусторонний характер, известно, что некоторые штаммы бактерий, способные синтезировать протеазы, активируют вирулентность вируса гриппа за счет расщепления гемагглютинина и стимулируют множественные репродуктивные циклы возбудителя.

Поражения, вызванные стрептококками группы В, отмечают во всех возрастных категориях, но, безусловно, доминирует патология новорожденных. У 30% детей с ранними проявлениями наблюдают бактериемии (без конкретного очага первичного инфицирования), у 32-35% — пневмонии, а у остальных — менингиты, развивающиеся у 50% в течение 24 часов. Заболевания новорожденных протекают тяжело, смертность достигает 37%. У детей с поздними проявлениями наблюдают менингиты и бактериемии; 10-20% детей погибают, а у 50% выживших наблюдают остаточные нарушения. У рожениц стрептококки группы В вызывают послеродовые инфекции: эндометриты, поражения мочевыводящих путей и осложнения хирургических ран при кесаревом сечении. Также отмечают способность микроорганизмов вызывать поражения кожных покровов и мягких тканей, пневмонии, эндокардиты и менингиты у взрослых. Бактериемии также наблюдают у лиц старшего возраста, страдающих сахарным диабетом, заболеваниями периферических сосудов, печени и злокачественными новообразованиями.

Лабораторная диагностика. Принципы бактериологической идентификации аналогичны подходам к выделению стрептококков группы А (рис. 6).

Колонии, выросшие на кровяном агаре, через 24 ч прозрачные или мутноватые, выпуклые, диаметром 0,5-1,0 мм, окружены зоной гемолиза; 5-15% изолятов может не проявлять гемолитических свойств. При выделении атипичных форм прибегают к посеву на тиогликолевую среду, полужидкий агар, агар с глюкозой либо проводят пересев на кровяной агар и используют диски с пенициллином (аналогично манипуляциям с атипичными формами стрептококков группы А).

Стрептококки группы В обычно нечувствительны к бацитрацину, разлагают гиппурат и положительны в САМР-тесте. Дальнейшую идентификацию проводят серотипированием в реакции латекс-агглютинации или коагглютинации с коммерческими реагентами либо с помощью инкубации мазков с моноклональными АТ, мечеными флюоресцеинами. Микроорганизмы можно быстро идентифицировать в мазках отделяемого влагалища, используя коммерческие наборы, аналогичные применяемым для выявления стрептококков группы А.

S. pneumoniae (пневмококк)

Не содержит группового Аг и серологически неоднороден, по Аг капсульных полисахаридов выделяют 84 серовара, известны штаммы, колонизирующие организм человека и животных. Впервые *S. pneumoniae* выделил Пастер (1881) во время работы над антирабической вакциной; этиологическую роль в развитии пневмонии у человека доказали Френкель и Вайхельбаум (1884).

Распространение

Пневмококк — один из основных возбудителей бактериальных пневмоний, регистрируемых вне стационаров (2-4 случая на 1000 человек), ежегодно в мире наблюдают не менее 500 000 случаев пневмококковых пневмоний людей (реальная величина значительно больше). Наиболее подвержены инфекции дети и лица преклонного возраста. Резервуар инфекции — больные и носители (20-50% детей дошкольного возраста и 20-25% взрослых лиц), основной путь передачи — контактный, в период вспышек также воздушно-капельный. Пик заболеваемости приходится на холодное время года. В подавляющем большинстве случаев клинические формы инфекции развиваются при нарушениях резистентности организма.

Морфология и культуральные свойства

Овальные или ланцетовидные кокки диаметром около 1 мкм, в мазках из клинического материала располагаются парами, каждая из которых окружена толстой капсулой, на питательных средах могут располагаться цепочками и быть более округлыми. На простых средах образуют тонкую капсулу, ее развитие стимулирует внесение крови, сыворотки или асцитической жидкости. Неподвижны, спор не образуют; аэробы или факультативные анаэробы, при культивировании предпочтительны капнофильные условия (5-10% CO₂). Хорошо растут на кровяных или сывороточных средах, дополненных 0,1% глюкозой, температурный оптимум — 37 °С; оптимум рН 7,8. На жидких средах дают равномерное помутнение и небольшой хлопьевидный осадок, при длительном культивировании осадок увеличивается. На агаре образуют нежные, полупрозрачные, четко очерченные колонии диаметром около 1 мм, иногда они могут быть плоскими с центральным углублением, подобно прочим стрептококкам, колонии никогда не сливаются между собой. На кровяном агаре колонии окружает зона α-гемолиза в виде зеленоватой обесцвеченной зоны.

Патогенез поражений

Патогенез большинства пневмоний включает аспирацию слюны, содержащей *S. pneumoniae*, и проникновение бактерий в нижние отделы воздухоносных путей. Существенное значение имеет нарушение защитных дренирующих механизмов — кашлевого толчка и мукоцилиарного клиренса. У взрослых чаще наблюдают долевые поражения легких, у детей и лиц преклонного возраста

доминируют перибронхиальные или очаговые поражения. Основной фактор вирулентности — капсула (как типоспецифический Ag опосредует дифференцировку пневмококков на серовары), защищающая бактерии от микробоцидного потенциала фагоцитов и уводящая их от действия опсоинов. Некапсулированные штаммы практически авирулентны и встречаются редко. Большую часть пула противопневмококковых АТ составляют АТ к Ag капсулы. Важное значение имеет субстанция С – холинсодержащая тейхоевая кислота клеточной стенки, специфически взаимодействующая с С-реактивным белком. Следствием подобного реагирования являются активация комплементарного каскада и высвобождение медиаторов острой фазы воспаления, их аккумуляция в легочной ткани стимулирует миграцию полиморфноядерных фагоцитов. Формирование мощных воспалительных инфильтратов сопровождается нарушением гомеостаза легочной ткани и ее опеченением. Инфекции наиболее вирулентным сероваром 3 могут сопровождаться образованием полостей в паренхиме легких. Из первичного очага возбудитель может проникать в плевральную полость и перикард, либо диссеминировать и вызвать менингиты, эндокардиты и суставные поражения.

Клинические проявления

Классическая пневмококковая пневмония начинается внезапно, отмечают подъем температуры тела, продуктивный кашель и боли в груди. У слабых заболевание развивается медленно, с незначительной лихорадкой, нарушением сознания и признаками легочно-сердечной недостаточности. Стрептококковые менингиты регистрируют во всех возрастных группах, они характеризуются бурным началом с подъемом температуры тела, ригидностью шейных мышц, головной болью, тошнотой и рвотой. Поражения сосудов мозговых оболочек часто сопровождаются потерей сознания, среди детей и в преклонном возрасте летальность может достигать 80%.

Лабораторная диагностика

«Золотым стандартом» является выделение возбудителя (рис. 7). Следует помнить, что материал необходимо исследовать быстро, т. к. бактерии склонны к быстрому аутолизу, обусловленному активностью внутриклеточных ферментов. На пневмококковую инфекцию указывает наличие нейтрофилов и грамположительных lancetovидных диплококков (не менее 10 в поле зрения) в мазках клинического материала. В противном случае прибегают к выделению возбудителя.

1. Для дифференцировки от прочих стрептококков используется проба с оптохином (угнетает их рост); от зеленистых стрептококков возбудитель отличают способность ферментировать инулин, а также чувствительность к желчи (дезоксихолатная проба).

2. Изоляты, выделенные из полостей (например, при менингитах), следует серотипировать, используя коммерческие реагенты для реакции латекс-агглютинации или коаггуляции, выявляющих капсульные Аг.
3. При сомнительных результатах можно внутрибрюшинно заразить белых мышей материалом от больного, а затем провести бактериологические и серологические исследования перитонеального экссудата.

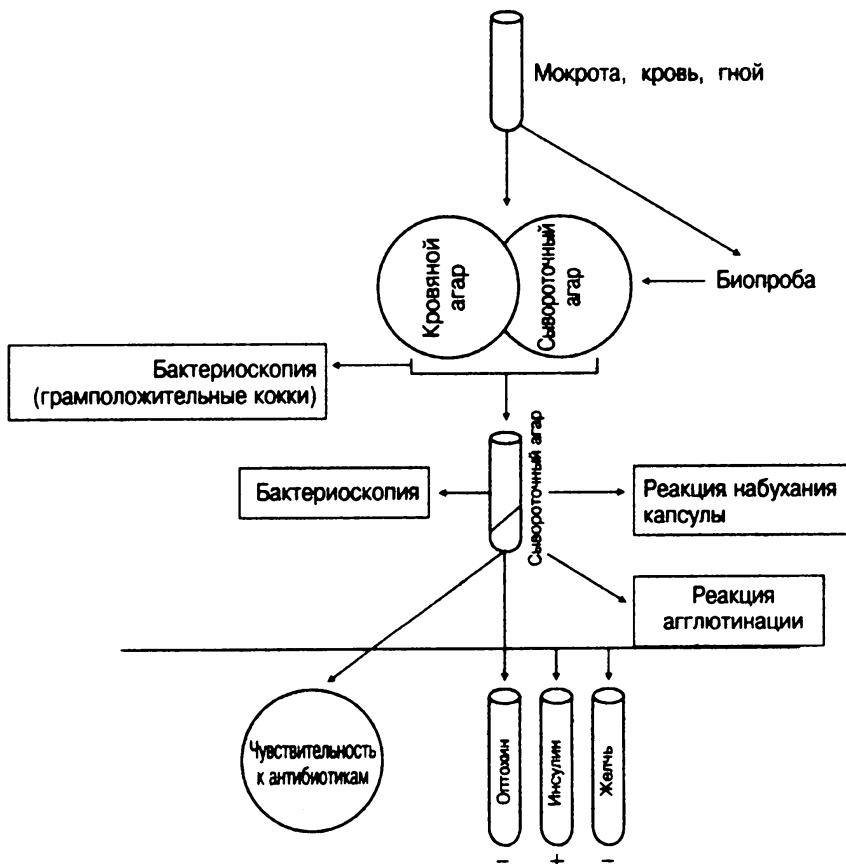


Рисунок 7. Принципиальная схема бактериологического выделения пневмококков

Негемолитические стрептококки

Составляют гетерогенную группу бактерий, дающих неполный (α) гемолиз (исключая некоторые изоляты *S. anginosus*). Поскольку они вызывают позеле-

нение кровяных сред, их также обозначают как зеленыящие стрептококки. Они не взаимодействуют с групповыми антисыворотками по Лэнсфилд (β -гемолитические штаммы *S. anginosus* реагируют с антисыворотками к группам А, С, F и G, а *S. bovis* — к группе D). Зеленыящие стрептококки входят в состав микробных ценозов ротовой полости (составляют 30-60% всей микрофлоры) и кишечника, но также способны вызывать инфекционные поражения при проникновении в обычно стерильные полости.

Патогенез

Микроорганизмы отличает низкая вирулентность, и вызываемые ими системные поражения можно в определенной степени рассматривать как оппортунистические.

а. Основную их часть составляют бактериальные эндокардиты, развивающиеся после проникновения бактерий в кровоток при травматизации слизистых оболочек (например, после пережевывания грубой пищи). Следует отметить, что эндокардиты, вызываемые зеленыящими стрептококками, носят злокачественный характер и сопровождаются поражением сердечных клапанов (около 50% подобной патологии, вызываемой бактериями). Способность вызывать эндокардиты обусловлена особенностями структуры гликанов (декстранов) клеточной стенки, облегчающих адгезию стрептококков к агрегатам тромбоцитов и фибрина на поврежденных клапанах. Поражения характеризуются лихорадкой, потерей массы тела, потливостью, артралгиями и проявлениями эмболий периферических сосудов: в ЦНС их отмечают в 30% случаев, в селезенке — в 40%.

б. Второй по значимости, но несравненно более частой патологией является кариозное поражение зубов, вызываемое зеленыящими стрептококками биогруппы *mutans*. Микроорганизмы содержат поверхностный белок, связывающий гликопротеины слюны на поверхности зубов, и (совместно с другими бактериями) образуют бактериальные бляшки на зубах. Они превращают сахарозу, поступающую с пищей, в молочную кислоту, вызывающую деминерализацию эмали зубов. Следует отметить, что образовывать молочную кислоту из сахарозы способны многие микроорганизмы, обитающие в ротовой полости, но лишь стрептококки биогруппы *mutans* и лактобациллы способны к образованию молочной кислоты при низких значениях pH, т. е. индуцировать развитие поражений.

Лабораторная диагностика

Помимо общих лабораторных исследований, включает выделение возбудителя по стандартной схеме. На наличие возбудителей указывает появление α -гемолизирующих или негемолизирующих колоний, *S. anginosus* образует мелкие ($>0,5$ мм) колонии, окруженные зоной α - или β -гемолиза. Дальнейшую дифференцировку проводят по отсутствию способности расти на жидких средах с 6,5% NaCl (в отличие от энтерококков), неспособности гидролизовать

эскулин в присутствии солей желчных кислот (могут быть положительны 10% изолятов), отсутствию чувствительности к оптохину. Следует с осторожностью применять коммерческие наборы для видовой идентификации, т.к таксономия зеленящих стрептококков нуждается в доработке и постоянно совершенствуется. *S. bovis* можно идентифицировать с помощью антисыворотки к Ag стрептококков группы D

Прочие стрептококки

Стрептококки групп С и G являются членами микробных сообществ верхних отделов дыхательных путей и ЖКТ многих млекопитающих, и спорадически колонизируют кожные покровы, зев, мочеполовую систему и кишечник. Систематика микроорганизмов нуждается в более детальной проработке. У человека наиболее часто выделяют *S. equisimilis*, *S. dysgalactiae*, *S. zooepidermicus*, *S. equi* и недифференцированные виды, образующие крупные колонии; к этой группе также относятся некоторые изоляты *S. anginosus*, не проявляющие микроаэрофильных или анаэробных свойств. Эти виды в большей степени патогенны для животных, но и у человека вызывают разнообразные поражения, хотя их регистрируют сравнительно редко. Поражения развиваются как при употреблении различных загрязненных животных продуктов, так и эндогенно, из имеющихся очагов. Патогенез поражений аналогичен прочим стрептококковым инфекциям; основные факторы патогенности — гиалуронидаза, фибринолизин, стрептокиназа, стрептолизин О и эритрогенные токсины. Дефектные (прихотливые) виды (*S. defectivus*, *S. adjacens*), требующие для роста внесения в среду пиридоксина (витамина В₆), вызывают редкие случаи эндокардитов, и их выделяют из гемокультур. Дифференцировку проводят на основании результатов реакций латекс-агглютинации и изучения биохимических особенностей.

Род *Enterococcus* образуют овальные бактерии размером 0,6-2,0×0,6-2,5 мкм, в мазках культур, выращенных на жидких средах, располагаются парами или короткими цепочками. Спор не образуют, некоторые виды ограниченно подвижны (имеют небольшие жгутики), капсул не имеют. Факультативные анаэробы; хемоорганотрофы (метаболизм ферментативный); расщепляют различные углеводы с образованием кислоты (преимущественно молочной) без газа. Пищевые потребности сложные, каталазоотрицательны, в редких случаях восстанавливают нитраты. Растут в интервале 10-45°C (оптимум 37°C). Типовой вид — *E. faecalis*. Широко распространены в природе, обитают в кишечнике различных позвоночных, вызывают нагноения ран, бактериемии и поражения мочевыводящей системы. Ранее микроорганизмы систематизировали как стрептококки группы D (некоторые также реагируют с антисыворотками к группе Q). У человека наиболее часто поражения вызывают *E. faecalis*, *E. faecium* и *E. durans*; их отличительные признаки приведены в таблице 10.

Таблица 10. Основные отличительные признаки энтерококков, патогенных для человека

Признак	<i>E. durans</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>
Подвижность	–	± (11–20% изолятов)	± (11–20% изолятов)
Рост при 45°C	+	+	+
Рост при 50°C	–	± (11–20% изолятов)	± (80–89% изолятов)
Рост на средах, содержащих:			
6,5% NaCl	+	+	+
0,04% теллурита	–	+	–
молоко с 0,1% метиленовым синим	+	+	?
Образование желтого пигмента	–	–	–
Гемолиз	α, β	Иногда α	Иногда β
Гидролиз гиппурата	±	±	± (80–89% изолятов)
Образование кислоты из:			
Рамнозы	–	±	–
Сахарозы	–	+	±
Арабинозы	–	–	+
Глицерина	–	+	+
Сорбита	–	± (80–89% изолятов)	–
Маннита	± (11–20% изолятов)	+	± (80–89% изолятов)
Серологическая группа по Лэнсфилд	D	D	D

Распространение

Энтерококки входят в состав микрофлоры ротовой полости, кишечника и мочеполовой системы; так, *E. faecium* выделяют из испражнений у 25% клинически здоровых лиц. Большинство инфекций, вызванных энтерококками, носит эндогенный характер и обусловлено инвазией микроорганизмов при избыточной колонизации; также показана возможность нозокомиальной передачи микроорганизмов, частота подобных инфекций возрастает на фоне высокой частоты применения цефалоспоринов широкого спектра действия.

Клинические проявления

Энтерококки часто вызывают поражения мочеполовой системы. Также они вызывают 10-20% всех бактериальных эндокардитов и 5% бактериемий. Эндокардиты характеризуются вялым подострым течением с постепенным развитием клапанной недостаточности. Бактериемии могут развиваться как следствие поражений мочевой системы или внутрибрюшинных абсцессов; в 40% случаев источник проникновения бактерий в кровотока остается неизвестным. Гемолизирующие энтерококки также способны вызывать пищевые отравления и дисбактериозы кишечника.

Лабораторная диагностика

Выделение возбудителя обычно не представляет трудностей (рис. 8), т.к. энтерококки хорошо растут на простых средах; на кровяном агаре могут давать зоны полного (редко) или неполного гемолиза. Через 24 ч энтерококки образуют сероватые колонии диаметром 0,4-1 мм; признаками, дифференцирующими их от зеленеющих стрептококков, являются: способность расти на средах, содержащих 6,5% NaCl, а также способность изменять окраску лакмусового молока или молока с этиленовым синим через 4-6 ч при 37°C.

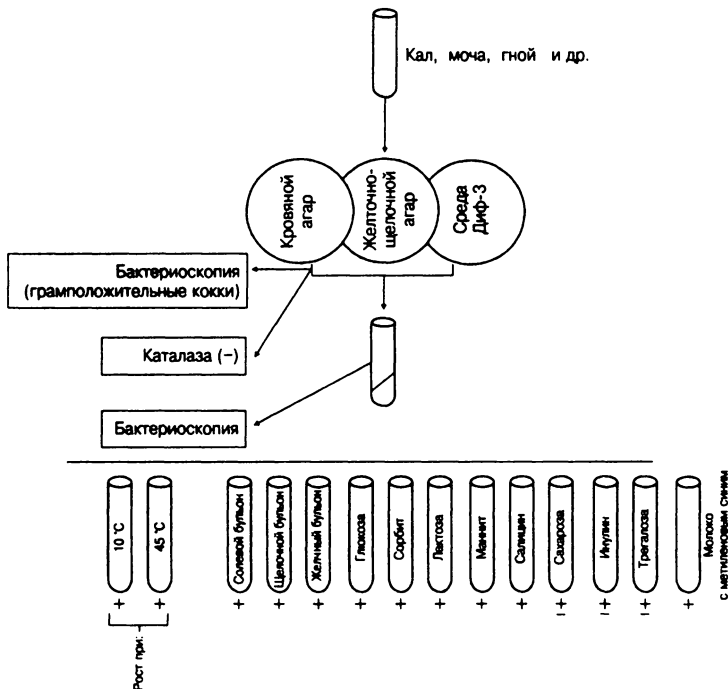


Рисунок 8. Принципиальная схема бактериологического выделения энтерококков

Питательные среды для культивирования стрептококков

Глюкозо-сывороточный бульон. К свежему стерильному МПБ (рН 7,4-7,6) добавляют 10% нормальной инактивированной сыворотки крови лошади и 1% глюкозы. Сыворотку и глюкозу предпочтительнее стерилизовать фильтрацией.

Глюкозо-кровяной агар. К расплавленному МПА с температурой около 45°С добавляют 1% глюкозы и 5—10% стерильной дефибрированной крови барана или кролика. Приготовленный агар разливают в чашки Петри.

Среда Эдварда (пропись фирмы Oxoid, 1982). В 1 л дистиллированной воды растворяют 10 г пептона, 10 г сухого мясного экстракта, 1 г эскулина, 5 г натрия хлорида, 0,0013 г кристаллвиолета, 0,33 г таллия сульфата и 15 г агара; устанавливают рН 7,4, Стерилизуют при 115° С 20 минут. К охлажденному до 45° С агару добавляют 5% стерильной дефибрированной крови овцы или крупного рогатого скота и разливают в чашки Петри. Среда обладает селективными свойствами. Используют для выделения *S. agalactiae*.

Кровяной агар с азидом натрия (пропись фирмы Oxoid, 1982). В 1 л дистиллированной воды растворяют 10 г триптозы, 3 г сухого мясного экстракта, 5 г натрия хлорида, 0,2 г азиды натрия, 12 г агара; устанавливают рН 7,2, автоклавируют при 121°С 15 минут. К расплавленному агару с температурой 45°С добавляют 5% стерильной крови овцы, перемешивают и разливают в чашки Петри. Среда предназначена для выделения патогенных стрептококков из материалов, контаминированных посторонней микрофлорой. Азид натрия подавляет рост многих грамотрицательных бактерий.

Селективная среда с антибиотиками (пропись фирмы Oxoid, 1982). В расплавленную и охлажденную агаровую среду добавляют 7% дефибрированной крови барана и антибиотики (на 1000 мл среды): налидиксовой кислоты - 7,5 мг, полимиксина В - 17000 ЕД, неомицина (или неомицина сульфата) - 2,12 мг. Каждый антибиотик предварительно растворяют в 20 мл стерильной дистиллированной воды, Готовую среду используют в течение 48 ч при хранении в холодильнике (4-8°С). На среде ингибируется рост стафилококков, синегнойной палочки, энтеробактерий, клебсиелл и предотвращается роение протей. Если после засева на поверхность среды положить полоски фильтровальной бумаги (диски), пропитанные бацитрацином (10 ЕД), то можно дифференцировать стрептококки серогруппы А (чувствительные к бацитрацину) от (3-гемолитических стрептококков других групп, устойчивых к бацитрацину (Streitner et al., 1962).

Молочная среда с полимиксином по Калине (для энтерококков). К 85 мл расплавленного МПА с температурой 45°С добавляют 1,25 мл 0,01%-ного водного раствора кристаллвиолета, 0,5 мл 10%-ного водного раствора 2,3,5-ТТХ, 15 мл стерильного обезжиренного молока, 20-40 ЕД/мл полимиксина М. Среда, разлитая в чашки Петри, пригодна для использования в течение 7—10 дней при условии хранения в холодильнике (4°С). Типичные колонии энтеро-

кокков имеют округлую форму, ровные края, блестящую поверхность, диаметр 1,5-2 мм, красноватую окраску с зоной протеолиза на светло-голубом фоне.

Желчно-кровяной агар Бельенского (для энтерококков). К 600 мл 3%-ного расплавленного МПА добавляют 400 мл нативной профильтрованной желчи. Стерилизуют при 115°C 30 минут. К охлажденному до 45°C агару добавляют 5% дефибринированной крови и разливают по чашкам Петри. На среде растут энтерококки, но не растут гноеродные и оральные стрептококки.

Энтерококковая дифференциально-диагностическая среда. К 1000 мл расплавленного МПА, имеющего температуру 45-50°C, перед употреблением добавляют 0,1 г ТТХ (2,3,5-трифенилтетразолийхлорид), 12,5 мл 0,01%-ного водного раствора кристаллвиолета, 0,1 кислоты, 20% обезжиренного молока, 1% глюкозы, 5% стерильной дефибринированной крови. Компоненты перемешивают и разливают по чашкам Петри. ТТХ и налидиксовую кислоту предварительно растворяют в небольшом количестве МПБ. Колонии *S. faecalis* вишнево-красного цвета, *S. faecium* — бесцветные или белого.

Щелочно-полимиксиновая среда Г. П. Калины (для энтерококков). Готовят отдельно три раствора.

Раствор 1: 23 мл МПБ, 1 г глюкозы, 0,5 г натрия хлорида, 2 г дрожжевого экстракта.

Раствор 2: 25 мл дистиллированной воды, 0,53 г Na_2CO_3 .

Раствор 3: 25 мл дистиллированной воды, 0,25 г двухосновного фосфата калия. Смеси стерилизуют раздельно при 112°C 12 минут.

После стерилизации все три раствора смешивают, устанавливают рН 10-10,2, добавляют воды до 100 мл, 1,6%-ного спиртового раствора бромтимолового синего, 200 ЕД/мл полимиксина М. Среду разливают по 5 мл в пробирки.

Среда Эндо (фуксин-сульфитный агар с полимиксином и кристаллвиолетом для энтерококков). К расплавленной среде Эндо добавляют 200 ЕД/мл полимиксина М и 1,25 мл 0,01%-ного водного раствора кристаллвиолета на 100 мл среды. Колонии энтерококков ярко-красного цвета.

Желчно-цитратная среда (для энтерококков). К 100 мл МПА добавляют 20 мл дрожжевого автолизата, 100 мл желчи, 40 г цитрата натрия. Смесь кипятят на водяной бане, добавляют 0,1 г трифенилтетразолия хлористого и 200 ЕД/мл полимиксина М. Колонии энтерококков розово-красного цвета.

Бактерии рода Listeria

Общая характеристика возбудителя

Листериоз – зооантропонозная болезнь животных и человека, характеризующаяся поражением нервной системы, септическими явлениями, абортами и маститами.

В отличие от таких заболеваний как сальмонеллезы, иерсиниозы и некоторые другие инфекционные болезни, листериоз назван не в честь своего первооткрывателя. Возможно, что это связано с тем, что пальма первенства была в руках нескольких исследователей. Пристальное изучение листериоза и его возбудителя началось после публикации в 1926 году E. Murray, R. Webb, M. Swann работы о вспышке новой инфекционной болезни морских свинок и кроликов в питомнике Кембриджского университета и сообщении J. Pirie в 1927 году (Ю. Африка) об инфекционной болезни степных грызунов – «Tiger river disease» (болезни реки Тигр). Однако, еще в 1891 году M. Naumet во Франции и в 1893 L. Henlie в Германии наблюдали грамположительные палочки в срезах тканей пациентов, погибших от болезни, которая ретроспективно была определена как листериозная инфекция. В 1892 году Lucent описал септическую болезнь кроликов, выделив бактериальную культуру, идентичную листериозной палочке. В 1911 году шведский ученый G. Hulphers выделил из гнойного узелка печени павшего кролика маленькую грамположительную палочку, похожую по описанию на листериозную. В 1917 году австралийский врач E. Atkinson сообщил о небольшой эпидемии менингита, вызванной грамположительной бациллой дифтерийного типа. Однако зачастую это все была описательная информация. Первая хорошо сохранившаяся лабораторная культура листерий выделена J. Dumont, L. Cotonì в 1918 году из спинномозговой жидкости солдата, больного менингитом. Она через 20 лет хранения в Пастеровском институте была идентифицирована J. Paterson. Каждый из исследователей самостоятельно давал обнаруженной бактерии родовое и видовое название. И только после работ E. Murray, R. Webb, M. Swann, J. Pirie, когда была установлена идентичность выделенной ими бактериальной культуры, было дано официально признанное название рода *Listerella* и вида *monocytogenes*. В 1940 году родовое название изменили на *Listeria*.

Установлено, что листериоз поражает людей, многие вид домашних и диких животных, а также птиц. Есть сообщения о выделении листерий у рыб, раков, лягушек, некоторых видов клещей, блох, вшей, личинок оводов (Бакулов, 1967).

Дифференциация листерий от микроорганизмов других родов

В таблице 11 перечислены свойства, используемые при дифференцировании бактерий рода *Listeria* от других грамположительных, не образующих спор, имеющих форму палочек бактерий.

Идентификация новых изолятов может быть осуществлена путем исследования морфологии клеток, морфологии колоний и гемолитических реакций на агаре (содержащем 5% (объем/объем) крови овец или лошадей), сине-зеленого цвета колоний, когда их рассматривают под микроскопом на триптозном агаре методом косого (бокового) освещения после 18-24 ч роста при 37°C, требований к кислороду, образования каталазы, гидролиза эскулина и гиппурата натрия, образования щелочной фосфатазы и образования кислоты из углеводов в

соответствующей среде. Серологическая идентификация может быть использована для определенной идентификации листерий.

Таблица 11. Свойства, по которым различают род *Listeria*

Таксон	Подвижность	Кислородные требования	Рост при 36°C	Катализа	Продуцирование H ₂ S	Кислота из глюкозы
<i>Brochothrix</i>	—	факультативные	—	+	—	+
<i>Erysipelotrix</i>	—	факультативные	+	—	+	+
<i>Listeria</i>	+	факультативные	+	+	—	+
<i>Lactobacillus</i>	—	факультативные	+	—	—	+
<i>Kurthia</i>	+	аэробные	+	+	—	—

Представителей рода *Listeria* чаще всего можно спутать с бактериями родов: *Brochothrix*, *Lactobacillus*, *Erysipelotrix*, *Kurthia*. Коккобацилярные формы рода *Listeria* можно смешать с кокковыми микроорганизмами. В этом случае дифференциальным тестом является реакция на каталазу. Листерии можно легко отличить от бактерий рода *Kurthia* по их различным кислородным требованиям, *Kurthia* - это строго аэробный род; по ферментации различных сахаров виды *Kurthia* в реакциях ферментации, либо образуют небольшое количество кислоты, либо вообще ее не образуют.

Виды *Listeria* можно отличить от бактерий рода *Erysipelotrix* по положительной реакции на каталазу, по образованию колоний с заметным сине-зеленым блеском на триптозном агаре (Дифко) при исследовании под микроскопом методом косого освещения; по подвижности; по более сильной сахаролитической активности; по гидролизу эскулина и гиппурату натрия. Бактерии этих родов отличаются по антигенному составу.

Виды листерий можно отличить от большинства лактобацилл по положительной реакции на каталазу. Существуют, однако, каталазоположительные лактобациллы и некоторые штаммы листерий, являющиеся каталазоотрицательными. Бактерии рода *Listeria* очень медленно растут или вообще не растут на среде MRS (de Mann. et. al. 1960), на этой среде лактобациллы растут очень хорошо. Исследования показали, что при комнатной температуре штаммы *Listeria* подвижные, тогда как большинство лактобацилл не двигается. При микроскопическом исследовании методом косого освещения на триптозном агаре лактобациллы не показывают сине-зеленого оттенка. Различие между двумя родами заключается также в ферментации углеводов.

Серологически бактерии родов *Listeria* и *Lactobacillus* отличаются друг от друга.

В некоторых отношениях представителей рода *Listeria* можно легко спутать с *Brochothrix*. Оба эти рода часто выделяют из расфасованного мяса и птицы, которые хранят при температурах рефрижераторов. Отличить два рода можно

по неспособности *Brochothrix thermosphacta* к росту при 37°C и по неспособности рода *Listeria* к росту на среде Cartner (1966). Колонии *Brochothrix thermosphacta*, выращенные на триптозном агаре, исследованные под микроскопом методом косого освещения, не выглядят сине-зелеными. Кроме того, *Brochothrix thermosphacta* не гидролизует гиппурат натрия, но образует кислоту из большого количества сахаров. Серологически два таксона отличаются друг от друга (Wilkinson, Vones 1975).

Внутривидовая дифференциация листерий.

Учитывая, что только два вида, *Listeria monocytogenes* и *Listeria ivanovii*, являются патогенными и представляют опасность для макроорганизма, мы считаем целесообразным привести характеристику каждого вида листерий для их идентификации. Как уже выше упоминалось, в нашей стране нет серологических диагностикумов для видовой типизации, и поэтому внутривидовую дифференциацию листерий приходится проводить по иным признакам.

Listeria monocytogenes

Этот вид является типовым для бактерий данного рода. Для микроорганизмов этого вида характерными являются следующая группа признаков. Это неспорообразующие, короткие палочки правильной формы диаметром 0,4-0,5 мкм и длиной 0,5-2 мкм, с закругленными концами. Иногда встречаются клетки с слегка изогнутыми концами. Расположение в мазках либо поодиночке, либо в коротких цепочках, возможно в виде частокола или же римской буквы V.

В мазках можно увидеть и групповое расположение, параллельное вдоль длинной оси. В мазках из инфицированного пат. материала или из жидкой среды встречаются листерии кокковой формы диаметром 0,4-0,5 мкм и длиной 0,4-0,6 мкм. Они могут быть ошибочно приняты за стрептококки. В более зрелых или необработанных культурах могут встречаться формы в виде волокон длиной до 6-20 мкм.

Окраска по Граму положительная. Но в старых культурах теряют способность к сохранению окраски по Граму. Некислотоустойчивы.

C. Smith, J. Metzger (1962) сообщили о наличии мукополисахаридной капсулы у листерий, однако другие исследователи не подтвердили этого факта. В частности, H. Seeliger (1968) в результате детальных исследований опроверг факт наличие капсулы у данного микроорганизма.

Листерия палочка во время культивирования при комнатной температуре всегда подвижна. При температуре +37°C жгутики как правило, образуются и листерии оказываются неподвижными.

Листерия культура данного вида является аэробной и факультативно анаэробной. Температурный диапазон роста от +1 до +4°C. Однако культура остается жизнеспособной и при более высоких температурах (до 70-71°C). Температурный оптимум 25-37°C. Листерии способны расти и размножаться в диапазон pH от 6 до 9, но сохраняют свою жизнеспособность при величине pH

5-11. Оптимальные условия роста при pH 7,0-7,4. В анаэробных условиях, на кровяном агаре при температуре 35-37°C и pH 7,2-7,4 суточный рост листерий проявляется в виде росинчатых колоний. В аэробных условиях, на питательном агаре, оптимальном температурном диапазоне, 24-48-часовые листериозные колонии имеют диаметр 0,5-1,5 мм, круглые, полупрозрачные в виде капли, выпуклые с ясно очерченной поверхностью и сплошной гранью. При обычном освещении колонии обладают серо-голубоватым цветом. Размер 3-7-дневных колоний достигает диаметра 3-5,5 мм, колонии с непрозрачным центром и неправильной формы. В полужидкой среде 0,25%-ного агара суточный рост идет вдоль укола. В МПБ рост идет медленно, но через 28-48 часов появляется нежное, опалесцирующее помутнение. Через 7 дней на дне пробирки образуется осадок, который при встряхивании образует поднимающуюся вверх косичку. Бактерии обладают гемолитической активностью. Слабая, едва уловимая гемолитическая активность может быть усилена использованием САМР-теста. Листериозная культура в большинстве случаев является каталазоположительной и оксидазоотрицательной, но необходимо учитывать, что если питательные среды содержат низкие концентрации мясного и дрожжевого экстракта, то возможна отрицательная каталазная реакция. Активность каталазы подавляется на средах, содержащих высокую (более 10%) концентрацию глюкозы.

Реакция с метил-ротом и Фогес-Проскауэра положительна.

Листерии не разжижают желатин, не гидролизуют казеин и молоко. Индол не продуцируют, на обычных питательных средах не образуют сероводород. Расщепление сахаров сопровождается образованием кислоты, но не газа.

Листерии могут расти в сложных средах, содержащих до 10% NaCl. В течение года остаются жизнеспособны при 16% содержании поваренной соли (pH-6,0), некоторые штаммы выживают даже 20% содержании NaCl.

Необходимо отметить, что хотя вышеперечисленные свойства листерий достаточно типичны, но возможны их изменения, связанные с определенными питательными средами или выделением новых штаммов.

Штаммы данного вида различаются по антигенному составу и включают следующие серовары: 1/2а, 1/2в, 1/2с, 3а, 3в, 3с, 4а, 4ав, 4с, 4d, 4е и серовар 7. Бактерии вида экспериментально патогенны для мышей и морских свинок. Проба Антона положительная. Этот вид широко распространен в природе. Его выделяют из сточных вод, почвы, силоса и из фекалий животных и здоровых людей. У человека и животных его выделяют при клинических признаках болезни. Вызывает менингоэнцефалит, септицемию, эндокардит, аборт, абсцессы и гнойные ранения местного характера.

Listeria innocua

(*innocua* – безопасный).

Морфология бактерий аналогична бактериям вида *Listeria monocytogenes*. Не гемолитичен на 5 или 10%-ной (объем/объем) крови овец, кроликов, лошадей или человека в жидких или твердых культуральных средах. САМР – отрицательный со *S. aureus*, *R. equi*. Большинство изученных штаммов образует кислоту из рамнозы. Все образуют кислоту из метил-D-маннзида. Кислоту не образуют из ксилодазы и D-маннитола. Все исследованные до сих пор штаммы имеют антигенный состав серогруппы 6 (серовары 6а и 6в) и серовара 4ав.

Этот штамм в опытах был непатогенен для мышей и морских свинок, если его вводят внутрибрюшинно в концентрации до 10^{10} клеток. Проба Антона отрицательная. Выделяют из почвы растений, фекалий человека и животных и из птичьего помета. Никогда не выделяют из явно патологического материала от человека и животных.

Listeria welshimeri

Назван в честь американского бактериолога Н.Д. Welshimer.

Морфология аналогична бактериям выше описанных видов.

На кровяном агаре гемолиза не обнаруживают, САМР-реакции со *S. aureus*, *R. equi*. – отрицательные. Кислоту образует из D-ксилозы и метил-D-маннзида, а также из L-рамнозы, но из L-рамнозы может и не образовывать. Типовой штамм из L-рамнозы кислоту не образует. Кислоту не образует из D-маннитола. Штаммы, которые в настоящее время относят к этому виду, принадлежат к серовару 6а или 6в. Антигенный состав типового штамма, такой же, как у серовара 6в. Серовары 6а и 6в встречаются так же у вида *Listeria innocua*, а некоторые штаммы *Listeria seeligeri* имеют антигенный состав серовара 6в.

Этот вид экспериментально не патогенен для мышей. Его выделяют из гниющей растительности и из почвы в США; вероятно, он широко распространен в природе.

Listeria seeligeri

Назван в честь Н. Seeliger, немецкого бактериолога.

Морфология бактерий такая же, как и у вида *Listeria monocytogenes*. Гемолитиз слабый. САМР-реакция положительная при использовании штаммов *S. aureus*, со штаммами *R. equi* – отрицательная. Бактерии кислоту образуют из D-ксилозы. Кислоту не образуют из D-маннитола и L-рамнозы. Большинство штаммов не образуют кислоту из метил-D-маннзида; типовой штамм в этом отношении отрицательный.

Штаммы, приписываемые в настоящее время к этому виду, имеют антигенный состав сероваров 1/2в, 4с, 4d (которые встречаются также у *Listeria*

monocytogenes) и бв (которые обнаруживают в некоторых штаммах *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*). Типовой штамм принадлежит к серовару 1/2в.

В опытах был непатогенен для мышей. Его выделяют из растений, почвы и фекалий животных в Европе; вероятно, широко распространен в природе.

Listeria ivanovii

Назван в честь Ивана Иванова – болгарского микробиолога.

Морфологическая особенность – отсутствие жгутиков. Штаммы вида неподвижны.

Наблюдается ярко выраженный гемолиз с двойными или тройными зонами, если листерию этого вида выращивают на агаре с кровью овец или лошадей (5% объем/объем). Положительная CAMP-реакция наблюдается при использовании R equi, а не *S. aureus*. Из D-маннитола, L-рамнозы или метил-D-маннизида кислоту не образует. Все исследованные штаммы принадлежат к серовару 5. Этот антигенный состав в штаммах других видов рода *Listeria* не обнаруживали.

Listeria ivanovii экспериментально патогенен для мышей, LD₅₀ для которых у бактерий этого вида колеблется между $1 \cdot 10^5$ и $3 \cdot 10^6$ колониеобразующих единиц на 1 мл. Патогенен для животных, особенно для суягных овец, листерию этого вида выделяли также из организма здорового животного, человека-носителя и из окружающей среды и очень редко из организма человека в клинических условиях.

Listeria grayi

Назван в честь М. Gray, американского бактериолога, известного своими работами по листериозу.

Прямые палочки размером 0,6-0,8 мкм × 0,7-2,5 мкм. Концы закругленные. Встречаются парами или в коротких цепочках; палочки иногда расположены под углом друг к другу или лежат параллельными группами вдоль длинной оси. Активный рост наблюдается при 20-25°C; неподвижны или двигаются очень медленно при 37°C, капсул и спор не образуют. Грамположительны. Не кислотоустойчив. Факультативный анаэроб. Хорошо растет на триптозном агаре (Дифко) или на кровяном агаре (Дифко) с добавлением 1% глюкозы (вес объем). Колонии небольшие (1-1,5 мм через 24 ч), круглые, гладкие, маслянистые, слегка выпуклые с неизрезанным краем.

При изучении на этих средах небольших колоний (0,2 мм) с помощью не прямых лучей света обнаруживают тот же самый сине-зеленый оттенок, что у бактерий вида *Listeria monocytogenes*; после более длительной инкубации колонии становятся оранжево-красными, особенно по краям. Гемолиз не вызывают. Температура оптимального роста 30-37°C. Температурные границы роста 1-45°C. Не выживают при 60° нагревании в течение 30 минут. Каталазоположителен, оксидазоотрицателен. Требуется органические факторы роста. Растут при pH 5-9, при pH 9,6 рост не наблюдается. Чувствителен к пеницил-

лину, стрептомицину, хлорамфениколу, эритромицину, новобиоцину, неомицину; резистентны к сульфаниламиду, полимиксину, к сульфату колостина и к налидиксовой кислоте. Не растет на среде Lardner (1966). Медленный рост может происходить на среде MPS (Mann et. al., 1960).

Ферментативный метаболизм глюкозы приводит к образованию молочной кислоты и некоторых других продуктов. Из эскулина, амигдалина, целлобиозы, декстрина, галактозы, глюкозы, глицерина, лактозы, фруктозы, мальтозы, маннита, маннозы, салицина, крахмала, трегалозы образуется кислота, а не газ. Кислота обычно не образуется из мелибиозы, рамнозы, сорбита, метил-D-глюкозида, адонита, арабинозы, дульцита, эритрита, гликогена, инозита, инулина, мелецилозы, раффинозы, сорбита, сахарозы и ксилозы. В лакмусовом молоке обнаруживается слабая кислота и незначительная редукция. Реакция с метиловым красным и Фогес-Проскауэра положительная.

Эскулин гидролизуют. Гиппурат натрия не гидролизуют. Гидролиз крахмала непостоянен. Твин-20 гидролизуют медленно (14 дней). Твин-80 не гидролизуют. Медленное образование дезоксирибонуклеазы, рибонуклеазы и фосфатазы. Ксантин, тирозин не расщепляют. Целлюлоза, желатин, казеин и молоко не гидролизуют. Индол не образуют. Мочевину не гидролизуют. Небольшие количества H_2S (обнаруженные с помощью реакции со свинцовой бумагой) образуются некоторыми штаммами. Нитраты в нитриты не восстанавливаются.

Серологически бактерии отличается от остальных видов рода *Listeria*. Антигенный состав идентичен *Listeria murray*. Не патогенны для мышей при внутрибрюшинной или внутримозговой инъекции, но клетки в концентрации $5 \cdot 10^8$ могут быть токсичны для мышей. Не патогенны для беременных кроликов после внутривенного введения. Не вызывают у кроликов или морских свинок конъюнктивит после закапывания в глаза. Выделяются из фекалий шиншилл. Естественная среда неизвестна.

Listeria murray

Назван в честь E. Murray – одного из первых исследователей бактерий рода *Listeria*.

Прямые палочки размером $0,6-0,8 \times 7-2,5$ мкм. Концы закругленные. Встречаются отдельными парами или короткими цепочками, палочки часто располагаются под углом друг к другу или параллельно вдоль длинной оси. Подвижны при культивировании $20-25^\circ C$, неподвижны или слабо подвижны при 37° . Капсулы и споры не образуют. Грамположительны. Неустойчивы к кислотам. Факультативные анаэробы. Хорошо растут на триптозном агаре (Дифко) или на кровяном агаре (Дифко) с добавлением 1%-ной (вес/объем) глюкозы. Колонии небольшие (1-1,5-мм через 24 ч.), круглые, гладкие, маслянистые, немного выпуклые с неизрезанными краями. В отраженном свете колонии имеют серый цвет с голубоватым оттенком; при дневном свете их голубой цвет более яркий, а с увеличением размера после дальнейшей инкубации у

них начинает появляться желтый оттенок. Когда с помощью рассеивающего света при микроскопировании изучали колонии на поверхности сред, обнаруживали, что небольшие колонии (0,2 мм) имеют тот же самый зелено-синий оттенок, вызванный, как и у вида *Listeria monocytogenes*; после 2-дневной инкубации у более крупных колоний обнаруживается оранжево-красный оттенок (Н. Welshimeri. et. al., 1971). При 22-25° инкубации на питательном агаре, содержащем глюкозу, у колоний появляется желтый пигмент. В отсутствие глюкозы пигмента не обнаруживают. Негемолитичны на кровяном агаре. Оптимальная температура роста 30-37°С. Температурные границы роста 1-45°С. Не выдерживают 30-минутного нагревания при 60°С. Каталазоположительны. Оксидазоотрицательны. Чувствительны к пенициллину, тетрациклину, хлорамфениколу, эритромицину, новобиоцину, неомицину; резистентны к сульфаниламиду, полимиксину В, к сульфату колистина и налидиксовой кислоте. Не растут на среде Lardner (1966).

Ферментативный метаболизм глюкозы приводит к образованию L⁺-молочной кислоты и некоторых других продуктов. Из эскулина, амигдалина, целлобиозы, декстрина, галактозы, глюкозы, глицерина, лактозы, фруктозы, мальтозы, маннита, маннозы, силицина, крахмала и трегалозы образуется кислота, а не газ. Некоторые штаммы образуют кислоту из мелибиозы, рамнозы и сорбита. Из метил-D-глюкозида образуется небольшое количество кислоты. Из адонита, арабинозы, дульцита, эритрита, гликогена, инозита, инулина, мелицитозы, раффинозы, сахарозы и ксилозы кислота обычно не образуется. Лакмусовое молоко показывает слабокислую реакцию и незначительную редукцию. Реакции с метиловым красным и Фогес – Проскауэра положительные.

Эскулин гидролизуют. Гиппурат натрия не гидролизуют. Гидролиз крахмала непостоянен.

Твин-20 гидролизуют медленно (14 дней). Твин-80 не гидролизуют. Медленно образуют дезоксирибонуклеазу, рибонуклеазу и фосфотазу. Ксантин, тирозин и хитин не расщепляют. Целлюлозу, желатин, казеин и молоко не гидролизуют. Индол не образуют. Мочевину не образуют. Некоторые штаммы образуют H₂S (обнаруживается с помощью реакции со свинцовой бумагой). Серологически отличаются от вида *Listeria monocytogenes*. Антигенный состав идентичен антигенному составу *Listeria grayi*.

После закапывания в глаза кроликов конъюнктивит не вызывают.

Не патогенны ни при внутривенном введении кроликам, ни при внутрибрюшинной инъекции 10⁸ клеток 20-граммовым мышам.

Выделяли из гниющих листьев злаковых (маис); естественной средой обитания, вероятно, являются почва и растения.

Лабораторная диагностика

Материалы для исследования – кровь, СМЖ, слизь из зева, пунктаты увеличенных лимфатических узлов, у новорожденных дополнительно – меконий, пупочная кровь; секционный материал — кусочки мозга, печени, селезен-

ки, лимфатические узлы. Посевы рекомендуется делать в первые 7-10 суток болезни; кровь (10мл) и СМЖ (2-5 мл) засевают на 100-150 мл глюкозного, глюкозо-печеночного или глюкозо-глицеринового бульона; инкубируют при температуре 37°C до 3 недель. При посеве на глюкозо-кровяной агар отбирают типичные колонии (прозрачные или роговидные), дающие гемолиз. Также можно проводить посев на триптозный агар и просматривать чашки под микроскопом при косом освещении — суточные колонии листерий имеют синезеленую окраску.

Общие положения

Листериоз – инфекционное заболевание из группы зооантропонозов, характеризующееся полиморфностью клинического проявления, в последнее время как пищевая инфекция людей с тенденцией к генерализации, септикопиемии, а так же поражению различных органов и систем жизнедеятельности у людей и животных.

Листериоз относится к числу широко распространенных в мире инфекций, что обусловлено выраженной адаптационной способностью возбудителя. Исследования трех последних десятилетий позволили сформулировать заключение о повсеместном распространении данной инфекции в России.

Материалы для исследования

В бактериологическую лабораторию направляют не менее 200 грамм исследуемого субстрата, упакованного в водонепроницаемую тару и желателно в первые 1-3 часа после отбора. Если время доставки образцов свыше указанного срока, то материал допускается направлять в замороженном виде в термосе со льдом.

Порядок исследования материала

Бактериологическое исследование проводят в соответствии с прилагаемой ниже схемой, а идентификацию выросших колоний - по тестам, указанным в таблице 12. Оптимальным решением является постановка на исследование не одной пробы исследуемого образца, а целой серии в 10-12 проб.

Оценка результатов бактериологического исследования.

При соответствии полученных результатов по тестированию выделенной культуры с вышеуказанными данными полученный бактериальный штамм признают как бактериальную культуру вида *Listeria monocytogenes*.

В случае если изучаемая бактериальная культура не типифицируется как бактерии вида *Listeria monocytogenes*, возможен вариант повторного использования бактериальной суспензии со средой накопления, хранящейся в холодильнике при +4°C.

Общие сроки бактериологического исследования материала в пределах 7 суток.

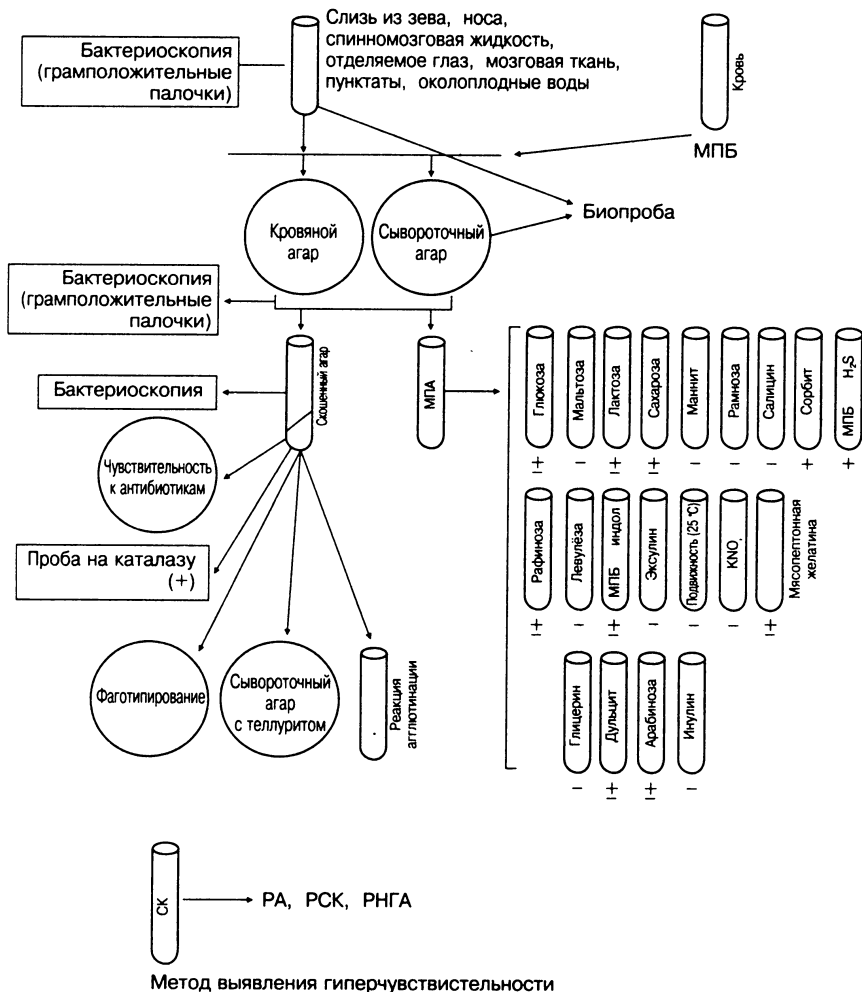


Рисунок 9. Принципиальная схема выделения *Listeria monocytogenes*

Серологические исследования. Обычно ставят РА с листериозным диагностиком.

Фаготипизация. Используют листериозные фаги L 2А и L4А (ВНИИВ-ВиМ).

Таблица 12. Характеристика биологических свойств листерий, штаммов первой серогруппы (шт. 766) и второй серогруппы (шт. 634)

	Шт. 766	Шт. 634
Окраска по Граму	+	+
Подвижность: 37°C		
22°C		
В-гемолиз	+	+
Каталаза	+	+
ферментация:		
Лактозы	+	+
Сахарозы	+	+
Глюкозы	+	+
Мальтозы	+	+
Маннита	-	-
Рамнозы	+	+
Дульцита	-	-
Арабинозы	-	-
Инозита	-	-
Сорбита	-	-
Салицина	+	+
Галактозы	-	-
Ксилозы	-	-
Раффинозы	-	-
Эскулина	+	+
Фруктозы	+	+
Конъюнктивная проба (проба Антона)	+	+

Биологическая проба. Лучше всего использовать белых мышей, иммуносупрессированных кортизоном (4-5 мг в/м за 4ч до заражения); после гибели животного (обычно на 2-6 сут.) производят посев материала из различных органов. Следует помнить, что листерии характерно «холодовое обогащение», и для избежания ошибок в диагностике часть патологического материала следует поместить в стерильные пробирки и хранить в течение 5-10 сут. при температуре 4-6°C, а затем подвергнуть повторному исследованию. Ставят конъюнктивный тест на морских свинках (проба Антона).

Рецепты и способы приготовления питательных сред для выделения листерий

1. **Среда с теллуридом калия**

(Бакулов и др., 1970).

К 1 л расплавленного МПА (рН 7,2-7,4) перед разливом в бактериологические чашки добавляют 10 мл 2%-го водно-глицеринового раствора теллурида калия. Добавление к указанной среде 5-10% сыворотки крови крупного рогатого скота улучшает рост листерий.

2. **Среда с теллуридом калия и флоримицином или полимиксином**

(Бакулов и др. 1970).

К 1 л расплавленного МПА (рН 7,2-7,4) перед разливом добавляют 10 мл 2%-го водно-глицеринового раствора теллурида калия и 0,3-0,5 мл раствора флоримицина или полимиксина (500 тыс. ед. препарата разводят в 10 мл физиологического раствора).

Цвет колонии на среде с теллуридом калия черный.

Предоставленная далее рецептура NN 3-11 предложена Подкомитетом по таксономии листерий и является унифицированной для всех лабораторий, работающих с данным микроорганизмом.

3. **Триптозно-фосфатный бульон (ТРВ).**

Триптоза	20,0 мг
Декстроза	2,0 г
Хлорид натрия	5,0 г
Динатрий фосфат	2,5 г
Дистиллированная вода	1000,0 мл

Добавьте ингредиенты к воде. Хорошо смешайте. Когда растворится, доведите рН до 7,3. Разлейте и стерилизуйте автоклавированием при 121°C в течение 15 минут.

4. Триптозно-фосфатный бульон с полимиксином В

(Бойсен-Мюллер).

Триптоза	20,0 мг
Декстроза	2,0 г
Хлорид натрия	5,0 г
Динатрий фосфат	2,5 г
Дистиллированная вода	1000,0 мл

Добавьте ингредиенты к воде. Размешайте. Когда растворится, доведите рН до 7,3. Стерилизуйте автоклавированием при 121°C в течение 15 минут. Охладите и добавьте 5,0 г стерильной тиамин-НСI и 3,12 мг полимиксина В к 1 л ТРВ. Перемешайте.

5. Триптозный агар.

Все ингредиенты среды «ТРВ». После растворения добавить бакто-агар «Дифко» – 15,0 г. Стерилизовать автоклавированием при +121°C в течение 15 минут. После охлаждения добавить 5,0 г стерильного тиамин-НСI и перемешать.

6. Сыворточный агар.

После контролирования рН добавьте агар к бульону. Стерилизуйте автоклавированием при +121°C в течение 15 минут. Охладите до +48°..+50°C и добавьте бычью сывортку. Осторожно перемешайте.

7. Кровяной агар.

Триптоза	10,0 г
Порошок «Лаб-Лемко» (Оксид)	3,0 г
Хлорид натрия	5,0 г
Бакто-агар (Дифко)	15,0 г
Дистиллированная вода	1000,0 мл

Суспендируйте ингредиенты в воде, кроме агара. Хорошо смешайте. Доведите рН до 7,3-7,4. Добавьте агар и стерилизуйте автоклавированием при 121°C в течение 15 минут. Охладите среду до +48°- +50°C и добавьте 50,0 мл стерильной дефибрированной овечьей (лошадиной) крови. Осторожно смешайте и разлейте в чашки Петри.

8. Бульон Левинтала с трипафлавином и налидиксиновой кислотой (по Раловичу).

Порошок «Лаб-Лемко»	10,0 г
Пептон	10,0 г
Хлорид натрия	5,0 г
Дистиллированная вода	1000,0 мл
Дефибрированная овечья кровь	50,0 мл

Поместите все ингредиенты в колбу и «проварите» на пару при 100°C в течение 1 часа. Отфильтруйте и доведите pH до 7,4. Стерилизуйте автоклавированием при +121°C в течение 15 минут. Добавьте 2,0 мл 1%-го триптофлавина и 20 мл 2%-го раствора налидиксиновой кислоты. Смешайте, разлейте в пробирки и закупорьте резиновыми пробками.

9. Среда с ацетатом таллия и налидиксовой кислотой (TN).

Питательный бульон	1000,0 мл
Глюкоза	2,0 г
Ацетат таллия	2,0 г
Налидиксовая кислота	40,0 мкг/мл

Налидиксовую кислоту 0,5 г в кристаллах растворяют в 0,5 мл 1%-го раствора NaOH при добавлении 4,5 мл дистиллированной воды и соответствующего объема основной среды перед 15-минутным автоклавированием при +121°C.

10. Среда с тиоцианатом и налидиксовой кислотой (PTN).

Питательный бульон	1000,0 мл
Тиоцианат калия	37,5 г
Налидиксовая кислота	40,0 мкг/мл

Питательный бульон, содержащий тиоцианат калия, стерилизуют в течение 15 минут при +121°C. Затем добавляют налидиксовую кислоту.

11. Агар с триптофлавином и налидиксовой кислотой.

Триптозный агар «Дифко»	41,0 г
Налидиксовая кислота	0,04 г
Дистиллированная вода	1000,0 мл

Налидиксовую кислоту 0,8 г растворяют в 10 мл NaOH. Затем, добавляя дистиллированную воду, доводят до 100,0 мл. 5 мл этого раствора, содержащего налидиксовую кислоту, добавляют к основной среде для получения конечной концентрации 40 мкг/мл. После 15-минутной стерилизации при +120°C среду охлаждают до 70°C. Акрифлавин нейтральный растворяют в стерильной дистиллированной воде для получения 0,5% (вес/объем) раствора. Два милли-

литра этого раствора добавляют к среде, содержащей триптозно-налидиксовую кислоту, чтобы получить конечную концентрацию в 10 мкг/мл. Среду тщательно перемешивают и разливают по чашкам.

12. Мак Брайда листериозный агар MLA

(no пропису Lovett, 1988).

Фенилэтаноловый агар «Дифко»	35,5 г/л
Глицинангидрид	19,0 г/л
Хлористый литий	0,5 г/л
Овечья кровь	5 %

13. Модифицированный листериозный агар Мак Брайда

(no пропису Lovett, 1988)

Среда MLA, но вместо овечьей крови добавляют 0,2% циклогексамида.

14. Селективный агар Мак Брайда

(no пропису Schidt et. al., 1988)

Казеин пептон с триптическими добавками	15,0 г/л
Пептон соевой муки	5,0 г/л
Хлористый натрий	5,0 г/л
Фенилэтиловый спирт	2,5 г/л
Глицин	10,0 г/л
Хлористый литий	0,5 г/л
Агар	15,0 г/л
Дистиллированная вода	1000,0 мл
рН – 7,3	

15. Обогащенная среда для выделения листерий

(no пропису Lee, McClain, 1986).

В питательную среду добавляют:

Протеаза пептона	5 г/л
Триптон	5 г/л
Порошок «Лаб-Лемко»	5 г/л
Экстракт дрожжей	5 г/л
Na ₂ HPO ₄	12 г/л

NaCl	20 г/л
KH ₂ PO ₄	2,35 г/л
Эскулин	1 г/л
Налидиксовая кислота	20 мкг/л
Акрифлавин	20 мкг/л

16. Агаровая среда для выделения листерий

(no propisu *Rodriquez et. al.*).

Пептон	3,0 г/л
Неопептон	3,0 г/л
Протеаза пептона	3,0 г/л
Хлористый натрий	5,0 г/л
Эскулин	1,0 г/л
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	12,0 г/л
Аммоний-железо сульфат	1,0 г/л
Акрифлавин	0,012 г/л
Налидиксовая кислота	0,050 г/л
Агар	15,0 г/л

17. Среда для выделения листерий (LPM)

Фенилэтаноловый агар «Дифко»	35,5 г/л
Глицин ангидрид	10,0 г/л
Хлористый литий	5,0 г/л
Моксалат	20 мкг/л

18. Селективная среда FDA

(no propisu *Schidt et. al., 1988*).

Триптический перевар (BBL)	30,0 г/л
Экстракт дрожжей	6,0 г/л
Акрифлавин-HCl	16,0 мг/л
Налидиксовая кислота	40,0 мг/л
Циклогексамид	50,0 мг/л

19. Листериязная селективная среда FDA/IDF-FIL

(no прописи Merck).

Казеиновый пептон	17,0 г/л
Пептон Sojmeal	3,0 г/л
D ⁺ глюкоза	2,5 г/л
Хлористый натрий	5,0 г/л
КН ₂ РО ₄	2,5 г/л
Дрожжевой экстракт	6,0 г/л
РН – 7,3	

20. Среда LEB

Триптикасоевый бульон	1000,0 мл
Экстракт дрожжей	6,0 г/л
К ₂ НРО ₄	2,5 г/л

Автоклавировать 15 минут при 121°C. Перед применением добавить (после стерилизации фильтрацией) в объеме 0,5% раствор

Акрифлавина-НСI	3,0 мл/л
Налидиксовой кислоты	8,0 мл/л
Раствор 1% циклогексамида в этаноле 40%	5,0 мл/л

21. Селективно-обогащенная среда для листерий

(no прописи Rodriquez et. al., 1985).

Пептон	5,0 г/л
Неопептон	5,0 г/л
Порошок «Лаб-Лемко»	10,0 г/л
Рамноза	2,0 г/л
Хлористый натрий	50,0 г/л
Na ₂ НРО ₄ · 2Н ₂ О	53,22 г/л
КН ₂ РО ₄	1,35 г/л
Налидиксовая кислота	0,05 г/л
Трипановый голубой	0,08 г/л

22. Селективная среда PAL CAM

(по прописи Merck).

Пептон	23,0 г/л
Крахмал	1,0 г/л
Хлористый натрий	5,0 г/л
Агар-агар	13,0 г/л
Эскулин	0,8 г/л
Аммоний железо (III) сульфат	0,5 г/л
D-маннит	10,0 г/л
Феноловый красный	0,08 г/л
Глюкоза	0,5 г/л
Хлористый литий	15,0 г/л
pH – 7,0	

23. Селективная среда для выделения листерий (PAL CAM)

(по прописи Netten et al., 1989).

Представляет собой Columbia-агар (кровяной агар) с содержанием:

Глюкозы	0,05%
Полимиксина В	0,001%
Акрифлавина	0,0005%
Хлорида лития	1,5%
Цефтазидима	0,002%
Эскулина	0,08%
Аммоний железо (III) сульфат	0,05%
Маннита	1,0%
Фенолового красного	0,008%

(колонии серо-зеленые с черным, с впалым центром и черным ободком на вишнево-красном фоне среды).

24. Селективная среда для листерий

(по прописи Lachica, 1990).

Сечечно-мозговой агар «Дифко», содержащий:

Хлористого лития	0,5%
Глицина	1,0%
Цефтазима	50,0 мкг/мл

(колонии с синеватым оттенком)

25. Селективная среда для листерий

(по прописи Leighton, 1979).

Триптозанофосфатный бульон с	
Ацетатом таллия	200,0 мкг/л
Налидиксовой кислоты	50,0 мкг/л

26. Селективная среда CNPA

(по прописи Jay, 1987).

Триптон	20,0 г
Хлористый натрий	10,0 г
Д-глюкоза	5,0 г
Дрожжевой экстракт	2,0 г
ТРИС	7,0 г
Агар	15,0 г
1,2-циклогексанедион	3,0 г
Налидиксовая кислота	45,0 мкг
Фенилэтиловый спирт	1,0 мл
Дистиллированная вода	1000,0 мл

pH – 8,2

27. Селективная среда

(по прописи Lucas et. al., 1990).

Агар с переваром бычьего сердца и мозга «Дифко»	52,0 г/л
Хлорид лития	15,0 г/л
Эскулин	0,75 г/л
Акрифлавин гидрохлорид	0,005 г/л
Дистиллированная вода	1000,0 мл

Смесь автоклавируют при +121°C 15 минут, охлаждают до 45°C и добавляют:

Стерильный цитрат железа аммония	70 мл 0,7%
Теллурид калия	10 мл 2,0%
Полимиксин В	10 мл 0,1%
Натриевая соль нефтазидимапентагидрата	10 мл 0,2%

На разлитую в чашки Петри среду проводят посевы, инкубируют при +37°C, затем чашки с колониями охлаждают до +4°C и добавляют 8 мл расплавленного и охлажденного до +45°C агара верхнего слоя, в состав которого входят:

Сухой бульон из перевара бычьего сердца и мозга «Дифко»	37,0 г/л
Агар	3,0 г/л
Хлористый натрий	8,0 г/л
Суспензия эритроцитов барана	50,0 мл/л

Через 14 часов инкубации при 30°C появляется зона гемолиза.

28. Листериязная селективная среда FEINDT

(по прописи Merck).

Триптоза	20,0 г/л
D-глюкоза	1,0 г/л
Хлористый натрий	5,0 г/л
Витамин В ₁	0,005 г/л
Трипафлавин	0,01 г/л
Налидиксовая кислота	0,04 г/л
Агар-агар	13,0 г/л

pH - 7,4

29. Селективная среда для выделения листерий Oxford

(по прописи Merck)

Пептон	23,0 г/л
Крахмал	1,0 г/л
Хлористый натрий	5,0 г/л
Агар-агар	13,0 г/л
Эскулин	1,0 г/л
Аммония железо (III) сульфат	0,5 г/л
Хлористый литий	15,0 г/л

pH – 7,0

Каждая из указанных питательных сред не лишена недостатков. Часть этих методов, способов и питательных сред дает отличные результаты в некоторых лабораториях, но не во всех. Это можно объяснить различным качеством применяемых химикатов.

Бактерии рода *Erysipelothrix*

Род *Erysipelothrix* — прямые или слегка изогнутые палочковидные бактерии (0,8-2,5×0,2-0,4 мкм), имеющие тенденцию образовывать длинные нити длиной до 60 и более мкм; последние могут утолщаться и содержать гранулы. Неподвижны, спор и капсул не образуют; хемоорганотрофы; грамположительны, но в старых культурах могут изменять отношение к окраске по Граму. Факультативные анаэробы; каталазоотрицательны; ферментативная активность слабая — ферментируют глюкозу и некоторые углеводы с образованием кислоты; на кровяных средах дают α-гемолиз. Широко распространены в природе, паразиты рыб и теплокровных.

Типовой вид — *Erysipelothrix rhusiopathiae*; Такахаши с соавт. (Takahashi et al., 1987) описали второй вид — *E. tonsillarum*, отличающийся от первого лишь степенью гомологии ДНК. Все штаммы данного вида принадлежат к одному серовару и маловирулентны для свиней.

Erysipelothrix rhusiopathiae открыли Пастер и Тюилье (1882), Леффлер (1886) как возбудитель рожи свиней и Розенбах (1884) как возбудитель ползучей эритемы Бейкера или эризипелоида. Идентичность обоих микроорганизмов установил Вилявин (1955).

Распространение

Erysipelothrix rhusiopathiae устойчив во внешней среде и распространен повсеместно; на разлагающихся органических субстратах может сохраняться месяцами, а в трупах — до года. При высушивании погибает в течение 3 не-

дель, на прямом солнечном свете — за 12 суток; кипячение убивает его в течение 3-5 минут. Неустойчив к действию дезинфектантов. Резервуар — грызуны, насекомоядные и домашние животные, включая птиц (куры, утки, индейки, голуби и др.). Эризипеллоид животных — природно-очаговая нетрансмиссивная инфекция; возбудитель может сапрофитировать на различных сортах мяса и рыбы, человек заражается контактным путем, а заболеваемость носит выраженный профессиональный или бытовой характер. В группу риска относят рыбаков, лесорубов, работников боен, ветеринаров и т.д.

Морфология и культуральные свойства

Грамположительная мелкая палочка, часто образующая нитевидные формы; в мазках обычно располагается парами, реже одиночно. Хорошо растет на простых слабощелочных средах; оптимальная среда для культивирования — сахарный бульон; через 10-15 ч отмечают помутнение, через 40-48 ч образуется белый осадок. Растет в температурных пределах 16-41°C, наиболее быстро при температуре 37°C, но наибольший выход клеток получают после культивирования при 33°C. Через 24-48 ч рост скудный, в виде мелких, трудно различимых S-колоний; его несколько усиливает добавление глюкозы и сыворотки. Переход в авирулентные R-формы наблюдают при длительном культивировании на искусственных средах. Нитраты не восстанавливает, эскулин не гидролизует; не ферментирует мальтозу, маннит, рамнозу, глицерин, салицин. Выделяют два варианта возбудителя — *suis* (свиной) и *murisepticum* (мышинный); первый также патогенен для голубей и не ферментирует сахарозу, второй непатогенен для голубей и ферментирует сахарозу; по прочим свойствам, в том числе по патогенности для белых мышей, оба штамма идентичны. На желатине через несколько суток культивирования образует тонкие нити, перпендикулярные линии укола, что придает культуре вид ершика для мытья посуды.

Антигенная структура.

По антигенной формуле бактерии данного вида разделяются на три группы: F, В, N. Общим видовым антигеном является антиген N. Антиген В обладает протективными свойствами. От больных свиней чаще всего выделяют штаммы сероварианта А.

Патогенез поражений изучен недостаточно; возбудитель проникает через кожу при ее травматизации; реже наблюдают проникновение через слизистую оболочку зева и ЖКТ. Возникновению заболевания способствуют мацерация и длительное охлаждение кожи. Инкубационный период не превышает 1-2 суток. В месте проникновения возбудителя (в фокусе микро- или макротравмы) возникают ограниченные эритематозные темно-красные или розовато-синюшные пятна диаметром от 1 до 5-10 см. Для очагов характерен эксцентрический рост; по мере роста центр поражений бледнеет, а периферия остается ярко окрашенной; эритема быстро растет (в среднем на 1 см/сут), более вы-

раженно продвигаясь в проксимальном направлении. Гистологически выявляют отек дермы, иногда и подкожной клетчатки, акантоз, периваскулярные и перигландулярные мононуклеарные инфильтраты. У больных возникают отеки и болезненность суставов; в процесс могут быть вовлечены регионарные лимфатические узлы. Для заболевания характерно быстрое течение (обычно не более 2 недель), но артралгии и артропатии могут продолжаться дольше и часто рецидивируют. Перенесенное заболевание не вызывает развития стойкого иммунитета, возможны случаи повторного заражения. При нарушениях иммунитета либо при заражении большой дозой возбудитель может лимфо- и гематогенно диссеминировать в различные органы, вызывая метастазирующий сепсис, пневмонии, менингоэнцефалиты, и приводить к гибели больного.

Лабораторная диагностика

Обычно клинический диагноз не вызывает затруднений; при необходимости для дифференциальной диагностики с рожистым воспалением проводят посев содержимого очагов (лучше кусочек измененной кожи). Посев производят на обычные питательные среды (рост в виде мелких колоний наблюдают через 18-24 ч при 37°C) с последующей микроскопией выросших колоний. Существенный признак — способность *Erysipelothrix rhusiopathiae* образовывать H₂S и вызывать почернение среды Олькеницкого, что нехарактерно для большинства грамположительных палочек. При генерализованных формах проводят бактериологическое исследование крови (дополнительно при секции — печени, селезенки, увеличенных лимфатических узлов) и ставят биологическую пробу с белыми мышами, иммуносупрессированными кортизоном (4-5 мг в/м за 4 ч до подкожного заражения). Мыши погибают через 3-5 суток, и из органов легко выделить возбудитель.

Питательные среды для культивирования *E. rhusiopathiae*

Для выделения культур лучше использовать питательные среды с 5—10% сывороткой крови и 0,2—0,5% глюкозы. При исследовании материала, контактированного посторонней микрофлорой, целесообразно пользоваться селективными средами.

Селективная среда ESB. В 1000 мл стерильного питательного бульона вносят 50 мл сыворотки крови лошади, 400 мг канамицина, 50 мг неомицина, 25 мг ванкомицина. Среда пригодна для использования в течение 12—14 дней, хранение при 4°C.

Селективная среда MBA. В 1000 мл питательного агара добавляют 0,4 г азида натрия. Стерилизуют при 121°C 15 минут и асептически вносят 50 мл сыворотки крови и 20 мл крови лошади.

Микроорганизмы рода Actinomyces

Длительное время актиномицеты классифицировали как грибы, однако изучение их морфологии и биологических свойств позволило отнести их к шиномицетам, т.е. бактериям. В отличие от грибов, актиномицеты не содержат в клеточной стенке хитина или целлюлозы, а сама она аналогична таковой у бактерий; не обладают способностью к фотосинтезу; образуемый ими мицелий достаточно примитивен. Они размножаются только бесполым путем. С бактериями актиномицеты объединяет отсутствие четко выраженного ядра, чувствительность к бактериофагам и антибиотикам (при резистентности к противогрибковым средствам), а также способность к хорошему росту в слабощелочной (но не кислой) среде.

Род включает 12 видов, большинство из которых патогенны для животных и человека. Дифференциация видов затруднена из-за вариабельности тест-реакций. Некоторые виды легче типировать методом гель-электрофореза белков, чем по культуральным свойствам. Для микроорганизмов данного рода характерными являются следующие признаки: тонкие, прямые или слегка изогнутые палочки размером 0,2-1,0×2,5 мкм; часто образуют нити длиной до 10-50 мкм. Особенность актиномицетов — способность образовывать хорошо развитый мицелий, у одних видов он длинный, редко ветвящийся, у других короткий и сильно ветвящийся; его нити не имеют перегородок (истинный мицелий). Палочковидные формы часто с утолщенными концами, в мазках располагаются одиночно, парами, V- или Y-образно, либо в виде палисада. Все морфологические формы способны к истинному ветвлению, особенно на тиогликолевой полужидкой среде. Окраску по Граму удерживают плохо; часто образуют зернистые либо четкообразные формы; конидий не образуют; кислотоустойчивы. Факультативные аэробы и анаэробы; для хорошего роста как в аэробных, так и анаэробных условиях нуждаются в повышенном содержании CO₂. Хемоорганотрофы; ферментируют углеводы с образованием кислоты без газа: продукты ферментации — уксусная, муравьиная, молочная и янтарная кислоты (но не пропионовая). Синтез каталазы и способность к восстановлению нитратов варьируют у разных видов; индол не образуют, некоторые дают α-гемолиз на средах с кровью. Некоторые виды формируют нитчатые микроколонии, напоминающие мицелий; на 7-14 сутки образуют видимые крошковатые S-колонии, иногда окрашенные в желтый или красный цвет. Оптимум температуры 35-37°C. Преимущественно обитают в ротовой полости и на поверхности слизистых оболочек у млекопитающих, в том числе и человека: некоторые виды — почвенные сапрофиты; типовой вид — *Actinomyces bovis*.

Поскольку актиномицеты входят в состав микрофлоры полости рта и ЖКТ, то их следует рассматривать как условно-патогенные микроорганизмы, их способность вызывать специфические поражения, соответственно, не выражена. Заболевания, вызываемые ими, обозначают термином «актиномикозы»: впервые их детально изучил Боллингер (1877) при поражениях крупного рога-

того скота; первое описание поражений у человека привел Израэль (1878). Актиномикоз у людей отмечают редко; подавляющее большинство случаев вызывает *A. israelii*, и лишь в редких случаях выделяют *A. naeslundii*, *A. odontolyticus*, *A. bovis* и *A. viscosus*. Внутривидовая дифференциальная диагностика актиномицетов основана на различиях в способности ферментировать углеводы и некоторых других биохимических тестах (табл. 13).

Таблица 13. Отличительные признаки видов *Actinomyces*

Признак	Вид				
	<i>A. viscosus</i>	<i>A. naeslundii</i>	<i>A. israelii</i>	<i>A. odontolyticus</i>	<i>A. bovis</i>
Рост в аэробных условиях	+	+	–	+	+
Серогруппа (ИФА)	B	E	D	A	F
Микроколонии:					
Гладкие	–	–	–	+	+
Паукообразные	+	+	+	–	–
Каталаза	+	–	–	–	–
Уреаза	+	+	–	–	–
Крахмал	–	–	–	–	+
Арабиноза	–	–	±	–	?
Инозит	+	+	+	–	?
Ксилоза	–	–	+	–	±
Маннит	–	–	+	–	–
Манноза	+	±	+	–	?

Распространение

Актиномицеты входят в состав нормальной анаэробной микрофлоры ротовой полости, ЖКТ и влагалища (реже). Обладают, особенно *Actinomyces israelii*, выраженной адгезивной активностью на слизистых оболочках и способностью к быстрой колонизации. Актиномикозы регистрируют практически во всех странах мира; больные составляют до 2,5-10% всех пациентов с хроническими гнойными процессами различной локализации; мужчины болеют почти в 2 раза чаще, чем женщины. Основные предрасполагающие факторы — травмы ротовой полости, периодонтиты, различные стоматологические (и другие медицинские) манипуляции; реже актиномикозы бывают осложнениями аппендэктомий, холецистэктомий, ранений кишечника или язв двенадцатиперстной кишки. Наибольшее число случаев регистрируют в осенне-зимний сезон, что связано с ростом частоты простудных заболеваний, обуславливающих благоприятный фон для развития актиномикозов.

Морфология и культуральные свойства возбудителя

Actinomyces склонен образовывать длинный ветвящийся мицелий (средние размеры нитей 3-10×0,6 мкм), со временем распадающийся на полиморфные (кокковидные, колбовидные и др.) элементы. На простых средах растет плохо, лучше — на белковых средах, дополненных сывороткой; образует прозрачные бесцветные пастообразные, обычно гладкие колонии, плотно срастающиеся со средой; воздушный мицелий скудный; пигментов не образует; на некоторых средах (например, на кровяном агаре) может формировать белые бугристые колонии, напоминающие коренные зубы.

Actinomyces odontolyticus на кровяном агаре образует красные колонии, окруженные зоной β-гемолиза. Все актиномицеты растут медленно, и посевы следует культивировать в течение 7-14 суток (особенно при подозрении на инфекцию *Actinomyces israelii*).

Патогенез поражений

Поражения могут носить эндогенный (например, воспалительные процессы или травмы ротовой полости) и экзогенный (при имплантации возбудителя в рану) характер. Основной предрасполагающий фактор — снижение иммунитета организма (особенно активности защитных факторов на слизистых оболочках), обусловленное сопутствующей патологией (туберкулез, сахарный диабет), беременностью и др.; особое значение имеет состав микробной флоры, способной значительно усугублять тяжесть поражения. Возбудитель может диссеминировать лимфогенно и гематогенно (очень редко); наиболее часто отмечают инфекции тканей с низким содержанием O₂. Вокруг внедрившегося в подслизистую оболочку возбудителя формируется специфическая гранулема (актиномикома), содержащая колонии возбудителя (друзы). Позднее очаг распадается с развитием гнойного и фиброзного процессов; его развитие и локализация определяют дальнейшее распространение процесса. Преимущественно наблюдают контактный путь распространения — по кратчайшей прямой (независимо от анатомических границ) по направлению к поверхности кожи с образованием дренирующихся абсцессов и эрозий.

Клинические проявления

Инкубационный период варьирует от нескольких суток до многих лет; клиническую картину актиномикозов определяют их локализация, период развития поражений и их характер (локальный, распространенный либо диссеминированный).

Наиболее частое поражение — **актиномикоз частей головы**, наблюдаемый у 55-60% всех больных актиномикозами и у 6-10% пациентов, страдающих воспалительными поражениями челюстей. Заболевание протекает хронически, но часто осложняется присоединением вторичных бактериальных ин-

фекций; возможны поражения кожи, мышц, лимфатических узлов, языка, слюнных желез и костных тканей.

10-20% всех поражений составляет **торакальный актиномикоз**: наиболее часто отмечают поражения легких, плевры, реже — мягких тканей грудной клетки.

Абдоминальный актиномикоз наблюдают у 25-50% пациентов; в большинстве случаев первичный очаг локализован в слепой кишке и червеобразном отростке. Прогрессирование процесса сопровождается образованием массивных инфильтратов, симулирующих различные поражения кишечника — злокачественные новообразования, туберкулезный процесс; характерны необычайно обильное образование спаек и развитие спаечной болезни.

Сравнительно редкие поражения — **актиномикоз мочеполовой системы**, актиномикоз **костей** (возникает как контактно, так и гематогенно), актиномикоз **ЦНС** (с развитием менингитов и менингоэнцефалитов) и генерализованный актиномикоз (типа метастазирующего сепсиса).

Лабораторная диагностика

Несмотря на отсутствие особых сложностей, адекватное распознавание актиномикоза остается непростой задачей, что во многом обусловлено неинформированностью клиницистов о его частоте. Наиболее распространенный метод лабораторной диагностики — обнаружение друз *Actinomyces* в экссудате или гнойном отделяемом из очагов поражения; последние, иначе обозначаемые как серные гранулы (тельца Боллингера) размером в среднем 0,3-2 мм. Они образованы агрегатами мицелия, имеющими вид округлых или овальных базофильных масс с эозинофильными структурами на поверхности. Иногда в мазках можно обнаружить четкообразные атипичные формы *Actinomyces israelii*, а *A. meyeri* представлен мелкими неветвящимися клетками. Веское подтверждение диагноза — выделение и идентификация возбудителя (рис. 10).

A. bovis

Возбудитель актиномикоза крупного рогатого скота, реже других видов животных. Естественная среда обитания неизвестна, предположительно, это слизистые оболочки ротовой полости или кишечник животных.

Морфология клетки и тинкториальные свойства типичны для рода. В препаратах из культур обнаруживаются грамположительные палочки, коккобактерии, палочки с утолщенными или разветвляющимися концами, могут присутствовать нити различной длины. В пораженных тканях формируются друзы — скопление клеток с булавовидным утолщением на концах и расходящихся радиально из центра друзы. Центральная часть окрашивается по Граму положительно, периферическая — отрицательно (Спесивцева, 1964).

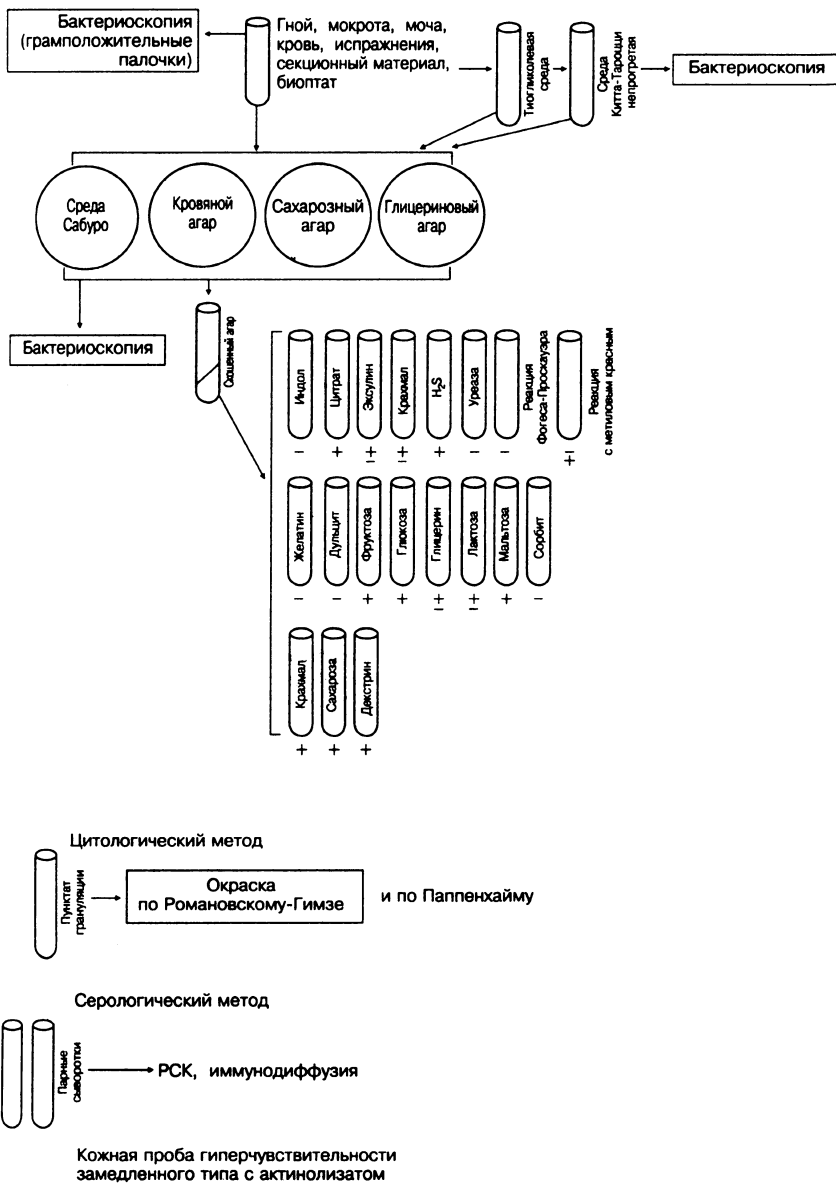


Рисунок 10. Принципиальная схема бактериологического выделения возбудителей актиномикозов

Факультативный анаэроб, но в аэробных условиях без добавления CO_2 на плотных средах не растет.

На плотных питательных средах образует нитевидные микроколонии за 24 ч при 36°C ; позднее — макроколонии диаметром около 2 мм, выпуклые, иногда с вдавленным центром, ровным или волнистым краем, непрозрачные, белые, серо-белые, кремовато-белые, шероховатые или гладкие, мягкие. Рост медленный, типичные колонии формируются к 14-15 дню культивирования. На кровяном агаре вокруг колоний может наблюдаться зона β -гемолиза. В жидких средах образует мучнистый осадок (Курасова, Костин, Малиновская, 1971).

Не образует каталазу, цитохромоксидазу, не редуцирует нитраты и нитриты, тест Фогес-Проскауэра отрицательный, с метиловым красным — положительный. Продуцирует H_2S , не гидролизует ксантин, тирозин, твин-20, 40, 60, 80, крахмал, лецитин, гиппурат, гуанин, желатин, казеин, часть штаммов гидролизует эскулин. Не расщепляет мясо, не разжижает свернутую сыворотку, в молоке образует кислоту, пептонизации нет. Образует ДНКазу (но не липазу и гиалуронидазу). Не деаминирует аргинин, аланин. Расщепляет сахарозу, часть штаммов — мелибиозу, инертен по отношению к раффинозе, рамнозе, салицину, рибозе, сорбиту, трегалозе, ксилозе.

В эксперименте при подкожном, внутрибрюшинном и внутривенном заражении культурой восприимчивы мыши.

A. viscosus

Вызывает некоторые формы актиномикоза у человека, его изолируют при актиномикозе свиней, собак, кошек. Естественная среда обитания — слизистые ротовой полости.

Морфология клетки соответствует общей родовой характеристике.

Факультативный анаэроб. Температурный оптимум $35-37^\circ\text{C}$. На плотных средах хорошо растет в обычных аэробных условиях и с повышенным содержанием CO_2 , в анаэробных условиях не растет без наличия в атмосфере CO_2 .

Микроколонии нитевидные. Макроколонии диаметром до 2 мм и более, плоские или возвышающиеся, с ровным или волнистым краем, с нитевидными отростками, прозрачные или непрозрачные, белые, серо-белые, кремово-белые, шероховатые или гладкие, сухие, мягкие или мукоидные. Гемолитической активностью не обладает.

Образует каталазу. Тесты на редукцию нитратов, цитохромоксидазу, гидролиз эскулина, крахмала, твин-40, 60, закисление и свертывание молока, деаминацию аргинина, образование кислоты из мелибиозы, рибозы, салицина, крахмала, трегалозы варьируют в зависимости от штамма. Положительные реакции с метиловым красным, раффинозой, сахарозой, на сероводород (TSI-агар).

Отрицательные реакции на редукцию нитритов, Фогес-Проскауэра, на гидролиз аденина, казеина, желатина, гуанина, гиппурата, гипоксантина, лецитина, твин-20, -80, тирозина, ксантина. Сыворотку не разжижает, казеин молока не пептонизирует, липазы, ДНКазы, гиалуронидазы не образует. Не деаминирует аланин. Не образует кислоты из меллицитозы, рамнозы, сорбита, сорбозы, ксилозы.

Известны два серовара (1,2), отличающиеся по физиологическим характеристикам. В пределах данного вида выделяют группу атипичных штаммов. Близки по своим свойствам группы актиномицетов, имеющих статус промежуточных между видами *A. naeslundii* и *A. viscosus*.

В эксперименте патогенен для мышей и хомяков.

A. hordeovultaris

Обнаруживают при висцеральных абсцессах, перитонитах, артритах у собак.

Морфология бактериальной клетки типична для родовой характеристики.

Факультативный анаэроб, растет на плотных средах в аэробных и анаэробных условиях при избытке CO₂ в атмосфере. Температурный оптимум 35-37°C. Рост стимулирует добавление в питательные среды 10—20% фетальной сыворотки крови.

Микроколонии нитевидные, макроколонии (14 дней культивирования) размером около 2 мм, приподнятые, с волнистым краем, с нитевидными отростками, непрозрачные, белые, серо-белые, кремово-белые, шероховатые, сухие или мягкие.

Обладает слабой каталазной активностью, гидролизует эскулин, образует кислоту из мелибиозы, раффинозы (слабо), трегалозы, ксилозы, не утилизирует рамнозу и рибозу.

A. pyogenes

Ранее вид описывали под названием *Corynebacterium pyogenes*. Обуславливает гнойные процессы у животных, в том числе маститы коров, перитониты свиней. Среда обитания — слизистые оболочки.

Морфология клеток типична для родовой характеристики.

Факультативный анаэроб. Температурный оптимум 35-37°C. На поверхности плотных питательных сред в анаэробных условиях растет при избытке CO₂ в атмосфере.

Нитевидные микроколонии не образует, макроколонии имеют диаметр около 2 мм и более, выпуклые, с ровными краями, непрозрачные, белые или серо-белые, гладкие, мягкие; вокруг колоний на кровяном агаре просматривается зона β-гемолиза.

Каталазу не образует, нитриты и нитраты не редуцирует, сероводород не образует, гидролизует казеин и желатин, не гидролизует аденин, эскулин, гуанин, гипоксантин, лецитин, твин-20, 60, 80, тирозин, ксантин. Часть штаммов гидролизует крахмал и твин-40. Молоко закисляет, свертывает, пептонизирует. липазу, гиалуронидазу не образует, синтезирует ДНКазу. Не деаминирует аланин, аргинин. Образует кислоту из рибозы и крахмала, часть штаммов расщепляет с образованием кислоты мелецитазу, сорбит, трегалозу, ксилозу. Микроорганизм инертен по отношению к мелибиозе, раффинозе, рамнозе, салицину, сахарозе.

Фильтраты культур токсичны при внутреннем введении для лабораторных животных.

A. naeslundii, *A. odontolyticus* и *A. meyeri* изолируют при различных патологических состояниях человека. О патогенности *A. howellii.*, *A. denticolens* данных не имеется.

A. suis

Вид с неопределенным положением. Изолируют при актиномикозе молочной железы свиней.

Бактериальные клетки представляют грамположительные палочки дифтероидной формы, иногда кокковидной, V-, Y- или T-формы, короткие или длинные нити.

Факультативный анаэроб. Температурный оптимум 35-37°C. На плотных питательных средах в аэробных условиях при избытке CO₂ растет хорошо. В анаэробных условиях удовлетворительно растет без CO₂ и при его избытке.

Колонии гладкие, непрозрачные, размером до 2 мм, выпуклые, центр может иметь углубление, края волнистые с отростками, цвет белый, серо-белый. Могут быть шероховатыми или гладкими, сухими или мягкими.

Каталазу не продуцирует, нитраты редуцирует, тест Фогес-Проскауэра отрицательный, с метиленовым красным — положительный, желатин не гидролизует. Образует кислоту из раффинозы, салицина, крахмала, сахарозы, трегалозы, часть штаммов не образует кислоту из рамнозы, сорбита, ксилозы.

A. humiferis

Обитатель почвы, имеет статус вида «*incertae sedis*». Патогенными свойствами не обладает.

Питательные среды для культивирования актиномицетов

Питательные среды и условия культивирования актиномицетов подбирают с учетом отношения конкретного вида к молекулярному кислороду, потребности в сыворотке крови и некоторых ростовых факторах.

Сердечно-мозговой бульон (пропись фирмы «Дифко», 1982). В 1000 мл дистиллированной воды растворяют мозгового отвара (сухого) — 12,5 г, сердечного отвара — 5,0 г, протеазопептона — 10,0 г, декстрозы — 2,0 г, натрия хлорида—5,0 г, двуназиевого фосфата -2,5 г. Устанавливают рН 7,4, стерилизуют при 121°C 15 минут.

Сердечно-мозговой агар. Готовят на основе сердечно-мозгового бульона, добавляя 2% агара.

Среды пригодны для культивирования *A. israelii* и *A. bovis* (Conant, 1950).

Czapek Dox-агар (пропись фирмы «Дифко», 1982). В 1000 мл дистиллированной воды растворяют натрия нитрата — 2,0 г, калия хлорида — 0,5 г, магния глицерофосфата — 0,5 г, железа сульфата — 0,35 г, калия сульфата — 0,35 г, сахарозы — 30 г, агара — 12 г. Стерилизуют при 115°C 20 минут, рН 6,8.

Данная синтетическая среда рекомендуется для культивирования актиномицетов (Waksman, 1931).

Мальтозный (глюкозный) агар Сабуро (Кашнин, 1973). В 1000 мл дистиллированной воды растворяют мальтозы (или глюкозы) — 4 г, пептона — 1 г, агар-агара — 1,8 г. Среду фильтруют, разливают по колбам, пробиркам и стерилизуют при 110°C 15 минут.

Для культивирования актиномицетов можно применять кровяной агар, среду Леффлера, тиогликолевые среды и среды, предназначенные для культивирования анаэробов, не содержащие специальных селективных добавок, например агар и бульон Шадлера (см. Питательные среды для культивирования клостридий).

Во всех случаях надо учитывать, что *A. ruogenes* лучше растет на средах с кровью (сывороткой крови) и утилизируемыми углеводами, *A. hordeovutaeis* — с 15-20% фетальной сывороткой. Для изоляции ряда актиномицетов применяют питательные среды с селективными добавками.

Среда Бейгтона и Колмана (1976). Состав питательной среды: сердечно-мозговой бульон — 3,7 г, дрожжевой экстракт (порошок) — 0,5 г, поливинилпироллидон — 1,0 г, цистеин солянокислый — 0,1 г, агар — 1,5 г, вода дистиллированная — 100 мл. Компоненты растворяют, стерилизуют при 115°C 30 минут, охлаждают до 45°C и вносят 5 мл стерильной сыворотки крови кролика. Затем к 100 мл готовой питательной среды добавляют 1 мл раствора NaF (25 мг/мл), 0,5 мл стерильного раствора колистина сульфата (1 мг/мл). Эти растворы предварительно стерилизуют. Среду используют для культивирования оральных актиномицетов.

Среда Корнмана и Лоше (1978). В качестве основы используют обогащенную плотную среду. К основной среде добавляют метронидазол—10 мг/мл и кадмия сульфат—20 мг/мл. Кадмия сульфат стерилизуют автоклавированием вместе с основной средой, метронидазол фильтруют и вносят в среду на последнем этапе. Среда рекомендована для культивирования *A. viscosus* и *A. naeslundii*.

Fritsche (1964) выделил культуру *A. israelii* из контаминированного материала на неселективных средах благодаря предварительной специальной обработке материала.

Материал предварительно суспендируют в транспортной среде. Например, среде Syed, Loesche (1972) следующего состава: раствор 1 — 0,6% раствор K_2HPO_4 , раствор 2 — 1,2% $NaCl$, 1,2% $(NH_4)_2SO_4$, 0,6% KH_2PO_4 , 0,25% $MgSO_4$. Готовая среда содержит 75 мл раствора 1, 75 мл раствора 2, а также 10 мл 1М раствора этилендиаминтетраацетата, 20 мл свежего 1%-ного раствора дитиотреитола, 5 мл 8%-ного раствора Na_2CO_3 , 1 мл 1 %-ного раствора резазурина, 814 мл дистиллированной воды. Среду стерилизуют фильтрацией (рН 8,0). Исследуемый материал суспендируют в транспортной среде. 1 мл исследуемой суспензии смешивают с 1 мл толуола и встряхивают 20 минут. Водную фазу отсасывают пипеткой, добавляют к ней 10 мл транспортной среды, центрифугируют и осадок засевают на неселективную питательную среду. Эффект обработки основан на ингибирующем действии толуола на грамотрицательные бактерии.

Микроорганизмы рода Pseudomonas

Представители рода *Pseudomonas* — прямые или слегка изогнутые палочки; средние размеры $0,5-1,0 \times 1,5-5,0$ мкм. Аэробы, метаболизм строго дыхательного типа (терминальный акцептор электронов — O_2), но некоторые виды используют нитраты в качестве альтернативных акцепторов электронов, что дает им возможность расти в анаэробных условиях. Многие виды аккумулируют поли- β -гидроксibuтират в качестве резервного источника углерода (в мазках выявляется в форме суданофильных включений). Хемоорганотрофы, некоторые виды — факультативные хемолитотрофы и используют H_2 и CO в качестве источников энергии. Подвижны (один или несколько жгутиков расположены полярно), кроме бактерий вида *Pseudomonas mallei*; спор не образуют. Большинство (если не все) видов не растут в кислой среде. Большинство окисляет глюкозу и другие углеводы (несахаролитические виды не способны к их окислению), а также каталазоположительны. Многие виды свободноживущие, либо считаются растительными и животными патогенами. Типовой вид — *Pseudomonas aeruginosa*. На основании гомологии РНК/ДНК изучаемые виды (их 27) *Pseudomonas* разделены на 5 гомологичных групп по структуре рибосомальной РНК и на несколько групп, имеющих гомологичную ДНК; соответственно предложено выделить из рода *Pseudomonas* некоторые микроорганизмы в роды *Burkholderia*, *Stenolrophomonas* и др. Вполне очевидно, что идентификация возбудителя инфекции до уровня вида может принципиально изменить характер эмпирической терапии, что обусловлено, в первую очередь, различиями в их природной чувствительности (устойчивости) к антибиотикам. Практическая необходимость видовой идентификации отдельных представителей семейства *Pseudomonadaceae* также обусловлена задачами эпидемиологической, эпизоотической диагностики.

Pseudomonas aeruginosa (синегнойная палочка)

Один из основных возбудителей инфекционных поражений человека и животных, вызываемых псевдомонадами. Микроорганизм выделяют из кишечника 5% здоровых лиц и до 30% госпитализированных пациентов. Первое описание раневой инфекции, вызванной синегнойной палочкой, принадлежит Люке (1862), отметившему характерное сине-зеленое окрашивание перевязочного материала; в чистой культуре микроорганизм выделил Жессар (1882), изучивший его основные культуральные свойства. Первая вспышка госпитальной инфекции, вызванной *Pseudomonas aeruginosa*, зарегистрирована в 1897 г (Багински), но уже в 1899 г С.Н. Серковский указывал, что патогенные свойства микроорганизма чаще реализуются в организме лиц с ослабленным иммунитетом (детей и истощенных больных). Начиная с 70-х гг. *Pseudomonas aeruginosa* — один из основных возбудителей локальных и системных гнойно-воспалительных процессов, особенно в условиях стационаров. Более того, была показана патогенность синегнойной палочки для рыб, различных млекопитающих и даже растений.

Распространение

Pseudomonas aeruginosa распространена повсеместно, ее выделяют из почвы, воды, с растений и от животных (водных или обитающих в ареалах с повышенной влажностью). Вода имеет существенное значение в циркуляции возбудителя, в ней он может выживать до года (при 37°C), в том числе во многих растворах, применяемых в практической медицине и ветеринарии, вплоть до жидкости для хранения контактных линз. Иногда входит в состав нормальной микрофлоры человека; у здоровых индивидуумов *Pseudomonas aeruginosa* выявляют на коже паха, подмышечных областей и ушей (до 2% лиц), на слизистой оболочке носа (до 3% лиц) и глотки (до 7%), в ЖКТ (3-24%). Поскольку возбудитель особенно обильно обсеменяет медицинское оборудование и циркулирует среди персонала и пациентов, то госпитализация существенно увеличивает колонизацию организма. Риск развития инфекции, вызванной синегнойной палочкой, существенно возрастает у больных с нарушениями барьерных систем и факторов резистентности. Инфицирование *Pseudomonas aeruginosa* вызывает до 15-20% всех внутрибольничных инфекций, считается одним из основных возбудителей нозокомиальных пневмоний (до 20%), вызывает треть всех поражений мочеполовой системы у урологических больных и считается причиной 20-25% гнойных хирургических инфекций и первичных грамотрицательных бактериемий. В большинстве случаев источник инфекции и путь передачи обнаружить не удается, т.к. резервуарами возбудителя могут быть самые различные объекты (например, сырые овощи или букет цветов).

Часто синегнойную инфекцию наблюдают у больных с ожогами, заболеваниями мочевого пузыря, особенно у пациентов, длительно получающих антибиотики, что обусловлено выраженной устойчивостью возбудителя.

Одним из важных факторов инфицирования пациентов считается нарушение правил стерилизации, хранения и применения мочевых и сосудистых катетеров, игл для поясничных пункций, оборудования для обеспечения дыхания больного, а также различных растворов.

Высокий риск развития наблюдают как у лиц с иммунодефицитами (вызванными основной патологией), так и у лиц, длительно получающих цитостатики, глюкокортикоиды и антибиотики.

Морфология и тинкториальные свойства возбудителя

Средние размеры - $1-3 \times 0,5-1$ мкм; в нативных препаратах подвижны (имеют один или два полярных жгутика). В мазках чистых культур расположены одиночно, парно, либо в виде коротких цепочек; в мазках из патологического материала их чаще можно обнаружить в цитоплазме фагоцитов, при этом палочки могут быть деформированы; в клиническом материале полиморфизм отсутствует, а каких-либо включений не наблюдают. Синтезирует крахмалоподобное вещество, покрывающее тонким слоем микробную клетку, но не формирующее морфологически очерченного слоя. Более вирулентные штаммы синтезируют повышенное его количество (мукоидные штаммы), что дает основание рассматривать слизь как фактор патогенности. Наиболее часто мукоидные штаммы выделяют из мокроты больных при заболеваниях легких (например, при бронхоэктатической болезни). Формируя капсульное вещество в пораженном организме, клинические изоляты могут легко терять это свойство в первых лабораторных генерациях. Обычно фиксированные препараты окрашиваются по Граму отрицательно.

Культуральные свойства

Растет в широком диапазоне температур ($4-42^{\circ}\text{C}$), что указывает на способность длительно сохраняться в окружающей среде и противостоять защитному повышению температуры тела. Отличительная особенность — ограниченная потребность в питательных веществах, обеспечивающая сохранение жизнеспособности в условиях почти полного отсутствия источников питания. При полном отсутствии углерода количество палочек и их ферментативная активность за неделю снижаются в 10-100 раз, при внесении минимальных количеств углеродсодержащих питательных веществ число палочек восстанавливается в короткие сроки. *Pseudomonas aeruginosa* хорошо растет на простых питательных средах в аэробных условиях при температуре $30-37^{\circ}\text{C}$, а также и при 42°C (что можно использовать как дифференциально-диагностический признак). Образование слизи — характерная особенность; слизь придает характерную вязкость бульонным культурам и колониям мукоидных штаммов.

На жидких средах (например, пептонной воде, МПЖ, бульоне Хоттинге-ра) образует характерную серовато-серебристую пленку; по мере старения культур возникает помутнение среды сверху вниз.

На плотных средах (например, МПА, КА, среде Эндо, Левина, Плоскирева, ЦПХ-агаре) образует весьма разнообразные колонии; на средах Эндо и Плоскирева обычно выделяют колонии следующих типов:

- плоские, неправильной формы, иногда склонные к слиянию, с волнистыми краями;
- напоминающие S-колонии *Escherichia coli*;
- складчатые с неровной поверхностью («маргаритки»);
- слизистые или мукоидные колонии;
- карликовые или точечные, формирующиеся к 18-24 ч роста при 37°C.

При росте на плотных средах у многих штаммов наблюдают феномен радужного лизиса, развивающийся спонтанно. Феномен характерен только для *Pseudomonas aeruginosa*, его можно рассматривать как таксономический признак. Более того, он индивидуально выражен у отдельных штаммов, и его можно использовать для внутривидовой дифференциальной диагностики. При образовании пигмент окрашивает некоторые среды, например агар Мюллера—Хинтона или МакКонки, в зеленый цвет.

Биохимические свойства

Pseudomonas aeruginosa — выраженный хемоорганотроф; метаболизм дыхательный, никогда не броидильный; строгий аэроб. В качестве источника энергии синегнойная палочка использует H_2 или CO . Универсальный акцептор электронов — молекулярный кислород. Как и большинство патогенных гноеродных микроорганизмов, каталазоположительна. Подобно прочим аэробам, синтезирует цитохромоксидазу (индофенолксидаза), а оксидазный тест — один из ведущих при идентификации этой палочки. Синтезирует триметиламин, придающий культурам запах жасмина, винограда или карамели. Не нуждается в факторах роста. Способна расти на протяжении нескольких пассажей в чисто минеральной среде при добавлении подходящего единственного источника углерода. Ассимилирует ацетаты, пируваты, сукцинаты. Может утилизировать глюкозу, L-аланин при их содержании в среде не менее 0,5%.

Протеолитическая активность сильно выражена. Разжижает желатин, свертывает сыворотку крови, гидролизует казеин; утилизирует гемоглобин (большинство патогенных штаммов на кровяном агаре образует зону β-гемолиза). Синтезирует гиалуронидазу; гидролизует не только белки, но и отдельные аминокислоты (например, валин и аланин). Лизин и орнитин не декарбоксилирует; восстанавливает нитраты до нитритов и далее до молекулярного азота.

Сахаролитическая активность низкая; окисляет только глюкозу с образованием глюконовой кислоты.

Ввиду явного преобладания протеолитических свойств над сахаролитической активностью для идентификации синегнойной палочки среды Гисса для пестрого ряда готовят с малым содержанием пептона (до 0,1%) и повышенной концентрацией углеводов (до 2%). При посеве можно наблюдать, помимо чет-

кой реакции с глюкозой, непостоянную ферментацию фруктозы и маннита. Тест Хью-Лейфсона положителен только с глюкозой (в аэробных условиях).

Пиоцины. *Pseudomonas aeruginosa* продуцирует бактериоцины — пиоцины (аэругеноцины); способность к синтезу и чувствительность к ним широко варьируют у различных штаммов, на чем основано пиоцинотипирование псевдомонад, применяемое для внутривидовой дифференциальной диагностики культур. Вирулентные штаммы либо активно продуцируют пиоцины, либо подвержены их действию. В основу метода положены следующие положения.

1. Пиоцины различных штаммов по-разному действуют на индикаторные штаммы.
2. Штамм-продуцент пиоцина резистентен к образуемому им бактериоцину.
3. Различные штаммы обладают разной чувствительностью к набору индикаторных пиоцинов.
4. Пиоцинотипирование используют при эпидемиологической оценке выделенных культур. Для разделения культур на пиоцинотипы используют два основных методических принципа.
 - Типирование по продукции или активности пиоцинов в отношении набора индикаторных штаммов.
 - Типирование по чувствительности штаммов к наборам известных индикаторных пиоцинов. Соответственно культуры получают наименования: «пиоцинотип» — штамм или культура, подверженная литическому воздействию определенного типа пиоцина; «пиоциногенотип» — штамм или культура, образующая определенный тип пиоцина.

Пигментообразование

Характерный и имеющий важное диагностическое значение признак (у 70-80% клинических изолятов). Среди пигментов наиболее часто встречаются:

а. Водорастворимый феназиновый пигмент пиоцианин, окрашивающий питательную среду, отделяемое ран и перевязочный материал в сине-зеленый цвет. В анаэробных условиях пигмент обычно бесцветный, но даже встряхивание среды (частичная аэрация) приводит к появлению окраски.

б. Подавляющее большинство культур образует зеленый пигмент флюоресцеин, или лиовездин, флюоресцирующий при УФ-облучении (с длиной волны 254 нм); для обнаружения можно воспользоваться лампой Вуда.

в. Некоторые штаммы могут синтезировать и другие пигменты — пиорубин (красный), пиомеланин (черно-коричневый), L-оксифеназин (желтый).

г. Оптимальная температура для синтеза пигментов *in vitro* 30-37°C. Кроме того, необходимо дополнение сред глицерином, аминокислотами (особенно аланином), ионами (особенно Mg^{2+} и K^+). Высоковирулентные штаммы отличаются значительное образование пиоцианина, проявляющего свойства бактериоцина, действующего на грамположительные и грамотрицательные бактерии, а также имеющего умеренную фунгицидную активность.

д. При выделении культур иногда наблюдают атипичные непигментированные или слабопигментированные формы. Обычно их идентификация требует дополнительного тестирования, что усложняет диагностические исследования. Непигментированные штаммы составляют 8,3-18%, а 6-37% всех изолятов может быть пигментировано слабо.

Основные механизмы изменчивости культуральных признаков *Pseudomonas aeruginosa* — лизогенная конверсия и мутации.

Отсутствие или утрата способности к пигментообразованию также могут обуславливать сопутствующая микрофлора, действие антибиотиков, дефицит O_2 или смена среды обитания с нарушением физиологических свойств бактерий, вызванных искажением белкового метаболизма в патологически измененных тканях, особенно при злокачественных новообразованиях.

Пиомеланин предохраняет микроорганизм от неблагоприятного действия изменений концентрации O_2 и УФ-лучей. Его наличие также помогает бактериям переносить гипоксию при инфекциях глубоких тканей. Подобные свойства пигмента дают основание считать меланинообразующие штаммы более вирулентными.

Патогенез

По сравнению с *Pseudomonas aeruginosa*, подавляющее большинство микроорганизмов данной группы, обитая в почве и воде, имеют ограниченное клиническое значение (за исключением *B. mallei* и *B. pseudomallei* — возбудителей сапа и мелиоидоза соответственно). Высокая частота выделения и более выраженная патогенность *Pseudomonas aeruginosa* связаны с наличием у этого микроорганизма ряда факторов вирулентности, способствующих колонизации и инфицированию тканей организма человека. К детерминантам вирулентности относятся факторы, способствующие адгезии, инвазии, цитотоксичности.

Адгезия *Pseudomonas aeruginosa* к клеткам эпителия опосредуется ворсинками (пилями), которые обладают способностью специфически связываться с GM-1 ганглиозидными рецепторами эпителия. Секретируемый микроорганизмом фермент нейраминидаза, отщепляя остатки сиаловых кислот от рецептора, облегчает специфическую адгезию.

Локальное и системное действие на организм млекопитающих оказывают и другие секретируемые *Pseudomonas aeruginosa* ферменты. Фосфолипаза разрушает цитоплазматические мембраны эукариотических клеток, инактивирует опсонины, гидролизует сурфактант легких. Цитотоксическим действием (в том числе и в отношении макрофагов), а также способностью подавлять биосинтез белка обладает экзотоксин А. Биосинтез белка ингибируется также экзэнзимом S. Эластаза (протеаза II) разрушает иммуноглобулины и компоненты комплемента, ингибирует активность нейтрофилов. Функцию нейтрофилов и лимфоцитов подавляет токсин – лейкоцидин. Цитотоксическим эффектом обладает и пигмент пиоцианин, обуславливающий сине-зеленую окраску среды

при выращивании микроорганизма в культуре или гнойного отделяемого инфицированных ран.

Мощным индуктором системной воспалительной реакции является липополисахарид *Pseudomonas aeruginosa*. Часть штаммов продуцируют капсульный полисахарид альгинат. Штаммы, продуцирующие альгинат, обычно выявляются у пациентов с хроническими инфекциям. Альгинат способствует формированию на поверхности эпителия пленки, которая обеспечивает защиту патогена от воздействия факторов резистентности макроорганизма и антибиотиков.

Для *Pseudomonas aeruginosa* характерно разнообразие весьма тонких механизмов регуляции экспрессии факторов вирулентности. Активность механизмов регуляции направлена на быструю адаптацию микроорганизма к меняющимся условиям обитания и обеспечение максимальной экономичности с энергетической точки зрения. При пребывании микроорганизма во внешней среде факторы вирулентности не синтезируются, при попадании же во внутреннюю среду организма млекопитающих начинается интенсивный синтез этих белков, способствующих развитию инфекционного процесса. Сигналами для микроорганизма о попадании во внутреннюю среду могут быть изменения температуры, pH среды, контакт с мембраной эукариотических клеток. Распознавание таких сигналов осуществляют специфические рецепторы, локализованные в клеточной стенке микроорганизма. Передачу сигнала, обеспечивающего начало синтеза фактора вирулентности, от рецептора к гену, кодирующему белок, осуществляют двухкомпонентные системы передачи сигнала. Такие системы действуют по принципу последовательной активации ферментов в реакции фосфорилирования и являются универсальными в регуляции вирулентности микроорганизмов. У *Pseudomonas aeruginosa* описаны двухкомпонентные системы, регулирующие образование ворсинок и синтез экзоэнзимов. Кроме регуляции синтеза факторов вирулентности на уровне отдельных микробных клеток, у *Pseudomonas aeruginosa* регуляция происходит и на уровне популяции. Речь идет о феномене "кооперативной чувствительности" или "чувства кворума" (quorum sensing), заключающемся в накоплении в микробной популяции низкомолекулярных соединений (гомосеринлактонов), осуществляющих при достижении определенной концентрации депрессию синтеза большинства факторов вирулентности. Таким образом, экспрессия генов вирулентности оказывается зависящей от плотности микробной популяции. Биологический смысл феномена, вероятно, связан с координированным началом синтеза факторов вирулентности только после достижения микробной популяцией определенного уровня плотности. Регуляции на уровне кооперативной чувствительности у *Pseudomonas aeruginosa* подвержена экспрессия большинства факторов вирулентности и вторичных метаболитов.

У *Pseudomonas aeruginosa* описана система секреции протеинов (так называемая протеаза III), обеспечивающая не только выведение экзоэнзимов из

внутренней среды бактериальной клетки, но и их транслокацию внутрь эукариотической клетки, то есть к чувствительным мишеням. К протеинам, секретируемым описанной системой, относятся и факторы вирулентности.

Таким образом, патогенное действие *Pseudomonas aeruginosa* в первую очередь обусловлено образованием веществ, проявляющих свойства экзотоксинов, и высвобождением эндотоксинов при гибели и распаде бактериальных клеток.

Экзотоксины бактерий представлены продуктами жизнедеятельности с широким спектром биологической активности; среди них основное значение имеют:

Экзотоксин А — белок с M_r 66 000–72 000 Да; молекула токсина состоит из одной полипептидной цепи с 4 дисульфидными связями; свободных сульфгидрильных групп не содержит. Характерные особенности: наличие аргинина в качестве N-концевой аминокислоты и высокое содержание кислых аминокислот. Токсин термолabile, расщепляется трипсином, панкреатической эластазой, проназой, а также под действием собственных протеолитических ферментов. Для синтеза *in vitro* необходимы хорошая аэрация и соответствующая температура (оптимум 32°C). Механизм действия связан с модификацией белков через АТФ-рибозилирование. Его мишень — фактор элонгации 2 (ФЭ-2); следствие — нарушение организации матрицы белкового синтеза (аналогичным свойством обладает дифтерийный токсин). Действие на подопытных животных превосходит токсичность всех остальных продуктов синегнойной палочки и проявляется в общем токсическом действии, отеках, некрозах, гипертензии с последующим коллапсом, метаболическом ацидозе, дыхательной недостаточности, параличе внутриклеточного синтеза белков и т.д. Гистологически выявляют печеночно-клеточный некроз, геморрагические поражения легких, тубулярный некроз почек и т.д.

Экзоэнзим S — белок с АДФ-трансферазной активностью; термостабилен; инактивируется под действием денатурирующих и восстанавливающих агентов, ионов Cu^{2+} и Fe^{2+} ; АТ к экзотоксину А его не нейтрализуют. Образуется в двух формах: первая — ферментативно активный белок с M_r 49 000 Да; вторая — неактивный белок-предшественник с M_r 53 000 Да. В виде очищенного детергентами препарата нетоксичен для животных (очевидно, инактивируется при очистке); *in vivo* вызывает глубокие патологические процессы в легких.

Цитотоксин оказывает выраженное цитотоксическое действие на полиморфноядерные нейтрофилы (первоначально назывался лейкоцидином, но позднее установлено патологическое действие на любые клетки); способствует развитию нейтропении. Вызывает ультраструктурные изменения в клетках, нарушения физиологических градиентов K^+ , Na^+ , Ca^{2+} и глюкозы через повышение проницаемости клеточных мембран; последнее обуславливает набухание клеток и потерю крупных (например, белковых) молекул. Данный токсин синтезирует 96,7% культур патогенных штаммов.

Гемолизины. Микроорганизм образует две гемолитические субстанции — термолabileный гемолизин с лецитиназной активностью (указанный выше как фосфолипаза С) — белок с необычно высокой для бактериальных фосфолипаз молекулярной массой (78 000 Да) и термостабильный гемолизин - гликопептид, состоящий из L-рамнозы и 1-β-гидрооксидеканоиновой кислоты.

Сочетанное образование обоих продуктов предполагает их функциональное взаимодействие: гликолипид подобно детергенту трансформирует фосфолипиды в растворимые формы (субстрат для фосфолипазы С), потенцируя тем самым ее активность. Эффективному высвобождению фосфатов способствует параллельный синтез бактериальной щелочной фосфатазы. Такое действие вызывает солубилизацию и гидролиз фосфолипидов с образованием фосфорилхолинов — источника неорганических фосфатов; гемолизины приводят к развитию некротических поражений (особенно в печени и легких). Гемолизины продуцируют все клинические изоляты.

Эндоксин и фактор проницаемости. Среди продуктов жизнедеятельности микроорганизма обнаружен энтеротоксический фактор - белковой природы, термолabileный, чувствительный к действию трипсина. Его патогенетическое значение оценить трудно, т.к. инфекции *Pseudomonas aeruginosa*, сопровождающиеся диареей, отмечают крайне редко (шанхайская, или пятидневная лихорадка). Вирулентные штаммы продуцируют фактор проницаемости (также лабильный к нагреванию и действию трипсина), участвующий в развитии патологических процессов в тканях.

Другой продукт жизнедеятельности (очевидно, участвующий в формировании поражений) — **нейраминидаза** (нарушает процессы метаболизма веществ, содержащих ненраминовые кислоты, например, в соединительно-тканых элементах). Нейраминидаза способна в 2-3 раза усиливать действие других токсинов. Также следует обратить внимание на способность *Pseudomonas aeruginosa* синтезировать протеолитические ферменты (по крайней мере, 3 различные протеазы, отличающиеся по своим характеристикам и субстратной специфичности).

Протеаза I (нейтральная) образуется в очень незначительных количествах; данные о ее субстратной специфичности и участии в патологических процессах отсутствуют,

Протеаза II (эластаза) обуславливает 75% всей протеолитической активности; расщепляет эластин, казеин, гемоглобин, фибрин, Ig, комплемент и другие белки, но слабо действует на коллаген. Мишень — пептидные связи между гидрофобными аминокислотами. Относится к металлопротеиназам и инактивируется хелатами, ионами тяжелых металлов и сывороточным β-макроглобулином. Синтезируется как связанный с клеткой профермент, активирующийся в периплазматическом пространстве. Активируется путем ограниченного протеолиза щелочной протеазой или готовой порцией эластазы. Обнаружена у 85% штаммов.

Протеаза III (щелочная протеаза) гидролизует многие белки (в том числе γ -интерферон), но не расщепляет эластин; внутривенное введение очищенного препарата вызывает кровоизлияния практически во всех внутренних органах; внутривенное введение приводит к местным, позднее некротизирующимся кровоизлияниям.

Коллагеназа вызывает гидролиз коллагена в соединительных тканях. Основной фактор вирулентности при инфекционных поражениях роговицы.

Антигенная структура

Основные диагностически значимые Ag *Pseudomonas aeruginosa* - соматический O- и жгутиковый H-Ag. Серологическую идентификацию культур и выявление их принадлежности к определенному серотипу (серовару) проводят по наличию у выделенной культуры сочетания группоспецифичного O-Ag и типоспецифичного H-Ag.

O-антигенный комплекс — ЛПС с белками и липидами клеточной стенки. ЛПС эндотоксина образует тип- или группоспецифический термостабильный O-Ag, на основе структуры которого проводят серологическое типирование, т.е., он основной структурный компонент O-Ag, обуславливающий его специфичность. Принципиально структура ЛПС *Pseudomonas aeruginosa* аналогична строению ЛПС прочих грамотрицательных бактерий и включает липид А (базовая структура) и O-специфические боковые цепи. Белковый компонент эндотоксина представляет антигенный комплекс, общий для псевдомонад, т.е. родовой O-Ag: по своим свойствам и природе он аналогичен белку А других бактерий. По структуре O-Ag выделяют более 20 серогрупп, но высокая антигенная вариабельность *Pseudomonas aeruginosa* обуславливает постоянное увеличение их количества.

H-, или жгутиковые, Ag представлены термолабильными белками низкой специфичности, обусловленной различиями в строении флагеллинов. Выявлено 15 различных типов H-антигенов. O- и H-Ag *Pseudomonas aeruginosa* обозначают арабскими цифрами (например, O-1; O-2; H-1; H-2 и т.д.), указывающими на принадлежность к определенной серогруппе (или H-серотипу). Сочетание индексов определяет принадлежность к конкретному серовару. H-Ag выявляют лишь у жизнеспособных, подвижных бактерий, не подвергшихся какому-либо химическому воздействию (в частности, дезинфектантов) и в культурах, выращенных на жидких средах (особенно дополненных глицерином). Схема сероидентификации выделенных изолятов: выявление группового O-Ag; выявление типового H-Ag; определение (по таблице) принадлежности к серовару по сочетанию O- и H-Ag.

У мукоидных штаммов можно обнаружить капсульный K-Ag. До настоящего времени его диагностическая значимость была невелика, т.к. подходы к его идентификации по его структуре не разработаны. Однако (как более поверхностно расположенный Ag) он способен маскировать O-детерминанты, искажая O-агглютинабельность.

Среди поверхностных Ag *Pseudomonas aeruginosa* обнаружены белковые пилиарные (фимбриальные) Ag. Их анатомическая основа — пили (фимбрии, в том числе и F-пили). Выделяют два типа пилей и столько же типов Ag. Они не играют диагностической роли, и их изучение обычно составляет предмет специальных исследований.

Патогенез

Несмотря на наличие большого набора факторов вирулентности, синегнойную палочку следует рассматривать как оппортунистический патоген, т.к. инфекции редко наблюдают у лиц с нормальной резистентностью и неповрежденными анатомическими барьерами. Большинство штаммов *Pseudomonas aeruginosa* обладает поверхностными микроворсинками, обеспечивающими адгезию к эпителию (наиболее выраженную в воздухоносных путях). Взаимодействие с клетками реализуется через рецепторы, включающие N-ацетилнейраминовые кислоты; определенную роль играет и вырабатываемая бактериями слизь. Прикрепление к субстратам стимулирует дефицит фибронектина, наблюдаемый при многих заболеваниях, особенно при хронических заболеваниях легких. Псевдомонады — типичные внеклеточные паразиты, и их размножение прямо обусловлено способностью противостоять действию факторов резистентности. В частности, слизь и секретируемые цитотоксины затрудняют их элиминацию фагоцитами и иммунокомпетентными клетками, что особенно выражено у пациентов с иммунодефицитами. Бактерии образуют комплекс биологически активных продуктов, обеспечивающих их неорганическим фосфором (фосфолипазы), железом (сидерофоры, нарушающие связывание железа трансферрином), и метаболиты, нарушающие гомеостаз тканей и частично стимулирующие воспалительные реакции (например, протеазы гидролизуют эластин, способствуя внедрению *Pseudomonas aeruginosa* в ткани и секвестрации в артериальной стенке, а также активируют комплементарный каскад).

Лабораторная диагностика

На наличие синегнойной инфекции может указать голубовато-зеленое окрашивание краев и отделяемого ран, перевязочного материала (особенно после обработки H_2O_2), развитие синдрома *ectyma gangrenosa* (патогномоничного для синегнойных септицемий) при ожогах, поражениях мочеполовой системы. Однако следует учитывать, что диагностируют то или иное поражение только выделением возбудителя. Существует несколько схем выделения и идентификации *Pseudomonas aeruginosa*. Наиболее распространенная схема приведена на рис. 11. Д.А. Васильевым и А.Э. Афониним предложена оригинальная схема выделения и идентификации *Pseudomonas aeruginosa*, позволяющая в более короткие сроки идентифицировать данную культуру. В любом случае для успешного проведения анализа важное значение имеет способ взятия исследуемого материала. Техника взятия и первичного посева клинического материала

аналогична таковой при лабораторной диагностике возбудителей других бактериальных кишечных и гнойно-воспалительных инфекций. Однако при взятии материала для исследования следует соблюдать и учитывать следующие важные моменты.

- Исследуемый материал желательно забирать до начала терапии антибактериальными препаратами или (если она начата) только после выведения препарата из организма.
- Материал для бактериологического исследования следует забирать непосредственно из очага поражения с соблюдением всех необходимых правил асептики.
- При невозможности взятия материала непосредственно из очага инфекции, или если он сообщается с внешней средой, проводят исследование отделяемого (например, мочи при пиелонефритах, мокроты при пневмониях отделяемого цервикального канала или влагалища при воспалениях половых органов и др.).

Схема бактериологического выделения и идентификации *Pseudomonas aeruginosa*, предложенная Д.А. Васильевым, Э.А. Афониным.

1. Посев на накопительную среду УСХИ (37°C 24-48 часов).
2. Перенос бактериальной суспензии на элективную среду КМ УСХИ (37°C – 24 часа).
3. Пересев выделенных колоний на ацетамидный агар, питательный агар с хлоридом бария, МПА (42°C – 24 часа).
4. По результатам культивирования - идентификация выделенной культуры.

Особые трудности представляет профилактика синегнойной инфекции, т.к. возбудитель также устойчив к действию антисептиков и дезинфектантов. Более того, доказана возможность длительного сохранения возбудителя в растворах фурацилина, предназначенного для хранения катетеров и хирургического инструмента, а также для промывания ран. *Pseudomonas aeruginosa* способна вырабатывать факторы, нейтрализующие некоторые дезинфектанты, а в средах с достаточным содержанием питательных веществ, будучи аэробом, она может до 2 недель оставаться жизнеспособной в условиях анаэробнозиса. В то же время она чувствительна к высушиванию, действию хлорсодержащих дезинфицирующих препаратов, легко инактивируется действием высокой температуры и давления (при кипячении, автоклавировании).

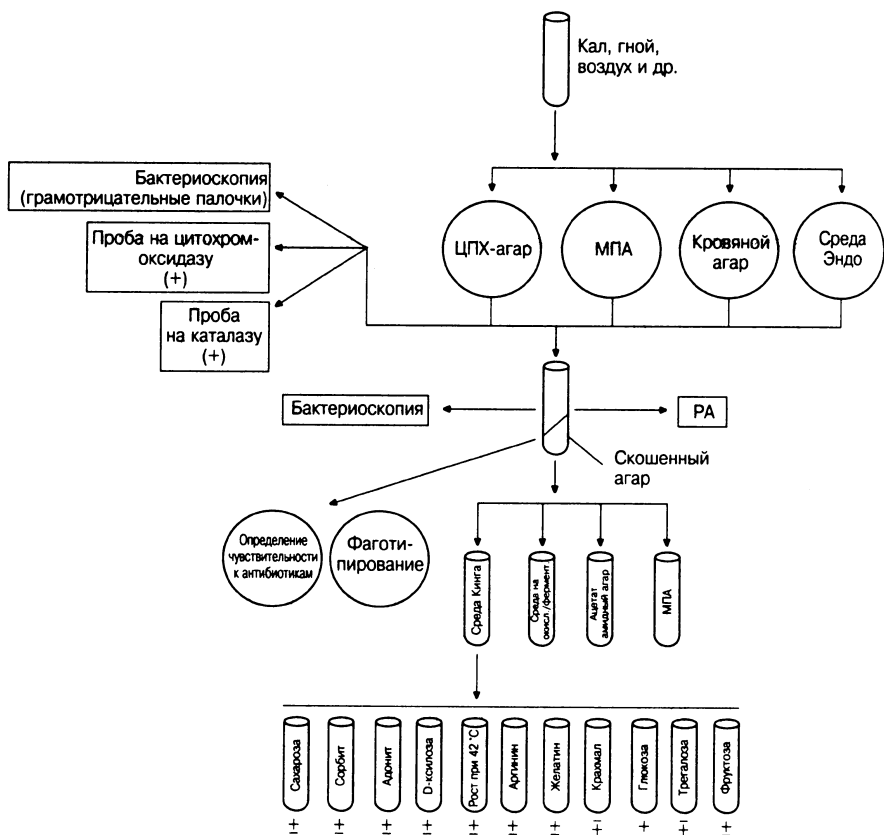


Рисунок 11. Принципиальная схема бактериологического выделения *P. aeruginosa*

Pseudomonas (Burkholderia) *serasia*

Повсеместно распространенный микроорганизм, экология которого имеет много общего с таковой у *Pseudomonas aeruginosa*, но проявляющий меньшую вирулентность. Часто контаминировать препараты для местной анестезии слизистой оболочки верхних отделов дыхательных путей, растворы, применяемые при бронхоскопии, а также различные лекарства (включая антибиотики), используемые ингаляционно. *Pseudomonas serasia* — подвижная полиморфная палочка, снабженная 3-8 полярно расположенными жгутиками (лофотрихи). Окисляет глюкозу, лактозу, мальтозу и маннит; резистентна к полимиксину В. По Граму часто окрашивается биполярно. Выделение требует применения селективных сред; температурный оптимум 30°C (некоторые штаммы могут рас-

ти при 35°C); на кровяном агаре с полимиксином В образует выпуклые мутные маслянистые беловато-серые колонии. Некоторые штаммы синтезируют метиламин, придающий культурам сладковатый запах; также возможно образование желтого или зеленоватого нефлюоресцирующего феназинового пигмента, растворимого в воде и хлороформе.

Pseudomonas (Burkholderia) mallei

Возбудитель сапа — инфекционного заболевания человека и животных; заболевание известно с древнейших времен (еще Аристотель считал сап заразной болезнью). Возможность заражения человека от животных впервые описал Оскардес (1783). Возбудитель выделили Леффлер, Шютц (1882) и Васильев (1883).

Распространение

Возбудитель неустойчив к действию факторов внешней среды; прямой солнечный свет убивает его за 24 ч, но в выделениях больных может сохраняться на свету в течение нескольких недель. Термолабилен — при 100°C погибает в течение нескольких минут, при 55-60°C — за 1-2 ч. В воде сохраняется до 30 суток. Помещения, в которых находились больные животные, представляют эпидемическую опасность в течение 6 недель. Преимущественно болеют чувствительные животные — лошади, ослы, верблюды, реже — козы, собаки и кошки. Среди лабораторных животных к возбудителю чувствительны хомячки и морские свинки. Заболевание человека носит выраженный профессиональный характер; основной путь заражения — контактный (при попадании возбудителя на поврежденную кожу и слизистую оболочку конъюнктивы). Также реальную опасность представляет использование зараженной воды. Довольно часто отмечают случаи лабораторных инфекций, при которых нельзя исключить воздушно-капельное заражение. Благодаря проведенным интенсивным профилактическим мероприятиям, в настоящее время сап не представляет серьезной эпидемической угрозы. Отмечают лишь спорадические случаи в Азии, Африке, Центральной и Южной Америке.

Морфология и тинкториальные свойства

Тонкие, слегка изогнутые палочки с закругленными концами размером 2-3×0,5-1 мкм; при выращивании *in vitro* склонны к полиморфизму (образуют более мелкие формы либо цепочки); неподвижны; спор не образуют. Окрашиваются анилиновыми красителями (часто окрашиваются биполярно).

Культуральные свойства

Растет на простых средах, дополненных 4-5% глицерина; растет в интервале 20-45°C (оптимум 37°C); оптимум рН 6,5-7,2. Строгий аэроб.

На жидких средах (например, МПБ с глицерином) первоначально образует мутную взвесь, а со 2-х суток начинает формировать пристеночный осадок и пленки; затем культура выпадает в осадок, образующий при вращении пробирки тяжи, поднимающиеся кверху. С поверхностной пленки на дно спускаются пленки. При хранении среда полностью не просветляется.

На полужидких средах (например, на желатине) наблюдают поверхностный сероватый налет, прорастающий в верхнюю часть линии укола (иногда в месте укола наблюдают желтоватое окрашивание); желатин не разжижается.

На плотных средах (например, агаре с глицерином) образует плоские полупрозрачные колонии, сливающиеся в прозрачный янтарный тягучий налет. На свернувшейся сыворотке образует мелкие мутные беловатые колонии (среда не разжижает). Дает характерный рост на картофельных пластинках — через 24 ч образует полупрозрачные колонии, позднее (через 6-8 суток) они сливаются, образуя полупрозрачные массы цвета меда (пигментирование проявляется только на картофельных средах и варьирует от сероватого до буровато-красного). Независимо от цвета налета колонии сохраняют прозрачность. Пигментообразование возможно только на картофельной среде.

Биохимия

Некоторые штаммы разлагают глюкозу, маннит, левулезу, глицерин с синтезированием кислоты без газа; палочки не синтезируют индол и не восстанавливают нитраты. Синтезируют H_2S и аммиак на жидких средах; каталазо-положительны. Молоко свертывают медленно (10-12 суток), образуя незначительное количество кислоты; пептонизацию молока не вызывают.

Патогенез поражений

Развитие острой воспалительной реакции с формированием очагов гнойного расплавления тканей, обусловленного высвобождением эндотоксина. В редких случаях (при заражении небольшой дозой возбудителя или слабо вирулентным штаммом) в месте внедрения возбудителя наблюдают формирование гранулем и их казеозный некроз. Разрушение первичных очагов способствует лимфо- и гематогенному разнесу *Pseudomonas mallei* по всему организму; процесс приобретает септико-пиемический характер с образованием абсцессов в мышцах и внутренних органах (наиболее часто в легких, печени, селезенке).

Клинические проявления

Инкубационный период составляет 1-5 суток; заболевание начинается остро, с подъемом температуры тела (затем она приобретает значительную амплитуду, как при сепсисе). В месте проникновения возбудителя последовательно образуются темно-красная папула, затем пустула с подрытыми краями и «сальным» дном. Часто формирование очагов сопровождается регионарным лимфангиит. Позднее (через 5-7 суток) отмечают вторичное множественное появление изъязвляющихся папул. Состояние больного резко ухудшается,

обычно наблюдают проявления тяжелой плевропневмонии с кровохарканьем, реже клиническую картину обуславливают абсцедирующие поражения других органов. Летальность при острой форме достигает 100%. Хроническое течение протекает в 3 формах — кожной, легочной и носоглоточной. Наиболее распространена кожная форма, сопровождаемая множественными «холодными» абсцессами. Их самопроизвольное вскрытие ведет к образованию свищей с обильным отделяемым. При носоглоточной форме типичны слизисто-гнойное отделяемое, образование желто-зеленых корочек и распространение изъязвлений на зев и трахею. Легочные поражения проявляются ползучей плевропневмонией и мышечными абсцессами. Прогноз хронической формы также неблагоприятен; летальность может достигать 50% и выше.

Лабораторная диагностика

Основывается на выделении и идентификации возбудителя (рис. 12), а также на результатах кожных проб.

Все исследования проводят в условиях, необходимых для работы с возбудителями особо опасных инфекций. Для исследования забирают мокроту, гной, кровь и отделяемое вскрывшихся абсцессов или биоптаты закрытых абсцессов. При невозможности немедленного проведения анализа материал консервируют внесением 30% раствора глицерина (хранить следует не более 10-15 суток при температуре 4°C). Для подавления роста прочих микроорганизмов в среды вносят красители, например основной и кислый фуксин (1:100000), кристаллический фиолетовый (1:200000), бриллиантовый зеленый (1:1000000). При выделении подозрительных колоний проводят биологическую пробу на морских свинках (также можно использовать хомяков и кошек). Смешанную культуру вводят подкожно, чистую — внутрибрюшинно. На месте введения через 2-3 суток образуется опухоль-узелок, вскрывающаяся на 4-5 сутки с образованием язвы. На 3-10 сутки у морских свинок-самцов, зараженных внутрибрюшинно, развивается характерное поражение яичек (феномен Штрауса). Следует помнить, что феномен не патогномоничен для заболевания, и его можно вызвать заражением животных *Pseudomonas aeruginosa*, *P. pseudomallei* и другими микроорганизмами. Основные дифференцирующие признаки возбудителя: неподвижность, отсутствие способности образовывать газообразный азот, разжижать желатин и расти при температуре 42°C.

Аллергическая проба. В 1891 г русские ветеринарные врачи Х. Герман и О. Кальнинг предложили средство диагностики сапа – маллеин. При подозрении на сап больному внутрикожно (конъюнктивально) вводят маллеин (бактериальный аллерген, полученный из культур *Pseudomonas mallei*); реакция имеет больше эпидемиологическое, эпизоотическое значение, т.к. у больного положительная воспалительная реакция развивается на 2-3 неделе заболевания.

Серологические исследования. Наличие АТ в сыворотке больных выявляют РА со специальным штаммом (ориентировочная концентрация микроор-

ганизмов в суспензии не менее 1 млрд/мл), РСК (основная диагностическая реакция) и РНГА.

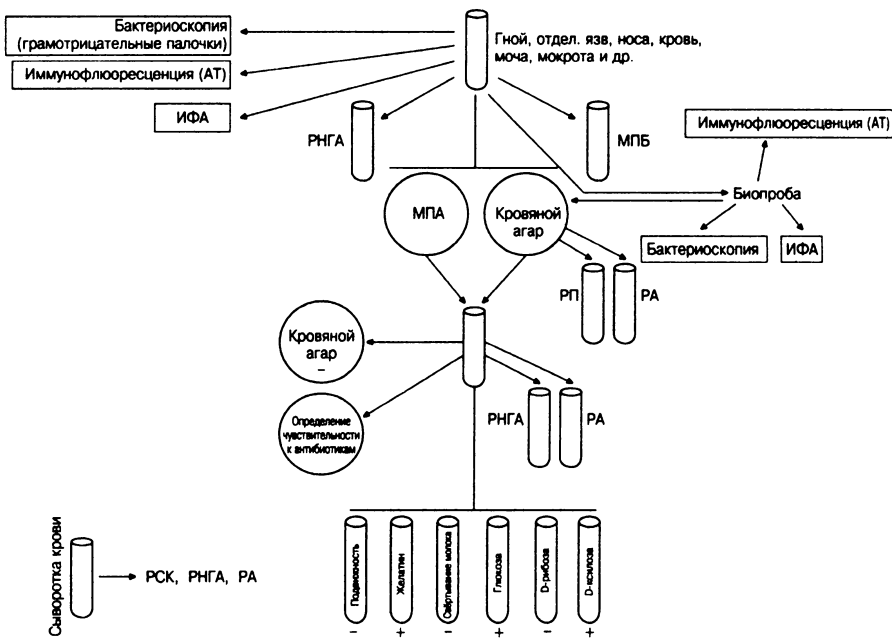


Рисунок 12. Принципиальная схема бактериологического выделения возбудителя сепса

Pseudomonas (Burkholderia) pseudomallei (палочка Уитмора)

Возбудитель зоонозов. У человека и животных вызывает мелиоидоз (болезнь Стэнтона-Флетчера, ложного сепса). Микроорганизм впервые выделил Уитмор (1911), в опубликованной (совместно с Кришнасами) работе (1912) по случаям выявления мелиоидоза у морфинистов в Рангуне он указал на возможность заражения через грязные иглы и назвал его «септицемией морфинистов». Позднее Стэнтон и Флетчер (1932) изучили характер заболеваний грызунов, кошек, собак, лошадей и кроликов и показали, что основные случаи заболевания человека обусловлены употреблением пищевых продуктов, загрязненных испражнениями грызунов.

Распространение

Заболевания зарегистрированы в странах Юго-Восточной Азии (Индокитай, Филиппины, Шри-Ланка, Индонезия), Австралии (Северный Квинсленд) и Новой Гвинее. Эндемичные очаги выявлены на Мадагаскаре, в Центральной и

Западной Африке, Иране и Турции. Спорадические случаи отмечают в Латинской Америке (Мексика, Панама, Эквадор, Гаити, Бразилия) и в США (Джорджия, Оклахома); в России достоверных случаев мелиоидоза человека не зарегистрировано. В периодической печати имеются сообщения о случаях мелиоидоза у ветеранов Вьетнамской войны, по-видимому, вдыхавших *Pseudomonas pseudomallei* в аэрозолях, распыляемых вертолетами ВВС США и Южного Вьетнама.

Резервуар инфекции — различные дикие (грызуны, кенгуру) и домашние (кошки, собаки, коровы, козы, овцы, свиньи, лошади) животные. В окружающую среду возбудитель попадает с мочой и испражнениями, а также с гнойным отделяемым слизистых оболочек глаз и носоглотки больных животных. Среди лабораторных животных к заражению чувствительны крысы, мыши, кролики и морские свинки.

В организм человека возбудитель проникает через слизистую оболочку ЖКТ вместе с инфицированной пищей, ингаляционно — в составе пылевого аэрозоля либо контактно, через повреждения кожных покровов. Случаи заражения от больного человека не зарегистрированы.

Морфология и тинкториальные свойства

Pseudomonas pseudomallei — полиморфная палочка размером 1,5-6×0,5-1 мкм; 24-48-часовые культуры представлены мелкими палочками с закругленными концами. Позднее образует цепочки клеток длиной до 20 мкм; в старых культурах преобладают кокковидные формы. Подвижна (лофотрих), снабжена 1-4 жгутиками. В мазках из чистых культур палочки располагаются одиночно, парами, короткими цепочками или «обоймами» по 5-7 штук, в мазках-отпечатках из органов — одиночно или компактными скоплениями. Анилиновыми красителями окрашивается биполярно; окраска по Ранту выявляет гранулярную цитоплазму, а по Романовскому-Гимзе — утолщенную оболочку, напоминающую капсулу.

Культуральные свойства

Факультативный аэроб, относительно неприхотлив и растет на синтетических средах с отдельными аминокислотами или аммонийными солями некоторых органических кислот. Также растет на дрожжевой воде, а в пресной воде может жить и размножаться до 18 месяцев. Оптимум рН 6,8-7,0; температурный оптимум 37°C.

На жидких средах образует выраженное помутнение (через 24-36 ч) и поверхностную пленку; последняя интенсивно окрашивается в оранжево-красный цвет после добавления нейтрального красного. Через 2-5 суток пленка грубеет, утолщается (до 5мм), среда постепенно просветляется, образуется рыхлый осадок. Культуры издаю затхлый запах, напоминающий запах плесени.

На твердых средах (например, 5% глицериновом агаре) образует мелкие прозрачные, затем мутнеющие беловатые S-колонии с металлическим блеском. Также можно обнаружить и R-колонии. Сначала они прозрачны, а затем мутнеют, утрачивают правильную форму и сморщиваются. Нередко *Pseudomonas pseudomallei* образует M-колонии, напоминающие крупные (до 7 мм) куполообразные S-колонии. Диссоциацию наблюдают после 2-3 суток роста на питательной среде. На кровяном агаре растут быстро (через 96 ч колонии могут достигать 1 см), некоторые штаммы дают α -гемолиз. На агаре с лактозой и бромтимоловым синим образуют прозрачные голубые колонии (через 48 ч), на 6-7 сутки они приобретают оранжевую окраску. Некоторые штаммы образуют золотисто-коричневый пигмент на картофельных и глицериновых средах. *Отличие от возбудителя сапа* — способность расти на средах без глицерина.

Биохимическая активность

Ферментирует с образованием кислоты глюкозу, сахарозу, лактозу, мальтозу, галактозу, дульцит и декстрин, несколько отсроченно (к 7 суткам) — маннит, арабинозу, рамнозу, ксилозу, левулезу и раффинозу. Не образует индол и H_2S ; реакция Фогеса-Проскауэра отрицательна; медленно сворачивает и пептонизирует молоко: медленно разжижает желатин.

Патогенез

Внедрение возбудителя сопровождается незначительной воспалительной реакцией. Мигрирующие фагоциты поглощают *Pseudomonas pseudomallei*, однако фагоцитарные реакции носят незавершенный характер, и возбудитель диссеминирует по кровеносным и лимфатическим путям. В последующем процесс приобретает септико-токсемический характер с формированием абсцедирующих гранул в различных органах, т.е. его проявления не имеют патогномоничных признаков и часто имитируют различные инфекции.

Клинические проявления

Инкубационный период варьирует от 2 до 14 суток; выделяют 4 основные формы инфекционного процесса — токсическую, острую, подострую и хроническую. Летальность при острых формах может достигать 50% и выше.

Лабораторная диагностика

Включает выделение (рис. 13), серологическое выявление Ag возбудителя, постановку биологической пробы и кожных проб с маллеином. Материалы для бактериологического исследования — кровь, мокрота, моча,

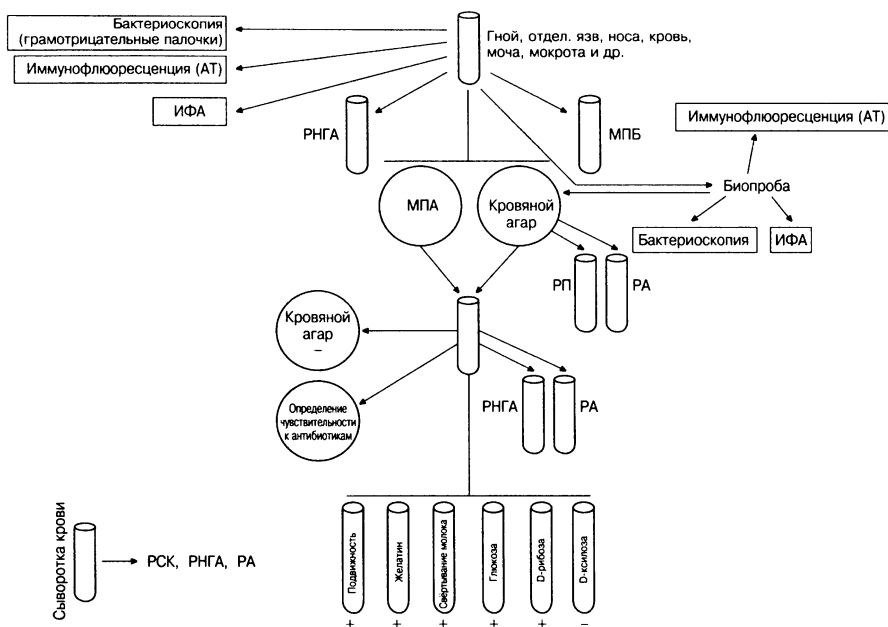


Рисунок 13. Принципиальная схема бактериологического выделения *Pseudomonas pseudomallei*

гнояное отделяемое из абсцессов и секционный материал (из органов, где имеются очаги поражения). Образцы, контаминированные сопутствующей микрофлорой (выявляют при микроскопии), обрабатывают пенициллином (1000 ЕД на 1 мл). Характерные особенности — медленный рост на кровяном агаре с образованием М-, S- и R-колоний кремово-оранжевого цвета; подвижность; способность к росту при температуре 42°C; способность гидролизовать желатин, аргинин и окислять глюкозу, мальтозу и лактозу. Биологическую пробу проводят на крысах (резистентны к возбудителю сапа) и морских свинках, заражаемых внутрибрюшинным введением соответственно 0,5 и 1 мл суспензии материалов; у самцов морских свинок может развиваться феномен Штрауса. В зависимости от вирулентности штамма животные погибают на 3-15 сутки; их вскрытие выявляет характерные поражения внутренних органов и наличие микроорганизмов, которые следует изолировать и определить их биохимические свойства. Серологические исследования включают постановку РСК, РНГА, РА с сывороткой пациента; диагностическими титрами для РА считают разведение 1:640, для РСК — 1:20, для РНГА — 1:4 и выше.

Питательные среды для культивирования и идентификации псевдомонад

Среда Кинга А. Пептон — 20,0 г, глицерин — 10,0 г, калий серноокислый — 10,0 г, магний хлористый — 1,4 г, агар — 20,0 г, вода дистиллированная — до 1000,0 мл.

Среда Кинга В. Пептон — 20,0 г, глицерин - 10,0 г, калий фосфорнокислый двузамещенный — 1,5 г, магний серноокислый — 1,5 г, агар — 15,0 г, вода дистиллированная — до 1000,0 мл (рН 7,2).

Среда Мак-Конки. Пептон — 20,0 г, лактоза — 10,0 г, натрий хлористый — 5,0 г, таурохолат натрия — 5,0 г, нейтральный красный — 0,03 г, агар — 20,0 г, вода дистиллированная — до 1000,0 мл (рН 7,4).

Среда Хью-Лейвсена. Пептон — 2,0 г, агар - 3,0 г, натрий хлористый — 5,0 г, калий фосфорнокислый двузамещенный — 0,3 г, 0,2 %-ный водный раствор бромтимолового голубого — 15,0 мл, глюкоза — 10,0 г, дистиллированная вода — до 1000,0 мл.

Цетримидный агар. Пептон — 20,0 г, агар — 13,0 г, магний хлористый — 1,4 г, калий серноокислый — 10,0 г, цетримид (цетилтриметиламмония бромид) - 0,3 г, глицерин — 10,0 г, вода дистиллированная — до 1000,0 мл (рН 7,2).

Селективная среда (Мороз, Бекбергенов, Афиногенов). Пептон — 20,0 г, агар — 10,0 г, калий серноокислый — 7,0 г, магний хлористый — 15,0 г, магний серноокислый — 1,5 г, цетилпиридиния хлорид — 2,0 г, вода дистиллированная — до 1000,0 мл (рН 6,8-7,0).

Среда с ацетамидом. Агар — 15,0 г, натрий хлористый — 5,0 г, магний серноокислый — 0,2 г, аммоний фосфорнокислый однозамещенный — 1,0 г, калий фосфорнокислый двузамещенный — 1,0 г, ацетамид — 20,0 г, вода дистиллированная — до 1000,0 мл (рН 6,7).

Среда Паллерони—Дудорова. Хлористый аммоний — 1,0 г, магний серноокислый — 0,5 г, железо аммоний цитрат — 0,05 г, хлористый кальций — 0,005 г, 0,33 М Na-K фосфатный буфер (рН 6,8) — до 1000 мл. Первые два ингредиента добавляют к буферному раствору и автоклавируют при 115°C 30 минут. Железа аммонийцитрат и хлористый кальций стерилизуют путем фильтрации и вносят в основной раствор асептически (перед засевом среды).

Картофельно-глицериновая среда. Вырезанные из очищенного картофеля цилиндры диаметром 1 см и длиной 4-5 см разрезают по диагонали для получения клиньев. Клинья выдерживают 2 ч в 1%-ном растворе бикарбоната натрия, после чего подсушивают и в течение 2 суток вымачивают в 5-6%-ной глицериновой воде или бульоне. Опускают основанием вниз в пробирки с 5%-ной глицериновой водой. Для того чтобы картофель не касался глицериновой воды, используют пробирки с перетяжкой в нижней части или в них опускают короткие стеклянные палочки. Среду автоклавируют при 115-120°C 20 минут.

Пробирки со средой хранят в наклонном положении плоской поверхностью картофеля вниз (с целью сохранения поверхности для посева влажной).

Микроорганизмы рода Francisella

Francisella — мелкие кокковидные (до эллипсоидных) при культивировании на подходящей среде, впоследствии плеоморфные палочки; неподвижные, спор не образуют. Строгие аэробы; не растут на обычных средах; расщепляют некоторые углеводы с образованием кислоты, образуют H_2S . Распространены во многих пресноводных водоемах; могут паразитировать у человека, млекопитающих, птиц и членистоногих; род представлен видами *Francisella novicida* (известен один уникальный штамм, выделенный из озерной воды в США) и *Francisella tularensis* (возбудитель туляремии — болезнь Фрэнсиса). Заболевание впервые описано японскими врачами (1837). До открытия Охарой (1925) новой бактерии, названной кокком Охары-Хагч, болезнь не связывали с конкретным возбудителем. Как возбудитель чумоподобной лихорадки земляных белок (*Cytellus beechei*) микроорганизм также выделили Маккой и Чепин (1911) в районе озера Туляре (графство Туляре, штат Калифорния). Позднее была установлена эпидемическая связь заболевания с кровососущими членистоногими (1924), лишь в 1928 г. Фрэнсис доказал идентичность туляремии и болезни Охары. Нозогеографически туляремия принадлежит к распространенным инфекциям, ее регистрируют повсеместно в Северном полушарии (исключая Англию) в ареале между 30° и 70° с. ш. На территории РФ впервые официально выделена данная культура С. Суворовым и др. в 1926 г (Астраханская область). Возбудитель дифференцируют на экологогеографические расы и варианты. Тип А (*Nearctica*) выделяют от многих грызунов и кровососущих насекомых; высоковирулентен для человека и кроликов; ферментирует глицерин, содержит цитруллинуреидазу. Тип распространен в Северной Америке; очень патогенен для человека. Тип В (*Palaearctica*) выделяют из воды и от водных животных; маловирулентен для человека и кроликов; не ферментирует глицерин, не содержит цитруллинуреидазу. Возбудитель регистрируют в Европе и Азии; не ферментирует глицерин, умеренно патогенен для домашних кроликов и человека, вариант *japonica* выделяют в Японии (ферментирует глицерин), вариант *mediasiatica* вызывает заболевания в Средней Азии в дельтах рек Или и Аму-Дарьи (ферментирует глицерин, содержит цитруллинуреидазу; умеренно патогенен для домашних кроликов и человека).

Распространение

Francisella tularensis выделена от многих диких и домашних животных, а также птиц, рыб и земноводных. Основные источники заражения человека — обыкновенные полевки (*Microtus arvalis*), домовые мыши (*Mus musculus*), водяные крысы (*Arvicola terrestris*), ондатры (*Ondatra zibethica*), а также зайцы, особенно русак (*Lepus europaeus*) и беляк (*L. timidus*). Переносчики инфекции — кровососущие членистоногие: иксодовые и гамазовые клещи, блохи, слепни (оленьи мухи), комары, москиты.

На юго-западе США бактерии выделяют из оленьих мух; на северо-западе — из лесных клещей. На востоке США возможными источниками инфекции для человека считают белок-летяг (*Pteromyidae*).

Человек заражается от больных животных, кровососущих членистоногих или объектов внешней среды. Пути заражения: контактный (через кожу и слизистую оболочку глаз), инокулятивный (при укусе переносчика), алиментарный (через ЖКТ) и аспирационный (через дыхательные пути).

Морфология

Клетки *Francisella tularensis* — мелкие (размером 0,1-0,5 мкм), неподвижные капсулированные грамотрицательные палочки с выраженным полиморфизмом (от кокковидных до нитевидных форм), особенно у неарктических видов. В мазках из культур доминируют кокковидные формы, в мазках из органов — коккобактерии, которые возможно слабо воспринимают краситель и окрашиваются бледнее, чем прочие патогенные микроорганизмы, однако бактерии легко воспринимают краску Гимзы; в мазках-отпечатках не дают bipolarной окраски, что отличает их от возбудителя чумы, но в чистой культуре могут окрашиваться биполярно. Размножаются почкованием. Отличий в микроструктуре клеток различных рас не отмечают: у авирулентных штаммов находят массивованное подобие капсулы, у вирулентных — нестойкое слизистое вещество. Клеточная стенка имеет гладкие контуры.

Колонии. На обогащенных агаровых средах колонии *Francisella tularensis* мелкие, в виде капелек беловатого цвета с голубоватым отливом, круглые, с ровным краем, выпуклые и блестящие. При разреженном посеве через несколько суток достигают диаметра 2 мм и более (рост становится заметным с 3-5 суток культивирования). Изолированные колонии удобно получать при посеве на среды О. Емельяновой или Маккоя; используют также агар с переваром сердечной мышцы, дополненный 5% крови барана или кролика. Колонии вирулентных штаммов по морфологии и биологическим свойствам соответствуют S-диссоциатам. На жидких средах размножаются хуже и только у поверхности среды, что связано, по-видимому, с аэрофильностью бактерий; более удовлетворительных результатов достигают аэрацией среды или внесением биокolloидов (яичного желтка, агара и т.д.).

Культуральные свойства

У *Francisella tularensis* оптимальный рост наблюдают только в аэробных условиях; температурный оптимум 36-37°C (пределы 5-43°C). Бактерии культивируют на сложных агаровых или желточных средах с добавлением тканевых экстрактов, цистеина, кроличьей дефибринированной крови и других питательных веществ. Включение в питательную среду полимиксина В или пенициллина подавляет рост других микроорганизмов. Ферментируют до кислоты глюкозу, мальтозу, левулезу и маннозу (американские, среднеазиатские и японские штаммы дополнительно и глицерин), но определить эту способность

можно только на специальных средах с ограниченным содержанием белка и точно определенным рН: наиболее точные результаты ферментации углеводов и спиртов получают манометрией на аппарате Варбурга. Имеют следующие ферменты: каталазу, глутаминазу, аспарагиназу, дез- и трансминазу, цитруллинуреидазу. Индол не образуют, продуцируют аммиак и сероводород, редуцируют некоторые краски, например тионин, метиленовый синий, малахитовый зеленый и др. Работа с кровью, мокротой или аспиратами лимфатических узлов больного связана с большим риском для сотрудников лаборатории и предъявляет особые требования к ее оснащению и квалификации персонала.

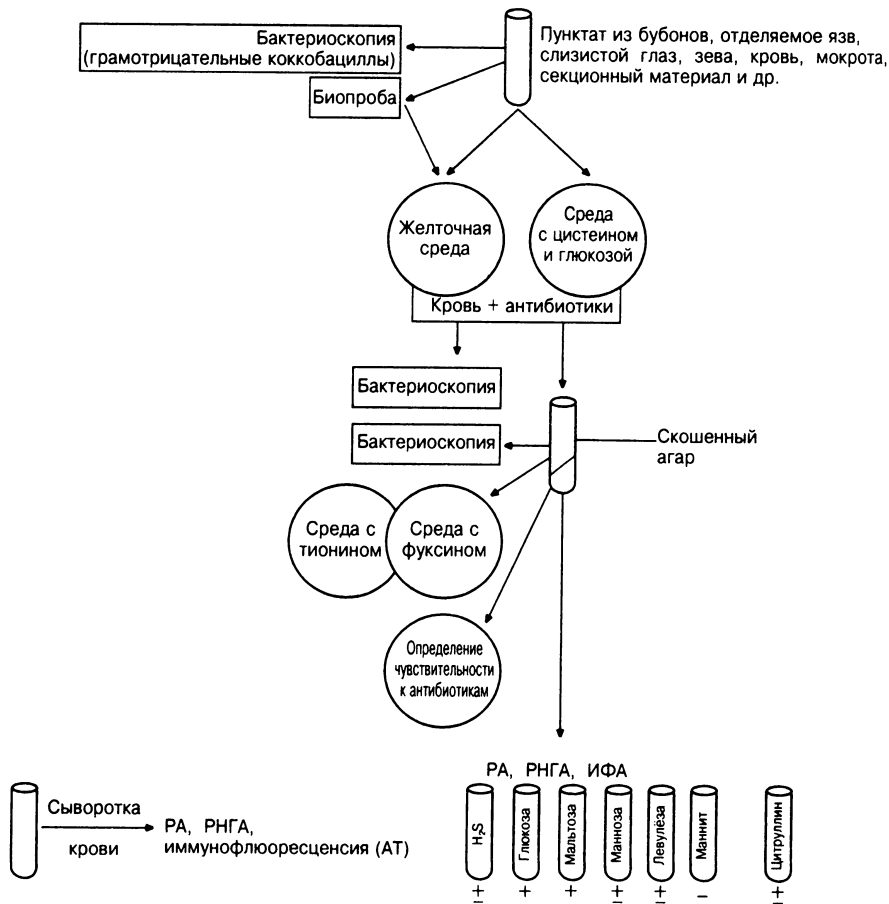
Патогенез

После проникновения возбудителя в организм его дальнейшее распространение происходит, как правило, с током лимфы и реже через кровоток, куда он попадает позднее (что создает угрозу генерализации). Фагоциты активно поглощают *Francisella tularensis*, но они не способны к их внутриклеточному киллингу, что создает предпосылки для депонирования бактерий в лимфатических узлах. Часть возбудителей при этом погибает, что сопровождается выделением эндотоксина, действующего на узел и окружающие ткани. Таким образом, вслед за стадией лимфогенного заноса развивается стадия очаговых реакций, в результате чего формируются туляремийные бубоны. По аналогии с чумой человека последние разделяют на первичные (возникают метастатически лимфогенно и связаны с местом входных ворот) и вторичные, а также на бубоны первого порядка, второго и т.д., учитывая время их появления. Периодически из сформированных очагов возбудитель проникает в лимфо- и кровотоки, что сопровождается выделением новых порций эндотоксина и сенсибилизацией (регистрируют кожными пробами). Прорывы бактерий могут приводить к метастазированию в печень, селезенку, легкие, костный мозг и другие органы, что обуславливает вторичные поражения (например, вторичную пневмонию, менингит и т.д.).

Лабораторная диагностика

Предположительный диагноз основывают на соответствующем анамнезе и клинических проявлениях.

Наиболее достоверные результаты дает **выделение** *Francisella tularensis* (рис. 14), однако культивирование возбудителя сопряжено не только с трудностями, но и с угрозой заражения персонала и разрешено только в лабораториях особо опасных инфекций.



Кожная реакция гиперчувствительности замедленного типа (проба с тулярином)

Рисунок 14. Принципиальная схема бактериологического выделения возбудителя туляремии

При отсутствии возможности выделения возбудителя используют **биологический метод**, основанный на заражении лабораторных животных (мышей или морских свинок) патологическим материалом (пунктат бубона, слизь из зева, гнойное отделяемое слизистой оболочки глаза, кровь и т.д.) с последующей идентификацией микроба агглютинирующей сывороткой. Материал из бубона следует брать до 14-20 суток болезни, из слизистой оболочки глаза — до 17 суток, кровь — до 6 дня заболевания.

Серологические методы. Наличие АТ к *Francisella tularensis* в сыворотке больного определяют в реакции агглютинации с туляремийным диагностикумом; положительной считают видимую глазом реакцию при разведении сыворотки 1:100 и больше (положительные результаты на 1 неделе выявляют у 12,5% больных, на 4 — у 93,2%). Возможна экспресс-диагностика, основанная на идентификации Аг в мазках из очагов поражений АТ, мечеными флюоресцеинами.

Для ранней диагностики эффективна **аллергическая кожная проба**. В качестве Аг используют тулярин — взвесь бактерий, убитых нагреванием до 70°C.

Питательные среды для культивирования франциселл

Пептон-цистеиновый агар. В 1 л дистиллированной воды растворяют 20 г пептона, 10 г натрия хлорида, 1 г глюкозы, 1 г хлористоводородного цистеина. Добавляют 20 г агар-агара. Нагревают до закипания и кипятят 1 минуту. Разливают в чашки, проверяют на стерильность выдерживанием чашек при 37°C 24 ч.

Свернутая желточная среда (МакКой-Чепин). К 20 мл изотонического раствора натрия хлорида рН 7—7,2 добавляют 20 мл аутолизата пивных дрожжей и 60 мл желтка куриных яиц. Перемешивают, разливают в чашки или пробирки и выдерживают 1 ч при 80°C.

Приготовление аутолизата пивных дрожжей. Пивные дрожжи отмывают от суслу водопроводной водой. Сливают в колбу и помещают на 24 ч в водяную баню при 56-58°C. Кипятят 20 минут. Подщелачивают гидроокисью натрия до слабощелочной реакции. К 1 части аутолизата дрожжей добавляют 2 части воды, кипятят 40 минут, фильтруют через бумажный фильтр. Разливают в колбы и стерилизуют при 120°C 30 минут.

Мартеновский дрожжевой агар. К 930 мл мартеновского бульона добавляют 70 мл аутолизата пивных дрожжей, 10 г глюкозы, 1 г цистеина, 0,4 г хлорида калия, 3 г хлорида натрия, 0,1 г натрия бикарбоната, 0,3 г магния сульфата, 0,8 г натрия фосфата двуосновного. Доводят рН смеси раствором гидроокиси натрия до 7,2-7,4. Добавляют 30 г агар-агара, кипятят до его расплавления. Разливают в пробирки и стерилизуют 20 минут при 120°C.

Среда Емельяновой. К 1 л дистиллированной воды добавляют 20 мл гидролизата свежей рыбы, 10 мл гидролизата желатина, 2,5 мл аутолизата пивных дрожжей, 0,5 г натрия хлорида, 1 г глюкозы, 0,1 г цистеина и 2 г агар-агара. Нагревают до расплавления агара. Разливают в колбы и стерилизуют 20 минут при 120°C. Перед употреблением в расплавленную среду добавляют 10% дефибринированной крови кролика и разливают в чашки.

Полужидкая среда Дрожевкиной. К 90 мл стерильного изотонического раствора натрия хлорида рН 7,0-7,2 асептически добавляют 10 мл суспензии

желтка куриных яиц, перемешивают и разливают в пробирки. После проверки на стерильность используют.

Среда Ухалева-Михалевой. К 100 мл основного перевара Хоттингера добавляют 250 мл сычужного пептона, 4 г натрия хлорида и кипятят 3 мин. Устанавливают рН 7,2-7,4, вновь кипятят 3 минуты и фильтруют через бумажный фильтр. К фильтрату добавляют 20 г предварительно замоченного агар-агара и нагревают до его расплавления. Разливают в колбы, стерилизуют 20 минут при 120°C.

Приготовление сычужного пептона. К 400 г свежеприготовленного фарша из обезжиренного сычуга крупного рогатого скота добавляют 1 л 1%-ного раствора соляной кислоты. Встряхивают и оставляют на 2-3 суток при 46-48°C до образования на дне бутылки порошкообразной массы и появления положительной реакции на триптофан. Смесь прогревают 10 минут при 80°C на водяной бане. Отстоявшийся от осадка прозрачный раствор пептона декантируют, добавляют 2% хлороформа. Хранят при 10°C.

Среда Анциферова. К 100 мл расплавленной и охлажденной до 45°C среды Ухалева-Михалевой добавляют 5 мл (3:2) желтка куриных яиц в 0,5% растворе хлорида натрия. Разливают по пробиркам и скашивают при нагревании до 65°C.

Среда Френсиса. К 100 мл мясного настоя добавляют 1 г пептона, 0,5 г натрия хлорида, 1,5-2% агар-агара и нагревают его до расплавления. Вносят 0,1 г цистеина, 1 г глюкозы. Устанавливают рН 7,2-7,4. Стерилизуют при 110°C 30 минут. В расплавленную после стерилизации и охлажденную до 45°C среду добавляют 5-10% дефибрированной крови кролика. Разливают по пробиркам и чашкам.

Микроорганизмы рода Yersinia

Общая характеристика

Род *Yersinia* организован в 1946 году и назван (по предложению ван Логхема) в честь Александра Йерсена. Ранее бактерии данного рода относили к роду *Pasteurella*. Сейчас род *Yersinia* включает микроорганизмы 11 видов (*Y. aldovae*, *Y. bercow*, *Y. enterocolitica*, *Y. fredenksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. mollaretii*, *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. rohdei* и *Y. ruckeri*), типовой вид — *Y. pestis*. С 1954 г бактерии рода *Yersinia* включены в семейство *Enterobacteriaceae*.

Морфология

Наиболее часто клетки иерсинии имеют овоидную форму (коккобациллы), с повышением температуры культивирования (от 37°C) бактерии имеют чаще форму палочек. Окрашиваются грамотрицательно, возможна биполярная окраска (может служить дифференциальным признаком при исследовании на

Y.pestis). Палочки склонны к полиморфизму, образуя в субоптимальных условиях нитевидные, колбовидные или шарообразные (инволюционные) формы (например, на агаре с содержанием поваренной соли). В зависимости от вида (некоторые штаммы *Y. ruckeri* и вид *Y. pestis*) и температуры культивирования они могут быть подвижными и неподвижными споронеобразующими палочками (иногда коккобациллами) размерами 1-3×0,5-0 8 мкм. Бактерии неподвижны при 37°C, но подвижны при выращивании с температурным режимом ниже 30°C (подвижные виды - перитрихи). Некоторые штаммы *Y. ruckeri* и все изоляты *Y. pestis* неподвижны (но броуновское движение очень выражено) и имеют капсулу, а остальные виды – капсульное вещество.

Для *Y. pestis* характерны морфологически обособленный нуклеоид, наиболее хорошо видимый у инволюционных гигантских клеток и отсутствие подвижности.

Виды *Yersinia* образуют серовато-слизистые (S-формы) или шероховатые R-колонии, также выделяют переходные формы. Вирулентные штаммы образуют R-колонии. Микроскопическое изучение колоний *Y. pestis* выявляет колонии двух типов: молодые — микроколонии с неровными краями («битое стекло»), позднее они сливаются, образуя нежные плоские образования с фестончатыми краями («кружевные платочки»), зрелые — крупные с бурым зернистым центром неровными краями («ромашки»). Многие, особенно вирулентные, штаммы *Y. pestis* способны образовывать темный пигмент, восстанавливать красители (янус зеленый, индиго, метиленовый синий) в реакциях дегидрирования. На скошенном агаре через 48 ч при 28° С образуют серовато-белый налет, врастающий в среду. На бульоне через 48 ч образуют нежную пленку на поверхности и хлопьевидный осадок, при выращивании в аэрированном бульоне дают гомогенный рост, также хорошо растут на желатине, не вызывая ее разжижения.

На плотных средах колонии *Y. enterocolitica* мелкие, блестящие, часто выпуклые с голубоватым оттенком в проходящем свете. При культивировании (48 ч при 37°C) на среде Эндо колонии имеют розоватый оттенок. Полиморфизм колоний выражен слабо. При старении у *Y. enterocolitica* часто отмечают сливной рост. Бактерии проявляют пектиназную активность, на пектиновом агаре колонии окружены зоной разжижения. При культивировании на жидких средах микроорганизм вызывает их помутнение. Принято считать, что вирулентные штаммы иерсиний образуют преимущественно R-колонии, но для *Y. enterocolitica* образование шероховатых колоний нехарактерно.

Колонии *Y. pseudotuberculosis* отличают серовато-желтоватый оттенок в проходящем свете и меньшая прозрачность. При культивировании (48 ч при 37°C) на среде Эндо колонии *Y. pseudotuberculosis* остаются бесцветными. Часто образуют R-формы — выпуклые, бугристые, с фестончатой зоной (или без нее), напоминающие колонии *Y. pestis*. При старении колонии увеличиваются в размере и теряют прозрачность. На бульоне диссоциированные культу-

ры *Y. pseudotuberculosis* растут в виде хлопьевидного осадка, оставляя среду прозрачной, а гладкие — вызывают ее равномерное помутнение. Факультативные анаэробы, метаболизм окислительный и бродильный, паразиты человека и животных. Температурный оптимум — 25-28°C; оксидазоотрицательны и каталазоположительны, образование индола варьирует у разных видов, большинство изолятов дает положительную реакцию с метиловым красным и отрицательную реакцию Фогес-Проскауэра при 37°C, но переменную при 25-28°C. Большинство не образует лизиндигидролазу и аргининдекарбоксилазу, но синтезирует орнитиндекарбоксилазу (исключая *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* и *Y. rohdei*). Не образуют H₂S, проявляют уреазную активность (исключая *Y. pestis*, *Y. bercovieri* и *Y. ruckeri*). Хемоорганотрофы; хорошо растут на простых питательных средах, ферментируют большинство углеводов (исключая лактозу) без образования газа, не сбраживают дульцит, эритрит, фукозу, гликоген, инозит, раффинозу, проба с метиленовым синим положительна. Основные признаки видов представлены в табл. 15; при идентификации следует помнить, что иерсинии способны существенно изменять свой метаболизм в зависимости от температуры (табл. 16). Иерсинии широко распространены в природе, некоторые из них — паразиты различных животных (особенно грызунов и птиц) и человека; их также выделяют из почвы, воды и пищевых продуктов. *Y. pestis* вызывает чуму, *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* патогенны для различных животных и иногда для человека, вызывают брыжеечный лимфаденит, хроническую диарею и тяжелые септицемии. *Y. ruckeri* вызывает «болезнь красного рта» у рыб, прочие виды не патогенны; либо вызывают оппортунистические инфекции у человека (табл. 14).

Таблица 14. Непатогенные иерсинии, выделяемые у человека

Вид	Источник выделения
<i>Y. intermedia</i>	Кровь, испражнения, отделяемое глаз, моча, раневое отделяемое, содержимое абсцессов, синовиальная жидкость
<i>Y. frederiksenii</i>	Кровь, испражнения, гнойное отделяемое
<i>Y. kristensenii</i>	Испражнения, отделяемое глаз
<i>Y. rohdei</i>	Испражнения
<i>Y. mollaretii</i>	Испражнения
<i>Y. bercovieri</i>	Испражнения

Таблица 15. Дифференциальные признаки бактерий рода *Yersinia*

Тест или субстрат	<i>Yersinia bercovieri</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Yersinia frederiksenii</i>	<i>Yersinia intermedia</i>	<i>Yersinia kristensenii</i>	<i>Yersinia mollaretii</i>	<i>Yersinia pestis</i>	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>
Образование индола	–	+	+	+	±	–	–	–
Реакция Фогеса-Проскауэра	–	±	±	–	–	–	–	–
Цитрат Симмонса	–	–	+	+	–	–	–	–
Уреазная активность	+	+	+	+	+	+	–*	+
Орнитин декарбоксилаза	+	+	+	+	+	+	–	–
Ферментация мелибиозы	–	–	–	+	–	–	±	+
Ферментация раффинозы	–	–	–	+	–	–	–	±
Ферментация сорбита	+	+	+	+	+	+	–	–
Ферментация сахарозы	+	+	+	+	–	+	–	–
Ферментация рамнозы	–	–	+	+	–	–	–	+
Ферментация муката	+	–	±	±	–	+	–	–

* Возможна положительная реакция у свежевыведенных штаммов.

В данном разделе использованы результаты диссертационной работы Д.А.Померанцева.

Таблица 16. Дифференциальные признаки бактерий рода *Yersinia* в зависимости от температуры культивирования (25-28°C / 37°C)

Тест или субстрат	<i>Y. bercovieri</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Y. frederikseii</i>	<i>Y. intermedia</i>	<i>Y. krislenseii</i>	<i>Y. mollaretii</i>	<i>Y. pestis</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i>
Реакция Фогеса-Проскауэра	-/-	+/-	+/-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Цитрат Симмонса	±/-	-/-	±/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Подвижность	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-
Ферментация мелибиозы	-/-	-/-	-/-	±/+	-/-	-/-	±/-	+/-
Ферментация рафинозы	-/-	-/-	-/±	+/-	-/-	-/-	-/-	±/±
Ферментация рамнозы	+/-	-/-	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-	+/-
Ферментация салицина	-/±	±/±	+/+	+/+	-/±	±/±	±/±	±/±
Ферментация муката	+/-	-/-	±/-	±/-	-/-	+/-	-/-	-/-
Гидролиз эскулина	+/-	±/±	+/-	+/-	-/-	±/-	+/-	+/+
Уреазная активность	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/*	-/-	+/+

Температурные пределы роста иерсиний варьируют от 0 до 39°C (для *Y. pestis* до 45°C); оптимум роста — 28-30°C; температура 37°C — селективная для образования капсулы *Y. pestis*. Границы pH для роста — в пределах 5,8-8,0; оптимум pH — 6,9-7,2. Хорошо растут на простых питательных средах, медленный рост бактерий (до 3 суток) можно ускорить добавлением гемолизированной крови или сульфата натрия (*Y. pseudotuberculosis* практически не растут на среде Плоскирева). Наиболее благоприятная температура для выделения *Y. enterocolitica* — 22-29°C. На средах для изучения подвижности (например, содержащих индол и орнитин) *Y. enterocolitica* неподвижны или малоподвижны при 35°C и подвижны при 25°C.

Антигенная структура

Все виды иерсинии имеют О-Аг (эндотоксин), похожий на Аг многих грамотрицательных бактерий и токсичный для животных и человека. Липополисахаридно-белковые комплексы О-Аг разделяют на основе химических и антигенных характеристик на «гладкие» (S) и «шероховатые» (R); последние — общие для *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis*. Все штаммы *Y. enterocolitica* обладают поверхностным Аг энтеробактерий, общим с представителями семейства. Имеются публикации о наличии у *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* продуктов, напоминающих экзотоксины.

У *Y. pestis* выделяют разнообразные (до конца неисследованные) Аг, роль которых как факторов вирулентности неясна.

Фракция 1 (F1) — капсульный антиген, представлен поверхностным гликопротеиновым Аг. Он предохраняет бактерии от поглощения полиморфно — ядерными лейкоцитами, не оказывает токсического действия, но проявляет иммуногенные свойства.

Активатор плазминогена — протеаза, активирующая лизис фибриновых сгустков, препятствующих диссеминированию возбудителя, и инактивирующая СЗb и С5a компоненты комплемента.

V/W (Vi)-Аг *Y. pestis* состоит из белка (V-фракции) и липопротеина (W-фракции); проявляет антифагоцитарные свойства и способствует внутриклеточному росту бактерий. Штаммы *Y. pestis*, содержащие только V/W-Аг, вирулентны для мышей.

Мышиный токсин представлен белковоподобным веществом, локализованным внутриклеточно; LD₅₀ для мышей — менее 1 мг (также токсичен для крыс), вызывает шок и смерть, эффект — антагонист адренергических рецепторов.

Показана способность *Y. pestis* выделять **бактериоцины** (пестицины I и пестицины II), обладающие иммуногенными свойствами и оказывающими бактерицидное действие на *Y. pseudotuberculosis* и некоторые штаммы *Escherichia coli*.

Чума. *Y. pestis* вызывает чуму (от арабского «джумма») — зооантропоноз, поражающий грызунов (основной природный резервуар) и проявляющийся

спорадическими вспышками или эпидемиями (эпизоотии). Человеку передается через блох, а также контактным, алиментарным и аспирационным путями; также опасны вторично загрязненные объекты и трупы. Эпидемии чумы известны с III в. до н.э., иногда они приобретали характер пандемии. Первая достоверная пандемия 527-565 гг. («юстинианова чума»), начавшаяся в Египте и Эфиопии, привела к огромным потерям среди населения Восточной Римской империи, но самой опустошительной была вторая пандемия чумы в XIV-XV вв., вошедшая в историю под названием «великой» или «черной» смерти и унесшая около 60 миллионов жизней, только в Европе погибло более 25 миллионов человек. Как последствие второй пандемии рассматривают эпидемию чумы в Лондоне (1664-1665 гг.), повлекшую смерть 20% населения. Третья пандемия началась в Гонконге в 1894 г., продолжалась около 20 лет и унесла жизни 10 миллионов человек. В самом ее начале были сделаны важные открытия (выделен возбудитель, доказана роль крыс в эпидемиологии чумы), что позволило организовать профилактику на научной основе. Возбудитель чумы обнаружили Г.Н. Минх (1878) и независимо Иерсин и Китазато (1894). Большой вклад в изучение эпидемиологии чумы внесли исследования Л.М. Исаева и Н.Н. Клодницкого, а также И.И. Мечникова, руководившего работой противочумных отрядов в Астраханской губернии (1911 г.). В 40-х гг. в Северной Африке была отмечена последняя эпидемическая вспышка; тем не менее, с 1958 по 1979 гг. в мире зарегистрировано 47 000 случаев чумы. Последние вспышки были в Индии (вторая половина 90-х гг.).

В эпидемиологическом отношении первое место занимают крысы (как самые распространенные и многочисленные грызуны); основную роль играют три вида — серая крыса-пасюк (*Rattus norvegicus*), черная крыса (*Rattus rattus*) и египетская крыса (*Rattus alexandrinus*); чумные эпизоотии среди крыс обычно предшествуют заболеваниям людей. В степных регионах (где крыс мало) ведущую роль играют суслики, сурки и песчанки; общий список диких грызунов включает около 240 видов и подвидов, не считая синантропных крыс и мышей. При эпизоотиях среди мышей определенная роль в переходе заболевания на людей может принадлежать кошкам. Длительное время господствовало мнение, что чума (городская чума) среди синантропных крыс первична, а в дикой природе (дикая чума) — вторична, однако выявление эндемичных очагов в областях, практически свободных от крыс (например, в провинциях Северной Индии), показало ошибочность подобных воззрений. Группу риска по заболеваемости «дикой» чумой составляют охотники и заготовители животного сырья. Часто «дикая» чума и большинство случаев «городской» чумы протекают в виде бубонных поражений.

В передаче чумы человеку ведущую роль играют взрослые особи крысиных блох (*Xenopsylla cheopis*), пожизненно сохраняющие возбудителя (общий список видов и форм блох, из которых выделяют возбудителя, насчитывает около 100 видов). Повсеместное вытеснение пасюком черной крысы сыграло,

применительно к эпидемиологии чумы, положительную роль. На серых крысах паразитируют блохи *Ceratophilus fasciatus*, живущие преимущественно в норах грызунов, а не в их шерсти и гораздо реже перебирающиеся на человека, чем блохи черных крыс. Показано, что человек заражается не столько при укусе, сколько после втирания в кожу ее фекалий или масс (контаминированных бактериями), срыгиваемых при питании. Установлено, что бактерии, размножающиеся в кишечнике блохи, выделяют коагулазу, способствующую образованию «пробки» (чумной блок), препятствующей поступлению крови в ее организм. Попытки голодного насекомого к кровососанию сопровождаются срыгиванием зараженных масс на поверхность кожи в месте укуса. В жилищах человека блохи также могут переносить заболевание от человека к человеку (рис. 15).



Рисунок 15. Природные резервуары чумы и пути заражения человека

Природные очаги прочно связаны с определенными ландшафтно-климатическими условиями, всем им свойственна определенная засушливость климата, приводящая к развитию биocenozов, характерных для пустынь, полупустынь, степей, саванн и высокогорных лугов. В РФ природные очаги чумы существуют в 14 регионах: на юге Горного Алтая, Туве и Забайкалье, отдельные случаи отмечают в междуречье Волги и Урала, Ставрополя, Прикаспия и на Кавказе. Всемирное распространение заболевания охватывает практически всю Африку, Азию (особенно Юго-Запад) и Южную Америку; в США заболевание зарегистрировано в 15 штатах, а районы к западу от реки Миссисипи считают эндемичными.

Бактерию *Y. enterocolitica* впервые выделили Шляйфштайн и Колмэн (1939), типировав ее как атипичного возбудителя псевдотуберкулеза. С середины 60-х годов появились сообщения о выделении данного микроорганизма от больных людей. Основное поражение, вызываемое *Y. enterocolitica*, — кишечный иерсиниоз — инфекция, сопровождающаяся диареей, энтеритом, псевдоаппендицитом, илеитом, узловой эритемой и (иногда) септициемией или острым арт-

ритом. Ведущий симптом заболевания — гастроэнтерит. Возбудитель широко распространен в природе, его выделяют от насекомых, моллюсков, ракообразных, птиц, грызунов, собак, кошек, домашних сельскохозяйственных животных (основные хозяева). *Y. enterocolitica* можно также обнаружить в воде многих рек и озер. Инфицирование человека происходит, вероятно, фекально-оральным путем. Большую заболеваемость регистрируют в странах с теплым климатом. Точные значения распространенности кишечного иерсиниоза до сих пор не установлены, т.к. высеваемость возбудителя из фекалий при гастроэнтеритах не превышает 0-3%. Подъем заболеваемости отмечают в осенне-зимний сезон. В Европе основной резервуар — свиньи, большинство достоверных случаев заражения связаны с употреблением недостаточно термически обработанной свинины. Большинство случаев, зарегистрированных в Японии, связано с употреблением в пищу рыбы и ракообразных. Среди возбудителей доминирует серотип O3; в Новом Свете до начала 80-х гг. преобладали поражения, вызванные серотипом O8, но в настоящее время отмечают преобладание серотипа O3.

Септицемии обычно регистрируют у лиц с иммунодефицитами, анемиями, нарушениями обмена железа, заболеваниями почек.

Сравнительно редкие осложнения — фарингиты, поражения сердца и печени.

Возбудитель псевдотуберкулеза впервые выделили Малласе и Виньяль (1883), а позднее детально изучили Эберт (1886) и Пфайффер (1886). *Y. pseudotuberculosis* вызывает у человека острый брыжечный аденит или аппендицитоподобный синдром с патологоанатомическими изменениями, сходными с таковыми при туберкулезе; у диких и домашних животных заболевание протекает с системными поражениями. По-видимому, заражение человека *Y. pseudotuberculosis* происходит от инфицированного животного путем, общим для большинства кишечных инфекций. Природный резервуар возбудителя — грызуны, олени, домашние животные и птицы. Заболевания человека наблюдают сравнительно редко. Большая часть случаев зарегистрирована в Европе у подростков; пик заболеваемости — зимние месяцы.

Патогенез

Y. pestis внедряется в организм в месте укуса блохи; в свою очередь блохи инфицируются бактериями, питаясь кровью грызунов в период бактериемии, предшествующей гибели животных (трансовариальная передача возбудителя у блох отсутствует, бактерии погибают при попадании в кишечник личинок). При температуре 28°C (температура тела блохи) *Y. pestis* не образует фракцию I и V/W-Аг. В организме человека возбудитель болезни мигрирует по лимфатическим сосудам в региональные лимфоузлы, где захватывается мононуклеарными клетками. Так как внутриклеточный фагоцитарный киллинг подавляется возбудителем, то начинается его внутриклеточное размножения с развитием воспалительной реакции в лимфоузлах. Размножение бактерий в макро-

фагах лимфоузлов приводит к увеличению последних, слиянию, образованию конгломератов (бубонная форма). На данном этапе бактерии также резистентны к фагоцитозу полиморфно-ядерными лейкоцитами благодаря F1 и из-за нехватки специфических антител. Поэтому-то затем развивается геморрагический некроз лимфоузлов, бактерии получают возможность прорваться в кровоток и внедриться во внутренние органы, что приводит к септической форме.

Возможна легочная форма поражения, при воздушно-капельном пути распространения.

В результате распада микроорганизмов образуются эндотоксины, обуславливающие интоксикацию.

Y. enterocolitica вызывает энтероколит с диареей, лихорадкой и болями в животе. Факторами вирулентности считают адгезины и инвазины, облегчающие взаимодействие с кишечным эпителием, низкомолекулярные протеины, ингибирующие активность бактерицидных факторов и энтеротоксин, аналогичный термостабильным токсинам *E. coli*. Бактерии проникают в слизистую оболочку тонкой кишки, размножаются в пейеровых бляшках и мигрируют в брыжеечные лимфатические узлы. Вирулентность бактерий существенно повышается в присутствии Fe^{2+} . Основной защитный барьер организма, скорее всего, — кислая среда желудка.

Клинические проявления у человека

Чума. Инкубационный период заболевания — 3-6 суток (при эпидемиях или септических формах сокращается до 1-2 дней). Заболевание начинается внезапным подъемом температуры тела с головной болью и чувством разбитости; характерен налет на языке («натертый мелом язык»), его отек, в результате чего речь становится невнятной; в более тяжелых случаях развивается галлюцинаторное состояние. Наиболее часто возбудитель внедряется через кожные покровы, но только в 3-4% случаев отмечают местную реакцию в виде высокоинфекционных пустулы и карбункула (кожная чума). Чаше чумная палочка не вызывает воспалительных изменений кожи и мигрирует в ближайший лимфатический узел. В течение 2-6 дней в лимфатическом узле развивается серозно-геморрагическое воспаление, и формируется резко болезненный бубон. Нередко наблюдают присоединение регионарного бубона к кожной чуме, что дает кожно-бубонную форму чумы. Патогенетически различают первичные (всегда связаны с местом входных ворот инфекции) и вторичные бубоны (возникают лимфогенно). По клиническим проявлениям выделяют преимущественно локальные формы (кожная, кожно-бубонная и бубонная), генерализованные или внутренне-септические формы (первично- и вторичносептическая), внешне диссеминированные формы (первичная и вторичная легочная, кишечная).

Бубонная чума. При данной форме заболевания кардинальный признак — бубон (чаще подмышечный или паховый), ранний признак — ощущение сильной боли в месте будущего бубона (часто больной вынужден принимать неес-

тественные позы). Увеличиваясь до 10 см в диаметре, бубон размягчается, может нагноиться и спонтанно дренироваться. В случае развития геморрагического некроза лимфатического узла и утраты барьерной функции в кровотоки поступает большое количество бактерий, что ведет к вторичной чумной пневмонии и/или генерализованному чумному сепсису. Вторичная легочная чума (как осложнение) составляет 5-10% бубонных поражений и резко утяжеляет состояние больного; регистрируемый иногда (вследствие генерализации) вторичный чумной менингит, как правило, заканчивается смертью больного. Смертность без лечения при бубонной чуме достигает 75%.

Первично-легочная чума — молниеносная и чрезвычайно контагиозная форма чумы; распространяется воздушно-капельным путем и эпидемически наиболее опасна. Больной выделяет с мокротой большое число чумных микробов; при этом объем мокроты может достигать огромных количеств (целыми тазами). Смертность без лечения близка к 100%. Смерть наступает через 2-6 суток после первичного аэрогенного контакта с инфекцией.

Кишечная чума проявляется профузной диареей с обильным выделением крови и слизи, сильными болями в эпигастральной области; обычно заканчивается смертью больного.

Первично-септическая чума характеризуется многочисленными кровоизлияниями в коже и слизистых оболочках; в тяжелых случаях наблюдают массивные кровотечения из почек, кишечника и кровавую рвоту. Генерализация процесса возникает без предшествующих местных явлений, типичны исключительно быстрое диссеминирование возбудителя в организме, массивные интоксикация и бактериемия. Заболевание быстро заканчивается смертью больного.

Кишечный персониоз. Сопутствующая регионарная лимфаденопатия имитирует приступ аппендицита. Диарея обусловлена действием термостабильного энтеротоксина, стимулирующего синтез гуанилатциклазы.

Реактивный артрит. Кишечная инфекция может трансформироваться в септицемию с поражением внутренних органов и тяжелыми артритами; поражения обычно возникают через 1-14 суток от начала болезни. Патогенез суставной патологии связан со способностью компонентов клеточной стенки взаимодействовать с молекулами II класса HLA, образуя суперантигены, что активирует Т-клетки и стимулирует их пролиферацию. Аналогичные механизмы лежат в основе реактивных артритов, вызываемых стафилококками.

Анкилозирующий спондилит. Способность *Y. enterocolitica* вызывать реактивные артриты рассматривается рядом авторов как основание считать их этиологическим агентом ряда форм анкилозирующего спондилита, тем более, что бактерии часто выделяют от подобных больных.

Псевдотуберкулез. *Y. pseudotuberculosis* вызывает энтероколиты. Однако более характерно воспаление брыжеечных лимфатических узлов в илеоце-

кальной области, часто не отличимое от аппендицита. Диссеминация по кровеносным или лимфатическим сосудам наблюдают редко.

Лабораторная диагностика

Наиболее достоверный результат, подтверждающий диагноз, получают выделением иерсиний из патологического материала. Данные бактериологических исследований не менее важны для дифференциальной диагностики заболеваний, протекающих с лихорадкой, лимфаденопатиями и энтероколитами.

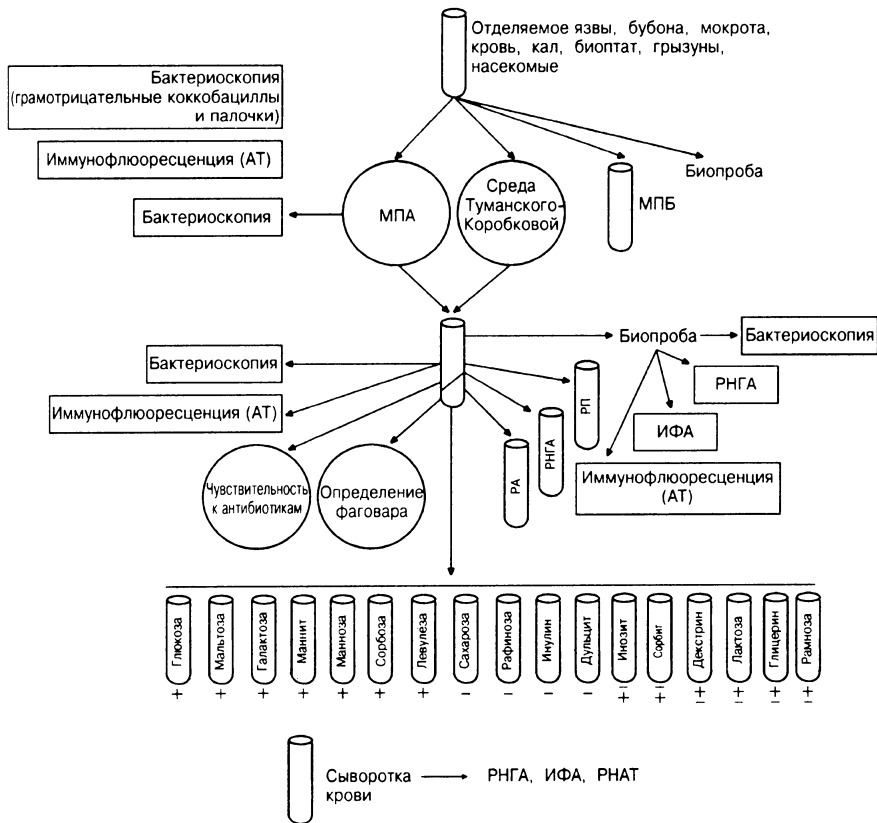


Рисунок 16. Схема бактериологического выделения возбудителя чумы

Исследуемый материал. У больного с подозрением на чуму исследуют отделяемое бубона (при бубонной форме), содержимое язвы или других кожных поражений (кожная форма), мокроту и слизь из зева (легочная форма), кровь (все формы), фекалии и СМЖ (при поражениях кишечника или мозго-

вых оболочек). Материал следует получить до начала антибиотикотерапии. Выделение *Y.pestis* проводят по стандартной схеме (рис. 16).

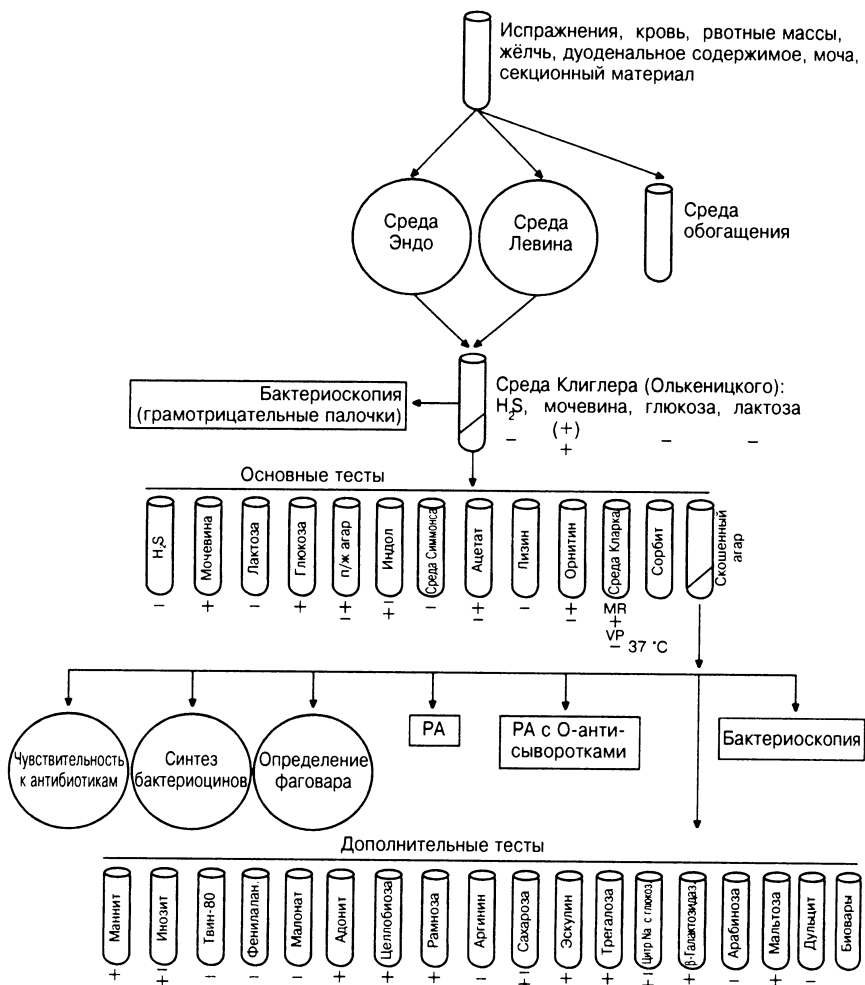


Рисунок 17. Схема бактериологического выделения возбудителя иерсиниозов

Возбудитель кишечного иерсиниоза может быть выделен из крови (*Y. enterocolitica*) и из кала (*Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*) по стандартной (рис. 17) и по оригинальной схеме, предложенной Д.А. Васильевым, Д.А. Померанцевым.

Схема бактериологического выделения и идентификации Yersinia enterocolitica. (Д.А. Васильев, Д.А. Померанцев).

Общие положения.

Иерсиниоз – острое инфекционное заболевание из группы зооантропонозов, характеризующееся полиморфностью клинического проявления, в первую очередь как пищевая инфекция людей с тенденцией к генерализации, септикопиемии, а также поражению различных органов и систем жизнедеятельности у людей и животных.

Иерсиниоз относится к числу широко распространенных в мире инфекций, что обусловлено выраженной адаптационной способностью возбудителя. Исследования последнего десятилетия позволили сформулировать заключение о повсеместном распространении данной инфекции в России.

Так как по международной классификации кишечный иерсиниоз входит в число четырех наиболее распространенных пищевых инфекций, опережая по некоторым показателям сальмонеллез, то основным путем заражения людей являются пищевые продукты, и в частности мясопродукты.

Материалы для исследования

В бактериологическую лабораторию направляют не менее 200 г исследуемого субстрата, упакованного в водонепроницаемую тару и желательно в первые 1-3 часа после отбора. Если время доставки образцов свыше указанного срока, то материал допускается направлять в замороженном виде в термосе со льдом.

Порядок исследования материала

Первый этап (24-48 часов). Изучаемый субстрат (не менее 25 г) измельчают и смешивают со средой накопления – солевой фосфатно-буферный раствор (0,85% NaCl, KH_2PO_4 – 0,45 г, Na_2HPO_4 – 6,34г, H_2O – 1000 мл) с 1% спиртовым раствором генцианвиолета, в соотношении 1:5 (1 часть продукта и 5 частей среды) встряхивают в течение 1 минуты и культивируют при +4°C 24 – 48 часов. Через указанные сроки (24 часа в первую очередь, с дальнейшим сохранением в холодильнике исследуемой суспензии) 1мл полученной бактериальной суспензии смешивают с 5 мл 0,5%-ного раствора КОН (приготовленного по следующей методике: готовят стерильный 40% раствор КОН, из него в пробирку, содержащую 7,9 мл 5% стерильного раствора NaCl, добавляют 0,1 мл) встряхивают и через минуту высевают на селективный агар. Параллельно на селективные среды высевают и со среды накопления, хранящейся в холодильнике, причем посев делают с верхней трети суспензии (но не с поверхности), не взбалтывая среду.

Второй этап. Рост на селективных средах (24-48 часов).

В качестве селективного агара используют несколько сред.

На агаре Эндо рост изучаемых иерсиний – колонии мелкие, гладкие, слегка прозрачные. К 36 часам, удается их детальнее рассмотреть.

Среда Серова дает хорошие результаты: к 36 - 48 часам – колонии интенсивно-красного цвета, матовые, шероховатые, центр выпуклый.

Однако недостаток данной селективной среды — достаточно сложный по структуре состав: глюкоза – 0,5 г, мочевины – 0,5 г, молибденовокислый аммоний – 0,1 г, углекислый натрий безводный – 0,1 г, 30% водный стерильный раствор сухой желчи – 2 мл, 1,6% водный раствор краски конгорот – 0,9 мл, 1,0% водный раствор генцианвиолета – 0,1 мл, сухой питательный агар – 4,5 г, дистиллированная вода – 100 мл.

Среда Иркутского НИИПЧИ (аналог БТС), она выпускается как коммерческая и имеет следующий состав: желчь медицинская 20 мл, раствор NaOH 4% – 10-12 капель, сухой питательный агар – 35 г, глюкоза – 10 г, мочевины 5 г, 1,6% спиртовой раствор бромтимолового синего – 8 мл, дистиллированная вода 1000 мл. В случае трудностей с приобретением ее состав достаточно доступен и она легко готовится в лаборатории. К 1 литру воды добавляют сухой питательный агар, медицинскую желчь, автоклавируют 20 минут при 0,5 атм. После охлаждения до 80°C добавляют глюкозу, мочевины, индикатор бромтимоловый синий и все смешивают. Среда зеленоватого цвета, хранится неделю. Иерсинии, разлагая мочевины, изменяют цвет среды на сине-зеленый, а колонии будут синего цвета. Те микроорганизмы, что не разлагают мочевины, растут в виде желтых колоний. Через 24-48 часов культивирования при температуре 22°C проводят идентификацию выросших колоний. Преимущество среды в том, что выявляется уреазная активность.

Третий этап. Клонирование, выделение чистой культуры (от 48 часов), биохимическая идентификация выделенных штаммов.

Из выделенной по морфологии и окраске колонии берут бакмассу для мазка, окрашивают по Граму. Если при микроскопии наблюдают грамтрицательные, полиморфные палочки, с закругленными краями, без спор и капсул, одиночные, возможно кокковидные, реже овоидные, то оставшуюся бакмассу колонии переносят в МПБ, ресуспендируют, подрачивают при 24-26°C и проводят идентификацию по биохимическим тестам.

При положительной уреазной активности, ферментации глюкозы и отсутствии газообразования в первые 24 часа при 37°C исключают все газообразующие энтеробактерии родов: *Escherichia*, *Edwardsiella*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Hafnia*. Способность ферментировать арабинозу исключает еще два рода – *Proteus*, *Serratia*, отсутствие ферментации инозита исключает род *Klebsiella*. Внутри родовая дифференциация *Yersinia* проводится с использованием следующих биохимических тестов: положительные результаты ферментации сахарозы, целлобиозы, сорбозы, сорбита и отрицательные показатели ферментации рамнозы, мелибиозы, раффинозы при положительном

тесте на уреазу и подвижность при 25°C могут свидетельствовать о принадлежности выделяемой культуры к бактериям вида *Yersinia enterocolitica*.

Внутривидовая дифференциация выделенных культур *Yersinia enterocolitica* делается с целью типирования биовариантов и проводится по следующим тестам: положительные результаты на индол, ксилозу, салицин, трегалозу указывают на принадлежность штаммов к 1 биовару, отрицательные результаты по этим тестам свидетельствуют о принадлежности штаммов к 5 биовару. Штаммы 2 биовара из указанных 4-х тестов дают отрицательные показатели только по салицину. Штаммы 4 биоварианта имеют из данных 4-х тестов положительный результат только по трегалозе. Штаммы 3 биовара дают отрицательные результаты по тестам на салицин и индол и положительные результаты по тестам на ксилозу и трегалозу. Биоварианты 2, 3, 4 являются наиболее патогенными для человека.

При исследовании по третьему этапу проводят одновременно постановку по всем необходимым тестам, что сокращает сроки исследования выделенной культуры.

Оценка результатов бактериологического исследования.

При соответствии полученных результатов по тестированию выделенной культуры с вышеуказанными данными полученный бактериальный штамм определяют как бактериальную культуру вида *Yersinia enterocolitica*.

В случае, если изучаемая бактериальная культура не типруется как бактерии вида *Yersinia enterocolitica*, возможен вариант повторного использования бактериальной суспензии со средой накопления, хранящейся в холодильнике при +4°C.

Оптимальным решением является постановка на исследование не одной пробы исследуемого образца, а целой серии проб.

Общие сроки бактериологического исследования материала - в пределах 7 суток.

Идентификация вида осуществляется биохимическими и серологическими методами.

Для проведения ускоренной диагностики заболевания можно использовать чумной бактериофаг. Бактериофаг *Y. pestis* выделяют из различных источников, включая ткани больного человека и животных, а также блох. Многие авторы связывают естественное быстрое угасание заболевания в очаге с наличием бактериофага. Его высокая специфичность и вирулентность для чумной палочки позволяют применять его для идентификации чумы внесением в исследуемый материал перед посевом либо по увеличению титра бактериофага в среде.

Для быстрого обнаружения также применяют АТ, меченные флюоресцинами (позволяют обнаружить *Y. pestis* в различных объектах в течение первых 2 ч исследования), реакцию нейтрализации АТ, реакцию преципитации в стан-

дартных агаровых пластинках и метод ускоренного роста *Y. pestis* на средах обогащения.

Также разработаны методы, ускоряющие биологическую пробу, например, введение зараженным животным глюкокортикоидов или куриного желтка, что позволяет ускорить диагностику чумы в случаях снижения вирулентности или при применении малой заражающей дозы.

Основные биохимические свойства, дифференцирующие *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*, представлены в таблицах 15 и 16. Дополнительными признаками могут служить результаты реакции Фогеса-Проскауэра: всегда отрицательные у *Y. pseudotuberculosis* и положительные при 22-28°C у *Y. enterocolitica*. В последнее время для выделения *Y. enterocolitica* из фекалий предложена селективная среда, содержащая цефсулодин, иргазан и новобиоцин (CIN-agar).

Питательные среды для культивирования иерсиний

Фосфатно-буферный раствор (ФБР)

Раствор А: K_2HPO_4 – 9,08 г в 1,0 л дистиллированной воды; раствор Б: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 11,87 г в 1 л дистиллированной воды (рН 7,6-7,8). 150 мл раствора А соединить с 850 мл раствора Б. Разлить по 5 мл в пробирки, стерилизовать при 1 атм. в течение 1 часа.

Буферно-казеиново-дрожжевая среда (БКД)

Гидролизат казеина средней степени расщепления – 2,0 мл (Дагестанский НИИ питательных сред); экстракт пекарских дрожжей – 5,0 мл; фосфатно-буферный раствор (рН 7,6-7,8) – до общего объема 1 л. Экстракт пекарских дрожжей: к 500 г дрожжей, предварительно размельченных до гомогенной массы в фарфоровой ступке в малом объеме дистиллированной воды добавить до 1 л дистиллята. Взвесить слить в колбу и кипятить в течение 60 минут на медленном огне при помешивании. Взвесить охладить при 5°C в течение 16-18 часов. Затем надсадочную жидкость слить и профильтровать через широкопористый бумажный фильтр. Приготовленный дрожжевой экстракт разлить во флаконы, простерилизовать под давлением 0,5 атм. 30 минут; хранить при температуре 5-8°C в течение 12 месяцев.

К 0,5 л фосфатно-буферного раствора добавить 2,0 г гидролизата казеина (предварительно подготовленного согласно указаниям на этикетке) и 5,0 мл экстракта дрожжей. Смешать встряхиванием, добавить фосфатно-буферный раствор до общего объема 1 л и проверить рН готовой среды (должен быть 7,6-7,8). Далее смесь разлить в пробирки по 5,0 мл и автоклавировать под давлением 0,5 атм. в течение 20 минут. Среду можно использовать в течение 7-10 суток при хранении в условиях холодильника.

Дифференциально- диагностическая среда Серова

Глюкоза	0,5 г
Мочевина	0,25 г
Молибденовокислый аммоний	0,1 г
Сода безводная	0,1 г
30% водный раствор сухой желчи	2,0 мл
1,6% водный раствор конго-рот	0,8 мл
1% водный раствор генцианвиолета	0,1 мл
Сухой агар	3,5 г
Дистиллированная вода	100,0 мл

Конго-рот и генцианвиолет растворить в горячей дистиллированной воде. Раствор сухой желчи готовить в стерильной воде.

Указанные ингредиенты вносить в дистиллированную воду, нагревать и кипятить 5 минут при помешивании, разлить в чашки Петри. Цвет среды темно-вишневый, рН — 7,2-7,4. Среду можно хранить в течение недели в холодильнике.

Среда с индикатором бромтимоловым синим (БТС)

Желчь медицинская	20 мл
Раствор NaOH 4%	10-12 капель
Сухой питательный агар	35 г
Глюкоза	10 г
Мочевина	5 г
1,6% спиртовой раствор с индикатором бромтимоловым синим	8 мл
Дистиллированная вода	1 л

К 1 л воды добавить сухой питательный агар, медицинскую желчь и автоклавировать 20 минут при 0,5 атм. После охлаждения до 80°C добавить глюкозу, мочевины, индикатор бромтимоловый синий, смешать и сразу разлить в стерильные чашки Петри, рН – 7,8. Хранить среду при температуре 5-8°C в течение недели.

Универсальный скошенный столбик

Агар сухой питательный	3,5 г
Лактоза	0,4 г
Глюкоза	0,08 г
Крахмал растворимый	0,05 г
Сахароза	1,5 г
Мочевина	0,25 г
Уксуснокислый свинец	0,3-0,04 г
Тиосульфат натрия	0,03 г
Цистин	0,003 г

1% феноловокрасный водорастворимый	2,5 мл
Дистиллированная вода	100 мл

Ингредиенты вносить в любом порядке. Количество питательного агара, вносимого в среду, зависит от его серии. Если на этикетке указано, что на 100 мл воды его надо брать 5 г, то в среду добавляют 3,5 г, если на этикетке имеется рекомендация 3,5 г на 100 мл, то добавляют 2,5 г. Среду кипятить в течение 10-15 минут, разливать в стерильные пробирки по 5 мл, автоклавировать при 0,5 атм. 15 минут, после чего скашивать. Цвет среды абрикосовый.

Щелочной раствор

Раствор А – калия гидроокись 400 г; вода дистиллированная до 1 л. Раствор В – натрия хлорид 5,0 г; вода дистиллированная до 1 л. Оба раствора приготовить отдельно и хранить в условиях холодильника. Перед началом работы приготовить рабочий раствор, смешивая 9,7 мл раствора В и 0,13 мл раствора А. Щелочной раствор должен быть прозрачным.

Среда Кларка для аутоагглютинации

Двузамещенный фосфат калия	5,0 г
Пептон	7,0 г
Глюкоза	5,0 г
Вода	до 1 л

Пептон и фосфат калия растворить в воде и кипятить 2-5 минут. После удаления осадка среду стерилизовать при 120°C в течение 20 минут, асептично добавить стерильный раствор глюкозы и разлить по 3-4 мл в пробирки.

Микроорганизмы рода Pasteurella

Pasteurella — род паразитических бактерий, вызывающих поражения у млекопитающих и птиц. Пастереллезы (геморрагическая септицемия) - инфекционная болезнь многих видов сельскохозяйственных животных, птиц и людей. Она характеризуется явлениями септицемии и воспалительно-геморрагическими процессами во внутренних органах, на серозных и слизистых оболочках. Родовое название, по предложению Trevisan дано в честь Луи Пастера, установившего их патогенность. Микроорганизмы впервые были обнаружены при холере кур (Perroncito, Semmer, 1878). Выделены и обстоятельно изучены Pasteur (1880). Позднее данный возбудитель был выделен при септицемии кроликов (Gaffks, 1881), Боллинггевской повальной болезни диких животных (Kitt, 1883), септицемии свиней (Loeffler, 1886), септической плевропневмонии телят (Poels, 1886), повальной болезни буйволов (Orste, Armani, 1887), септицемии овец (Galtier, 1889). *P. multocida* выделена из пищеварительного или респираторного тракта домашних кошек, собак, мышей, крыс, кроликов, северных оленей, лошадей, обезьян, львов, пантер, волков, опоссумов.

Под названием *Pasteurella multocida* в 1939 г. Rosenbush, Merchant объединили возбудителей куриной холеры и септицемии КРС. Тем самым они узаконили точку зрения Kitt (1885) и Ньерре (1886) о родстве этих микроорганизмов. Микроорганизмы данного рода объединены в 14 видов и представлены короткими овоидными палочками. Неподвижны, не образуют эндоспор; при окраске по Романовскому-Гимзе или метиленовым синим дают биполярное окрашивание (особенно в препаратах из живых инфицированных тканей); в мазках расположены одиночно, реже — парами или короткими цепочками. Хемоорганотрофы; лучше растут на средах, содержащих кровь; метаболизм бродильный; углеводы ферментируют с образованием кислоты; восстанавливают нитраты. Каталазоположительны, почти всегда оксидазоположительны, желатиназоотрицательны; реакции с метиленовым красным и Фогеса-Проскауэра отрицательны. Аэробы (факультативные анаэробы); температурный оптимум 37°C. Род включает много видов, основные из которых — *P. multocida* с подвидами (*multocida*, *septica* и *gallicida*), *P. dagmatis*, *P. gallinarum*, *P. canis*, *P. stomatis*, *P. anatis*, *P. langaa*, *P. avium*, *P. aerogenes*, *P. haemolytica*, *P. pneumotropica* и *P. volantium*. Типовой вид — *P. multocida*. Систематику рода нельзя считать законченной; на основании изучения ДНК-гомологии *P. aerogenes*, *P. haemolytica*, *P. ureae* и *P. pneumotropica* оказались близки к бактериям рода *Actinobacillus* и частично включены в его состав (*P. ureae*). Дифференциальные признаки некоторых видов рода *Pasteurella* даны в табл. 17. Часто входят в состав микрофлоры дыхательных путей и глотки многих животных и птиц. При неблагоприятных условиях (обычно на фоне стресса) *P. multocida* способна вызывать пневмонии и сепсис у животных (заболевания известны как транспортная лихорадка и куриная холера, гемморрагическая септицемия). *P. haemolytica* – возбудитель септицемии ягнят и пневмонии КРС и овец. Заболевания человека до настоящего времени слабо изучены.

Морфология и культуральные свойства

Пастереллы — мелкие грамотрицательные коккобациллы (0,3-1,4×0,25-0,4 мкм); у *P. multocida*, *P. haemolytica* и иногда у *P. pneumotropica* выявляют капсулу. На этапах выделения предпочтительно использовать кровяные или сывороточные среды; вторичные генерации хорошо растут на обычных бактериологических средах. На твердых средах образуют мелкие, серые, иризирующие (радужные) при боковом освещении колонии (на момент выделения обычно S-формы); на жидких дают гомогенное помутнение и иногда осадок (на пептонной воде растут плохо).

Распространение

Первый случай выделения пастерелл у человека был описан в 1913 г. P. Brugnatelli, который выделил бактерию, похожую на *P. multocida*. Однако

современные бактериологи не относят данный микроорганизм к указанному роду, т.к. возбудитель был подвижен и устойчив к желчи.

Таблица 17. Дифференциальные признаки основных патогенных для человека видов *Pasteurella*

Признаки	<i>P. multocida</i>			<i>P. pneumotropica</i>	<i>P. haemolytica</i>
	<i>multocida</i>	<i>septica</i>	<i>gallicida</i>		
Оксидаза	+	+	+	+	+
β-Галактозидаза (тест с ONPG)*	–	–	–	+	±
Индол	+	±	+	+	–
Уреаза	–	–	–	+	–
Образование H ₂ S	+	+	+	+	±
Орнитиндекарбоксилаза	+	±	+	±	±
Ферментация					
- сорбита	–	+	+	–	+
- маннита	+	±	+	–	±
- трегалозы	+	±	–	+	±
- ксилозы	+	±	+	±	+
- лактозы	–	–	–	±	±
Гемолиз**	–	–	–	–	+
Рост на агаре МакКонки	±	±	±	–	+

* ONPG — о-нитрофенил-β-D-галактопиранозид

** На агаре с овечьей кровью

В 1930 году Karel и Holm описали болезнь человека, вызванную *P. multocida* – в результате укуса кошки. С тех пор в мировой медицинской практике данная инфекция регистрируется постоянно во все возрастающем количестве. Не вызывает сомнения, что источником болезни человека являются животные. Пути передачи инфекции достаточно разнообразны и, в первую очередь, через раны, полученные от животных. Черкасский Б.Д. (1983) считает возможным трансмиссивный путь передачи возбудителя. Лебедев с соавт. (1971) сообщил о заболевании пастереллезом, вызванном алиментарным путем, связанным с обсеменением грызунами пищевых продуктов. Случаи передачи инфекции от человека к человеку не описаны. В связи с тем, что заболевание передается от животных, оно носит профессиональный характер.

Smith J.E. (1959) выделил *P. multocida* у 2-х из 71 студентов ветеринарного колледжа, Jones J. (1973) получил ее от 2-х из 100 обследованных фермеров. Ранения и укусы животных – одна из основных причин распространения пастереллеза среди людей. По данным органов здравоохранения США, в этой стране ежегодно происходит регистрация 0,5-1,0 млн. людей, укушенных жи-

вотными. Эта цифра соответствует примерно 1% от их общего реального количества. Укусы собак составляет 75-94% от всех укусов животных, укусы кошек 8-15% (Douglas, 1975; Scacella, 1969). Учитывая, что у 50-66% собак и 70-90% кошек являющихся клинически здоровыми, выделяют *P.multocida* из оральных и носовых истечении (Bailie et al., 1978; Owen et. al., 1968; Sathir, Carter, 1976; Smith, 1958) то надо признать, что степень инфицированности людей данные возбудителем достигает больших цифр.

Пастереллоносительство зарегистрировано у таких распространенных животных, как свиньи – до 51% (Smith, 1958) и крысы – 14% (Schlpper, 1947). В неблагополучных птицеводческих хозяйствах оно достигает 95%. среди кроликов до 75% поголовья (Черкасский, 1983).

По данным Olsen A.M. et al. (1952), *P.multocida*. при благоприятных условиях остается жизнеспособной в воде до 25 дней, в почве – 21 день. В трупах птиц микроорганизм сохраняется до 2-х месяцев. Е.В. Кожевников (1975) указывает, что в замороженном трупe птицы возбудитель сохраняется годами. Hubbert W.T., Rosen M.N. (1970) сообщают о сезонности в возникновении болезни. По данным авторов, максимум случаев пастереллеза животных приходится на июль-сентябрь и январь-март месяцы (до 34 и 27% соответственно). Столь широкое распространение возбудителя создает возможность высокого процента перезаражения людей.

Данный микроорганизм вызывает разнообразную клиническую картину болезни человека. Ниже приведены различные формы течения пастереллезной инфекции, которые сформированы в три группы (информация приводится по данным Arons et al., 1982; Atin., Beethan, 1957; BezJak, Mlimica, 1979; Bouse, 1979; Ewing et al., 1980; Freigang, Elliot, 1963; Furie et al., 1980).

К первой группе клинической картины пастереллеза относятся раневые инфекции, вызванные *P.multocida*. Они обычно характеризуются быстрым развитием и сильной воспалительной реакцией. По данным вышеуказанного автора, у 60% больных симптомы появляются в течение 24-48 часов и характеризуются наличием местной эритемы, опуханием, болезненностью. Возможно гнойное выделение. Болезнь может сопровождаться лихорадкой, головными болями, сонливостью (Томеску и др., 1982). Самыми частыми осложнениями бывает образование абсцессов. Возможны и септический артрит вблизи места укуса, остеомиелит, возникающий в результате инокуляции. Часто встречается комбинация двух этих форм на пальце или руке после укуса.

Иногда *P.multocida* выделяют в комплексе с другими микроорганизмами, характерными для пролежней или стаза (Coodman, 1960; Holloway, 1965; Hubbert, 1970).

Ко второй группе относятся болезни, связанные с респираторной и оральной системами. Необходимо отметить, что респираторный тракт является вторым по обширности источником выделения *P.multocida* после ран от укусов животных. Обнаруженные в органах дыхательной системы у больных, стра-

дающих легочными болезнями, пастереллы чаще всего являются *P. multocida*. Однако не исключена возможность серьезного заболевания респираторного тракта, при которых данный возбудитель является этиологическим агентом. Это относится, в первую очередь, к наиболее часто встречаемым бронхиту и пневмонии (Ewan, 1955; Holloway et al., 1965; Mulder, 1938; Psen et al., 1952; Beyt et al., 1979; Calverly et al., 1981; Ellis, 1967; Freigang et al., 1963 и др.).

К данной группе относятся: отит (Holloway et al., 1965), тонзиллит (Hubbaert et al., 1970), эпиема (Bailie, 1957; Bridie, 1960; Nelson, 1981).

Для бронхита пастереллезной этиологии характерно образование колоний на бронхиальном дереве больного. Наиболее предрасполагающим состоянием является расширение бронхов (Cawson et al., 1955; Ete Boer et al., 1963; Morris et al., 1952 и др.), известны случаи, когда *P. multocida* в качестве сапрофита находилась в организме больных до 14 лет (Beyt et al., 1976; Cawson et al., 1955 и т.д.).

При пневмонии, вызванной *P. multocida*, симптомы характерны для этой болезни различной этиологии.

К третьей группе относятся оставшиеся системные заболевания, при которых данный микроорганизм является патогенным агентом. Сюда входят: менингит, абсцессы мозга, бактеримия, бактериальный перитонит, внутрибрюшинный абсцесс.

Таким образом, пастереллезная инфекция представляет значительную угрозу для здоровья людей. Приведенные факты связаны с возбудителем *P. multocida*. Однако все выше сказанное не исключает наличия в качестве этиологического агента представителей других видов рода *Pasteurella*. Об этом свидетельствуют появившиеся сообщения. Yagupsku P. et al. (1985) выделил из спинномозговой жидкости и крови пациента, страдающего гнойным менингитом, *P. ureae*. Авторы пришли к выводу, что указанный микроорганизм способен вызвать генерализованную инфекцию у больных алкоголизмом и истощенных лиц. Gadberg J.L. et al. (1984) впервые описал случай костной и суставной инфекции человека, обусловленной *P. pneumotropica*.

В связи с этими данными возникают дополнительные проблемы, связанные с разработкой методов быстрой идентификации пастерелл различных видов. Вполне вероятно, что сложность их диагностики не позволяет расширить описываемую картину пастереллезной инфекции. Во всех случаях диагностика пастереллеза достаточно сложная. Она основана только на выделении чистой культуры и идентификации ее по бактериологическим тестам.

Weder D., Wolfson J. отмечают, что при первичной микроскопии пастереллезную папочку обнаруживают в мазках спинномозговой жидкости в 80% случаев, в суставной жидкости в 50% случаев, в плевральной жидкости больных в 20% случаев. При использовании коммерческих систем тестирования API Mistek, Oci/Ferm идентифицировали только 68%, 11% и 81% тестированных изолятов соответственно.

К настоящему времени становится ясно, что пастереллы следует включить в ряд бактерий, являющихся возможными этиологическими агентами тяжелых инфекционных болезней.

По классификации экспертов ВОЗ пастреллезы относятся к III и IV (из 7) группам повышенного риска. Данные группы определяют круг лиц, у которых больше всего шансов заболеть указанной инфекцией. К группе III (полевые работники) относятся люди, работающие на природе с дикими животными: лесники, охотники, рыбаки, натуралисты, экологи-исследователи, топографы, геологи, строительные рабочие (дамбы, шоссе, трубопроводы), а также туристы.

В группу IV (группа «досуга») включают лиц, имеющих контакт с комнатными или дикими животными в городских условиях: продавцы, владельцы животных и члены их семей и гости, а также работники зоопарков, заповедников, заказников и их посетители, ветеринары.

Патогенез

Фактором патогенности можно считать капсулу бактерий, защищающую их от действия микробицидного потенциала фагоцитов. Как фактор вирулентности рассматривают способность пастерелл связывать и утилизировать ионы Fe^{2+} .

Лабораторная диагностика

Основана на выделении и индикации возбудителя. В мазках из клинического материала выявляют грамтрицательные мелкие палочки, часто окрашивающиеся биполярно.

Хорошо растут на КА; колонии 1-2 мм в диаметре; большинство видов не проявляет гемолитической активности, но может вызвать окрашивание среды в зеленый или коричневый цвет. Колонии отличаются затхлым запахом плесени.

Питательные среды для культивирования пастерелл

Пригодны общепринятые плотные и жидкие питательные среды, однако при выделении из патологического материала следует применять среды, обогащенные кровью, сывороткой крови, дрожжевым экстрактом.

Идентификация *P. multocida* сероварианта А с использованием гиалуронидазы стафилококка.

Метод основан на способности гиалуронидазы, выделяемой стафилококком, деполимеризовать капсулу *P. multocida* сероварианта А, состоящую из гиалуроновой кислоты.

На поверхность агара Хоттингера в чашке Петри штрихом высевают точную бульонную культуру *P. multocida*. После этого перпендикулярно линии

ям посева по всему диаметру чашки петлей высевают суточную бульонную культуру *Staphylococcus aureus*. Чашки с посевами инкубируют при 37°C с периодическим просмотром в течение 24 ч. Дедолимеризирующее действие гиалуронидазы проявляется уменьшением размера колоний пастерелл и примыкающих к линии роста стафилококков. При просмотре чашек в косопроходящем свете колонии *P. multocida* сероварианта А, находящиеся в непосредственной близости от линии роста стафилококка, тусклые, серого или голубого цвета, в то время как остальные колонии — яркие, флюоресцирующие. У колоний, образуемых другими серовариантами (В, D, E), изменений в размерах и окраске не наблюдается.

Идентификация *P. multocida* сероварианта D с использованием акрифлавина.

Испытуемую культуру высевают на агар Хоттингера с 10% крови быка или барана и инкубируют при 37°C 24 ч, затем пересевают в пробирки, содержащие 3 мл бульона Хоттингера. Инкубируют при 37°C 18-24 ч. Бульонные культуры переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют в режиме, обеспечивающем осаждение бактериальных клеток. После центрифугирования 2,5 мл надосадочной жидкости сливают, а в оставшейся ресуспендируют осевшие клетки и добавляют 0,5 мл свежеприготовленного водного раствора (1:1000 - 1:500) нейтрального акрифлавина (синий триафлавин, флавакридин, флаван). Перемешивают и оставляют при комнатной температуре.

Если испытуемая культура относится к сероварианту D, то в течение 10-20 минут образуется крупнохлопчатый осадок. Штаммы других серовариантов (А, В, E) в осадок не выпадают и сохраняют стабильность суспензии в течение длительного времени (от нескольких часов до суток и более).

Микроорганизмы рода Brucella

Brucella — бактерии, представляют собой мелкие (0,5-0,7×0,6-1,5 мкм) неподвижные палочки или коккобациллы. В мазках обычно расположены одиночно, реже парами, короткими цепочками, небольшими группами. Легко окрашиваются анилиновыми красителями, грамотрицательны. Полноценного биполярного окрашивания обычно не обнаруживают. Настоящих капсул не имеют, спор не образуют. Неподвижны, жгутиков не образуют.

Хемоорганотрофы, метаболизм дыхательный; для роста необходимы тиамин, ниацин и биотин; рост часто стимулирует внесение пантотената кальция. Восстанавливают нитраты (исключая *Brucella ovis*); каталазоположительны и обычно оксидазоположительны, цитрат не утилизируют; индол не образуют; реакции с метиловым красным и Фогеса-Проскауэра отрицательные. Строгие аэробы (некоторые нуждаются в увеличении концентрации CO₂ до 5-10%); растут в пределах 20-40°C (оптимальная температура 37°C); оптимум pH 6,6-7,4. Факультативные внутриклеточные паразиты; человек заболевает при не-

посредственном контакте с больным животным (доярки, скотники), а также при употреблении в пищу зараженных продуктов.

Патогенные для человека *Brucella abortus* (палочка Банга), *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis* и их биотипы вызывают бруцеллез (также известен как ундулирующая, средиземноморская, мальтийская лихорадка или болезнь Банга). Заболевание описывал еще Гиппократ, но как самостоятельную нозоединицу его предложил выделить Мерстон в 1860 г. Возбудитель бруцеллеза был открыт и выделен английским медицинским врачом Брюсом (1886,1887) из селезенки погибшего от этой инфекции солдата из гарнизона на Мальте и позднее назван *Brucella melitensis*. В 1904-1907 гг. Заммитом была установлена теснейшая связь инфекции людей и потреблением козьего молока и выявлено, что козы и козье молоко являются источником и резервуаром инфекции для людей. В 1897 датские ветеринарные врачи Банг и Стриболт из околоплодной жидкости коровы выделили второй вид - *Brucella abortus* (палочка Банга). В 1914 г. Траумом, а затем в 1916 г. Гудом и Смитом выделен возбудитель инфекционного аборта свиней, названный позднее - *B. suis*. В 1918 году американская исследовательница Ивенс, изучив биологические и серологические свойства всех трех культур, установила их большое сходство. Результаты этих наблюдений были подтверждены Майером и Фезье (1920), которые и предложили объединить данные микроорганизмы в одну группу.

Распространение

Резервуар и источник инфекции — домашние животные (овцы, козы, коровы, свиньи, реже собаки). Человек — вторичный хозяин; заболевания людей, исключая случаи лабораторного заражения, возникают на фоне эпизоотии. Бактерии передаются от животного к животным и человеку через контакт с зараженными фекалиями, мочой, молоком и мясом. Как правило, каждый из патогенных для человека видов бруцелл избирательно инфицирует специфических животных; *Brucella abortus* чаще вызывает бруцеллез у крупного рогатого скота (болезнь Банга), *B. melitensis* — у коз и овец (иногда кур), *B. suis* — у свиней. Резервуар отдельных биотипов последнего вида — также зайцы, а в районах Крайнего Севера РФ, на Аляске (США), северо-западных территориях и Юконе (Канада) источником заражения могут быть северные олени (карибу).

В США и РФ заболеваемость людей бруцеллезом носит, прежде всего, профессиональный характер. Возбудитель внедряется в организм человека через поврежденную кожу, слизистую оболочку дыхательных путей и ЖКТ, конъюнктиву. Контактный путь заражения более характерен для овечьего и свиного бруцеллеза.

В странах, где отсутствует массовая пастеризация молочных продуктов, бруцеллез более распространен. Например, в Испании ежегодно регистрировали около 100000 случаев бруцеллеза. Большинство из них вызвано употреблением в пищу зараженных молока и сыра.

Морфология

Клетки отличаются выраженным полиморфизмом: в одном препарате наблюдаются кокки и удлинённые палочки (особенно в молодых культурах). Клетки *Brucella melitensis* чаще представлены кокковидными формами, *B. abortus* и *B. suis* — палочками с закруглёнными концами. Возможно наличие капсул у некоторых видов, выявляемых при культивировании на среде Дорсе, на средах, содержащих 10% иммунной сыворотки барана или лошади, а также при выращивании на куриных эмбрионах. Капсульные культуры можно получить и при воздействии специфическим бактериофагом.

Колонии видов *Brucella* мелкие, выпуклые и гладкие, мутноватые, с перламутровым оттенком (S-формы); первые генерации при посеве из органов развиваются довольно медленно (2 недели и больше), при пересевах лабораторных культур обычно достаточно 2-5 суток. В процессе диссоциации образуют шероховатые R-колонии. Нуждаются в сложных, обогащенных средах содержащих несколько аминокислот, тиамин, никотинамид и ионы магния. *Brucella abortus* дает оптимальный рост в атмосфере, содержащей 5-10% CO₂. Рост бруцелл стимулирует внесение в питательную среду 5% глицерина или сыворотки. Сыворотка и кровь стимулируют рост, но гемин (X-фактор) и НАД (У-фактор) влияния на рост не оказывают. Для выращивания обычно применяют триптозный, триптозо-казеиново-соевый и кровяной (5% овечьей крови) агар; оптимальная среда для культивирования — печеночный агар Хеддлсона. При выращивании для проверки диссоциации культур применяют 1% декстрозный агар с добавлением 2% глицерина (можно дополнить внесением 5% сыворотки).

Антигенный состав

Различные виды бруцелл практически неразличимы в реакциях простой перекрестной агглютинации, что впервые установила Ивенс (1918). Поверхностные Аг бруцелл дифференцируют истощением агглютининов по Кастелгани. Серологические свойства бактерий представлены в табл. 18.

Два главных поверхностных Аг, А и М, имеют количественные видовые различия; соотношение для *Brucella melitensis* составляет 1:20, для *B. abortus* и *B. suis* — 2:1. Для их идентификации применяют соответствующие антисыворотки.

Третий поверхностный Аг — термолабильный L-Аг, имеющий сходство с Vi-Аг сальмонелл.

Шероховатые формы содержат специфический R-Аг; для его идентификации применяют специфические антисыворотки, используемые при серотипировании бруцелл.

Таблица 18. Дифференциальные серологические признаки рода *Brucella*

Вид и биотип	Агглютинация антисывороткой		
	А-моноспецифическая	М-моноспецифическая	Анти-R (антишероховатая)
<i>B. melitensis</i> :			
1	–	+	–
2	+	–	–
3	+	+	–
<i>B. abortus</i> :			
1	+	–	–
2	+	–	–
3	+	–	–
4	–	+	–
5	–	+	–
6	+	–	–
7	+	+	–
8	–	+	–
9	–	+	–
<i>B. suis</i> :			
1	+	–	–
2	+	–	–
3	+	–	–
4	+	+	–
<i>B. neotomae</i>	+	–	–
<i>B. ovis</i>	–	–	+
<i>B. canis</i>	–	–	+

Биохимические характеристики

Бруцеллы ферментируют углеводы, однако образования кислоты или газа обычно недостаточно для идентификации. Для дифференциации используют способность некоторых биотипов вырабатывать сероводород, а также чувствительность к бактериостатическому действию красителей — основного фуксина и тионина (табл. 19).

Таблица 19. Некоторые дифференциальные признаки рода *Brucella*

Признак	B. melitensis			B. abortus									B. suis				B. neotomae	B. ovis	B. canis
	1	2	3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4			
<i>Субстраты, метаболизируемые окислением</i>																			
<i>Аминокислоты:</i>																			
L-аланин	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-	±	-	±	±	±
L-аспарагин	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	±	-	-	+	+	-
L-глутамат	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	±	±	+	+	+
<i>Субстраты цикла мочевины:</i>																			
DL-орнитин	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+
DL-цитруллин	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+
L-аргинин	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+
L-лизин	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+
<i>Углеводы:</i>																			
L-арабиноза	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	±
D-галактоза	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-	+	-	±
D-рибоза	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-	+
D-глюкоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
i-эритритол	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	±
Потребность первых генераций в CO ₂	-	-	-	±	+	±	±	-	-	-	+	±	-	-	-	-	-	+	-
Образование H ₂ S	-	-	-	+	+	+	+	-	±	±	-	+	+	-	-	-	±	-	-
<i>Бактериостатическое действие красителей:</i>																			
<i>Основной фуксин</i>																			
1:50000	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	—	+	-
1:100000	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-
<i>Тионин</i>																			
1:25000	—	—	—	—	—	+	-	-	—	-	—	—	+	—	—	—	-	+	+
1:50000	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	^	+	+	+	+	+	-	+	+
1:100000	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Чувствит. к фагу «Тб»	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

Патогенез

Пути заражения: контактный, алиментарный и аспирационный. Принимая во внимание губительное действие желудочного сока на бруцелл, можно полагать, что при алиментарном заражении возбудитель инвазирует через верхние отделы ЖКТ. Из первоначальных ворот бруцеллы диссеминируют по лимфатическим путям и депонируются в лимфатических узлах.

В первые 5-10 суток бактерии размножаются в макрофагах регионарных лимфатических узлов (миндалины, заглоточные, подчелюстные, язычные, шейные узлы и лимфоидная ткань подвздошно-слепкишечного отдела кишечника), несмотря на то, что последние способны к частичному внутриклеточному их уничтожению (при малых дозах заражения способны полностью элиминировать возбудитель). Показано, что бруцеллы выделяют низкомолекулярные продукты, ингибирующие фагосомо-лизосомальное слияние. Морфологически отмечают диффузную пролиферацию и гиперплазию элементов ретикулэндотелиальной системы. К 20 суткам начинается процесс формирования гранулем, представленных крупными эпителиоидными клетками.

Из разрушенных макрофагов бруцеллы попадают в кровоток, что приводит к инфицированию печени, селезенки, почек, костного мозга, эндокарда (нельзя исключить и того, что возбудитель может сразу захватываться фагоцитами крови в месте внедрения и гематогенно диссеминировать). В пораженных органах находят очаги некроза, окруженные инфильтратами.

В дальнейшем бактерии могут попасть в молочные железы и появиться в молоке.

При зоонозах, вызванных бруцеллами, инфицирование плаценты и тканей плода животных приводит к абортam, тогда как при бруцеллезе беременных женщин спонтанные аборты регистрируют не чаще, чем у здоровых. Столь разительное различие обусловлено наличием ускоряющего рост бруцелл и-эритритола в плаценте животных.

Лабораторная диагностика

Разнообразие клинических проявлений бруцеллеза на практике нередко приводит к ошибочной диагностике тифа, стрептококковых инфекций, туберкулеза и т.д. Для постановки достоверного диагноза необходимо идентифицировать возбудитель. Первоначально необходимо провести бактериологическое исследование крови, принимая во внимание системный характер поражений; также изучают мочу, грудное молоко, аспираты костного мозга и биопсийный материал печени.

Выделение и культивирование возбудителя. Образцы инкубируют в МПБ или бульоне Мартена (можно использовать соевый бульон) при 37°C. При проведении исследования засевают 2 порции среды и в одной создают повышенную концентрацию CO₂. Через 4-5 суток наблюдают рост бруцелл, нередко в виде мелких колоний, вкрапленных в тяжи фибрина, среда остается

слегка мутной или прозрачной. После посева на твердые среды отмечают характерный рост колоний, из которых отбирают чистые культуры с последующими идентификацией биохимических свойств, определением способности расти на средах с добавлением некоторых анилиновых красителей (бактериостатический метод Хеддльсона) и определением биотипа реакциями агглютинации (рис. 18).

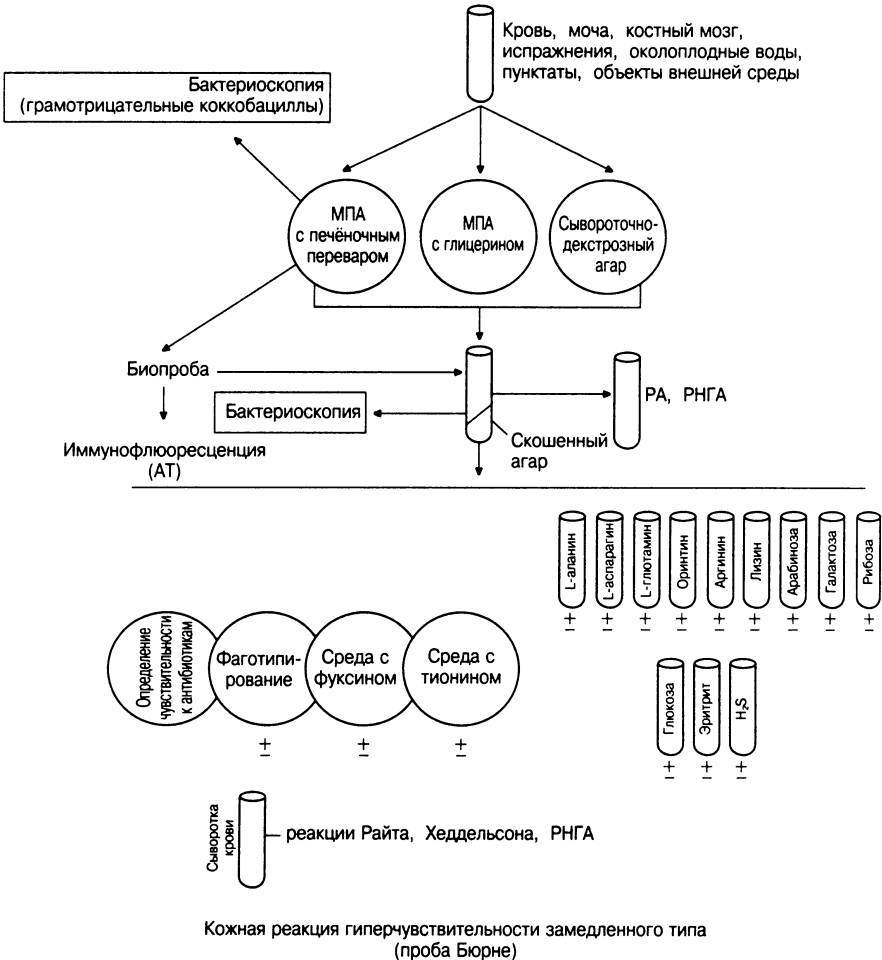


Рисунок 18. Принципиальная схема бактериологического выделения возбудителя бруцеллеза

Серологические исследования. Реакция агглютинации (реакция Райта) — один из основных методов диагностики бруцеллеза. Динамика реакции может

быть различной, для нее характерно колебание титров, в течение суток положительная реакция (с первого дня заболевания); наиболее высокие титры отмечают через 1-2 месяца. Для получения адекватных результатов необходимо использовать негемолизированную сыворотку и Аг, приготовленный из S-форм бруцелл (применять Аг диссоциированных форм нельзя), в эндемичных очагах вызванных *Brucella melitensis*, рекомендуют применять гомологичный Аг (V доклад Комитета экспертов ВОЗ, 1970). Следует помнить, что для реакции Ранга характерны проагглютинационные зоны, или прозоны (отсутствие агглютинации в первых разведениях и четкое ее проявление в более высоких разведениях сыворотки). Часто применяют микрометод реакции агглютинации на стекле (реакция Хеддльсона).

В острой фазе заболевания диагностическую ценность имеет иммуноферментный метод, выявляющий IgM в сыворотке больного

Для диагностики, особенно при отрицательных результатах бактериологических и серологических исследований, используют аллергические кожные пробы (проба Бюрне), обычно положительные у 70-85% пациентов к концу 1 месяца заболевания. В качестве Аг применяют бруцеллин (мелитин, абортин) — протеиновый экстракт культуры бруцелл. Пробу также применяют для проведения эпидемиологических обследований (бывает положительной после вакцинации).

Для выявления возбудителя в молоке широко применяется кольцевая проба Банга.

Питательные среды для культивирования бруцелл

Для выделения и поддержания культур бруцелл используют мясо-пептонный печеночный бульон, печеночно-глюкозо-глицериновый бульон, картофельный агар, мясо-пептонный печеночно-глюкозо-глицериновый агар, печеночно-глюкозо-глицериновый агар, сывороточно-декстрозный агар, эритрит-агар, агар Альбими и другие среды. При выделении бруцелл из загрязненного материала в среды добавляют генцианвиолет 1:100-250 тыс., малахитовый зеленый — 1:500 тыс., кристаллвиолет — 1:100 тыс.

Мясо-пептонный печеночный бульон (МППБ). К 610 мл мясной воды добавляют 305 мл печеночного настоя, 10 г пептона, 5 г натрия хлорида. Кипятят 60 минут, водой доводят объем до первоначального. Фильтруют, разливают в пробирки (колбы), стерилизуют при 110°C 30 минут.

Печеночно-глюкозо-глицериновый агар. К 900 мл печеночного настоя добавляют 9 г пептона, 5 г натрия хлорида, 25 г агар-агара. Варят в автоклаве 60 минут при 100-110°C. Фильтруют, устанавливают рН 7-7,2. Добавляют 20 г глюкозы и 25 мл глицерина. Разливают в пробирки, стерилизуют при 110°C 30 минут.

Печеночно-глюкозо-глицериновый бульон готовят так же, как и предыдущую среду, но агар не добавляют.

Печеночно-сывороточный и печеночно-аминопептидный агар. К 1 л печеночного настоя добавляют 10 г пептона, 5 г натрия хлорида, 20 г агар-агара, 17 мл 10%-ного раствора натрия двууглекислого. Автоклавируют при 115°C 20 минут. Фильтруют, устанавливают рН 7-7,2. Добавляют 10 г глюкозы и 20 мл глицерина. Разливают по сосудам, стерилизуют при 110°C 20 минут. Перед использованием в расплавленную и охлажденную до 45°C среду вносят 10-20% стерильной сыворотки крови крупного рогатого скота или 10-15% аминокептида. Среду разливают в пробирки или бактериологические чашки.

Полужидкий печеночно-сывороточный и печеночно-аминопептидный агар. К 500 мл мясной воды добавляют 500 мл печеночного настоя, 10 г пептона, 5 г натрия хлорида и 2 г агар-агара. Кипятят до расплавления агара. Устанавливают рН 7-7,2. Разливают по сосудам и стерилизуют при 115°C 30 минут. Перед использованием в подогретый до 45°C агар добавляют 10% стерильной сыворотки крови крупного рогатого скота или барана или аминокептида.

Сывороточно-декстрозный агар. К 835 мл дистиллированной воды добавляют 20 г агар-агара, 10 г пептона, 5 г натрия хлорида, 165 мл мясной воды. Кипятят до расплавления агара. Фильтруют, устанавливают рН 7,4. Разливают в колбы и стерилизуют 15 минут при 115°C. Перед использованием в расплавленный и охлажденный до 45°C агар вносят 10% стерильной сыворотки крови крупного рогатого скота или лошади, 1% декстрозы.

Картофельный агар. В 1 л дистиллированной воды 15 минут варят 500 г очищенного и мелко нарезанного картофеля. Отвар фильтруют через ватно-марлевый фильтр, доводят объем водой до 1 л. Добавляют 10 г пептона, 5 г натрия хлорида, 25 г агар-агара, кипятят до расплавления агара. Устанавливают рН 7,2. Агар оставляют для застывания; прозрачную верхнюю часть отрезают, расплавляют, фильтруют через ватный фильтр. Корректируют рН до 7,2. Добавляют 10 г глюкозы и 30 мл глицерина. Разливают по колбам или пробиркам. Стерилизуют при 115°C 20 минут. Готовая смесь должна иметь рН 6,8.

Среда Альбими. В 1 л дистиллированной воды растворяют 2 г пептона, 1 г декстрозы, 5 г натрия хлорида, 0,1 г натрия бисульфата. Добавляют 2 мл дрожжевого аутолизата. При изготовлении плотной среды добавляют 2-2,5% промытого агар-агара. Стерилизуют при 115°C 30 минут.

Заменитель среды Альбими. К 1 л дистиллированной воды добавляют 20 г пептона Дифко, 20 мл дрожжевой воды, 5 г натрия хлорида, 20 г промытого агар-агара или агара Дифко. Устанавливают рН 7,3, нагревают до расплавления агара, фильтруют через ватный фильтр. В горячую среду добавляют 1 г глюкозы и 0,1 г натрия бисульфата. Корректируют рН до 7,2—7,3. Разливают в колбы или пробирки, стерилизуют 20 минут при 110°C.

Для приготовления дрожжевой воды в 1 л дистиллированной воды суспендируют 1 кг пекарских (хлебных) дрожжей, кипятят 5-10 минут, фильтруют

через плотный фильтр. Хранят в темном месте под хлороформом не более 2 недель.

Селективные среды для выделения бруцелл из молока и других материалов (рецепты фирмы Oxoid). К расплавленному и охлажденному до 55-60°C агаровым средам (сывороточно-декстрозный или кровяной агары с 5% лошадиной сывотки и 1% декстрозы) добавляют следующие антибиотики (из расчета на 1 л среды): полимиксин В — 500 ИЕ, бацитрацин — 25 000 ИЕ, циклогексимид — 100 мг, налидиксовая кислота — 5 мг, нистатин — 100 000 ИЕ и ванкомицин — 20 мг. Антибиотики суспендируют в 10 мл метанола. Вносят суспензию в среду и тщательно перемешивают.

Среда с красителями для дифференциации видов бруцелл. В предварительном опыте с использованием эталонных культур бруцелл разных видов определяют необходимую концентрацию красителей в среде, позволяющую дифференцировать виды.

В 20 мл этанола растирают 0,1 г тионина и отдельно — основного фуксина. Доводят объем красок до 100 мл дистиллированной водой. Полученные разведения красителей 1:10 000 добавляют в расплавленный и охлажденный до 45-60°C сывороточно-декстрозный агар, перемешивают и разливают в чашки Петри. Готовят суспензию из 48-часовой агаровой культуры исследуемого штамма бруцелл на 0,8%-ном растворе натрия хлорида концентрацией 10^{10} бактериальных клеток в 1 мл. Одну каплю суспензии засевают штрихом на агар с красителем (отдельно с тионином и фуксином). Одновременно эту суспензию засевают на агар без красителя. Инкубируют до появления роста культуры на агаре без красителей. Учитывают результат по наличию роста на агаре с красителями.

Дифференциация S- и R-колоний бруцелл по Уайту-Вильсону. На подсушенный в течение 24 ч агар Альбими в чашке Петри засевают исследуемую культуру бруцелл и инкубируют при 37°C до появления колоний. Затем на колонии наливают водный раствор кристаллиолета и выдерживают 15 с. Раствор краски сливают в чашку с дезинфицирующим раствором, а колонии рассматривают под лупой (или при малом увеличении микроскопа). Колонии S-формы светлого, а R-формы — фиолетового цвета.

Печеночный настой. К 1л водопроводной воды добавляют 500 г фарша из свежей печени крупного рогатого скота. Настаивают 3 ч при 25-30°C или 6-10 ч при 4°C. Кипятят, помешивая, 1-2 ч, доливают водой до первоначального объема. Осевший фарш удаляют. Настой фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают в колбы и стерилизуют при 115°C 20 минут.

Мясная вода. К 1л водопроводной воды добавляют 500 г фарша из свежего мяса крупного рогатого скота. Настаивают при 4°C 15-18 ч. Фарш удаляют. Настой кипятят 30-40 минут, доливают водой до первоначального объема. Фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают в колбы. Стерилизуют при 120°C 20 минут.

Микроорганизмы рода *Haemophilus*

Систематика микроорганизмов данного рода не завершена и требует дальнейшей доработки. Достаточно указать, что по справочнику Берджи (1997 г., издания США-1994) в род *Haemophilus* входит 11 видов; Kilian, Biberstein (1984) авторитетно настаивают на 16 видах. Микроорганизмы рода - неподвижные, грамтрицательные коккобациллярные или палочковидные бактерии, характеризующиеся полиморфизмом; иногда могут образовывать нити. Обязательные паразиты; для роста необходимы ростовые факторы, содержащиеся в эритроцитах (что отражает название *Haemophilus*), особенно X (протопорфирин IX) и/или V (никотинамидадениндинуклеотид – NAD или NAD-фосфат – NADP). Температурные границы роста 24-43°C, оптимальная температура 35-37°C. Некоторые виды *Haemophilus* входят в состав нормальной микрофлоры организма человека и животных, другие вызывают тяжелые инфекции (менингит, эпиглоттит, пневмонию, перикардит и др.). Типовой вид — *Haemophilus influenzae*. Внутри рода микроорганизмы дифференцируют по потребности в указанных факторах роста и биохимическим свойствам (табл. 20).

Таблица 20. Биохимические свойства различных видов *Haemophilus*

Вид	Гемолиз*	Ката-лаза	Окси-даза	Пор-фириновый тест	По-треб-ность в факто-рах	Образование кислоты из:				
						Глю-козы	Фрук-тозы	Саха-розы	Лакто-зы	Ман-нозы
<i>H. influenzae</i>	–	+	+	–	X, V	+	–	–	–	–
<i>H. parainfluenzae</i>	–	±	+	+	V	+	+	+	–	+
<i>H. haemolyticus</i>	+	+	+	–	X, V	+	±	–	–	–
<i>H. parahaemolyticus</i>	+	±	+	+	V	+	+	+	–	–
<i>H. arophilus</i>	–	–	–	±	–	+	+	+	+	+
<i>H. paraprophilus</i>	–	–	+	+	V	+	+	+	+	+
<i>H. segnis</i>	–	±	–	+	V	±	±	±	–	–
<i>H. ducreyi</i>	–	+	+	–	X	–	–	–	–	–

*На КА с эритроцитами лошади

Фактор роста X содержится в эритроцитах в виде термостабильной группы тетрапирролов, входящих в состав гематина и гемина (принимают участие в цитохромном транспорте электронов и синтезе каталазы и пероксидазы). Виды, нуждающиеся в X-факторе, не способны синтезировать протопорфирин из δ-аминолевулиновой кислоты, что используют для их идентификации (см. ниже), фактор роста V — термолabile кофермент, включающий НАД (коэн-

зим I) или НАДФ (коэнзим II). Этот фактор — составная часть витаминов группы В, участвующих в окислительно-восстановительных реакциях бактериальных клеток. V-фактор присутствует в некоторых продуктах (например, в дрожжах), а также синтезируется некоторыми бактериями (например, сарцинами, стафилококками, нейссериями и др.). Добавление в питательную среду НАД, НАДФ или никотинамидрибозид удовлетворяет потребность микроорганизма в V-факторе. Также рост гемофилов стимулирует посев вблизи колоний микроорганизмов, продуцирующих V-фактор. Потребность в его присутствии испытывает незначительное число видов, а *H. argophilus* не нуждается в обоих факторах.

Haemophilus influenzae (палочка Афанасьева-Пфейффера)

Основной патоген; вызывает респираторные и менингеальные инфекции, эндокардиты, абсцессы, артриты, поражения кожи, ногтей и глаз. Гемофильные бактерии первым выделил Кох в начале 80-х гг. XIX в. из конъюнктивального экссудата больного египетским конъюнктивитом. Позднее схожий микроорганизм выделили М.И. Афанасьев (1891) и Пфейффер (1892) из гнойного отделяемого и ткани легкого больного, умершего во время пандемии гриппа. Длительное время его считали возбудителем гриппа (*influenza*), что объясняет происхождение видового названия. Недавно методом ДНК-гибридизации была установлена идентичность возбудителей конъюнктивита и легочных поражений, а возбудитель конъюнктивита, ранее известный как *Haemophilus aegyptius*, систематизирован как *Haemophilus influenzae* биовар *aegyptius*.

Морфология

Haemophilus influenzae — небольшие (0,3-0,4×1-1,5 мкм) коккобациллы, склонные к плеоморфизму. Часть штаммов имеет полисахаридную капсулу. Клеточная стенка наружной мембраны содержит ЛПС (эндотоксин) и протеины; некоторые из них штаммоспецифичны и идентифицируются серологически, что иногда используют при эпидемиологических обследованиях. В зависимости от состояния популяции, на ША капсулосодержащие штаммы *Haemophilus influenzae* формируют слизистые М-колонии (сочные, сероватые, иризирующие [дающие радужную окраску] в проходящем свете), образованные мелкими палочками, либо блестящие S-колонии диаметром 3-4 мм (полупрозрачные, при окраске по Граму капсулы выражены слабо или не выявляются). Некапсулированные штаммы на твердых средах формируют более мелкие зернистые R-колонии (с неровным краем, не иризируют, серовато-белого цвета). Образованы полиморфными палочками и нитевидными формами.

Культуральные свойства

Haemophilus influenzae — факультативный анаэроб, хорошо растущий на воздухе. Обязательное условие роста, характерное всех видов *Haemophilus* - присутствие в питательной среде свежей крови. Перед внесением в среду

эритроциты разрушают (наиболее часто инкубируют при 80°C в течение 15 минут, что способствует высвобождению факторов и разрушению ферментов, инактивирующих V-фактор); самостоятельно лизировать эритроциты *Haemophilus influenzae* не способна. Оптимальные среды для роста – ША, агар Левинталя и среда с переваром Файлдса (пептический перевар эритроцитов). Кроме указанных факторов, для анаэробного роста микроорганизмы утилизируют и другие продукты, содержащиеся в эритроцитах, например, протопорфирин IX, пиридиннуклеотиды и др.

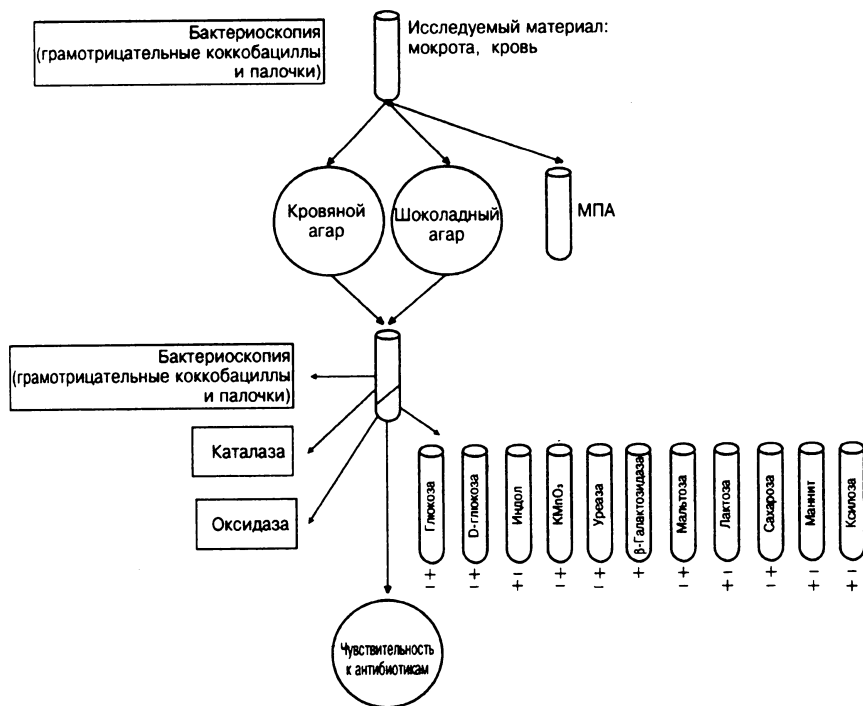


Рисунок 19. Принципиальная схема бактериологического выделения *Haemophilus influenzae*

Антигенная структура

Антигенная структура гемофильной палочки включает Аг двух типов — капсульные (5-30% всех штаммов) и соматические. Питтмэн (1931) предложил разделить все известные штаммы по структуре капсульных Аг на 6 серотипов (a-f); каждый из Аг представлен комплексом углеводов. Серодиагностику проводят в РА типоспецифическими политиповыми или монотиповыми сыворотками; возможна трансформация серотипов между штаммами.

Защитные АТ к Аг капсулы усиливают поглощение бактерий фагоцитами и стимулируют бактериолиз в присутствии комплемента *in vitro*. Основную эпидемическую опасность представляет *Haemophilus influenzae* типа b; ее капсульный Аг состоит из полирибозы и полирибитолфосфата.

Некапсулированные штаммы неоднородны по антигенному набору; один из них — Аг М имеет белковую природу и существует у всех штаммов.

H. pleuropneumoniae

Возбудитель плевропневмонии свиней. Выделяют также при артритах овец, абсцессах у быков. Клетки представляют собой очень короткие палочки с закругленными концами, чаще - парные коккобактерии, иногда образуют короткие цепочки и даже нитевидные формы. Грамотрицательные, некислотоустойчивые, неподвижные. Образуют капсулу.

Факультативный анаэроб. Температурный оптимум 37-38°C. Для роста на питательных средах обычно требуют наличия в них V-фактора. На оптимальных плотных питательных средах (сывороточно-дрожжевой агар) через 48 ч инкубирования формируют прозрачные серо-белые круглые колонии диаметром 1-2 мм, с ровными краями, гладкой поверхностью, средневыпуклые. Консистенция колоний мягкая, а при первичной изоляции часто бывает липкой. Колонии S-формы флюоресцируют в косопроходящем свете. На кровяном агаре большинство штаммов дает б-гемолиз, у ряда штаммов скрытая гемолитическая активность может быть выявлена в САМР-тесте. На средах без V-фактора растут в виде мелких сателлитных колоний вблизи культуры (колоний) бактерии-кормилки.

Доказано наличие 12 серологических вариантов (1—12).

Вид патогенен для свиней, морских свинок, белых мышей, кроликов.

H. parasuis

Изолируют при полиартритах и полисерозитах свиней, нередко вместе с *Mycoplasma hyorhinis*, а также при пневмониях. Распространено носительство у клинически здоровых свиней. У поросят послеотъемного возраста вызывает гемофилезный полисерозит (болезнь Глессера).

Морфологически представляет собой мелкие тонкие палочки, коккобактерии, короткие нити. Грамотрицательные, некислотоустойчивые, неподвижные. Образуют капсулу.

Факультативный анаэроб. Для роста нуждается в V-факторе. Температурный оптимум 37-38°C. На простых питательных средах не растет. При первичной изоляции в атмосфере желательно создавать повышенную концентрацию CO₂. На оптимальной плотной питательной среде (шоколадный агар) через 48-72 ч культивирования формирует мелкие (0,4—0,5 мм) колонии. На жидких питательных в средах с V-фактором рост сопровождается слабым равномерным помутнением среды. Доказано наличие четырех сероваров: А, В, С, D (Bakos et al., 1952).

H. paracuniculis

Выделен от кроликов с явлениями слизистого энтерита. Патогенность не установлена.

Клетки представляют коккобактерии и полиморфные палочки, редко нити. Капсула не обнаружена. Для роста на питательных средах требуется V-фактор. На шоколадном агаре образует круглые, гладкие, сероватые, непрозрачные колонии.

H. paragallinarum

Возбудитель коризы птиц. Обнаруживают в респираторном тракте здоровых птиц.

Клетки представляют коккобактерии, полиморфные палочки или нитевидные формы. Образует капсулу.

Лучше растет в атмосфере с повышенным содержанием CO₂ (10%). На шоколадном агаре через 48 ч образует круглые, выпуклые, гладкие, сероватые, полупрозрачные диаметром до 1 мм колонии. Гемолитическими свойствами не обладает. Рост стимулируют добавлением сыворотки крови кур, требуются X- и V-факторы. Подразделяется на четыре серовара: А, В, С — содержащие поверхностные термолабильные антигены (Hinz, 1962), и четвертый — термостабильный соматический антиген (Hinz, 1980).

H. avium

Патогенные свойства не установлены. Среда обитания — верхние дыхательные пути птиц. Клетки в виде коккобактерии, полиморфных палочек, иногда нитей, имеют капсулу.

Для роста на питательных средах требуется V-фактор, не нуждается в повышенном содержании CO₂, гемолитической активностью не обладает. На шоколадном агаре образует круглые, выпуклые, гладкие, серовато-белые колонии, но возможны зернистые, морщинистые. Колонии капсулообразующих штаммов флюоресцируют.

H. somnus

Вид с неясным таксономическим положением. Возбудитель септицемии и тромбоемболического менингоэнцефалита крупного рогатого скота; может поражать генитальные органы. Среда обитания — слизистые оболочки респираторного и генитального трактов крупного рогатого скота.

Короткие палочки или нити, грамотрицательные, некислотоустойчивые, капсулы большинство штаммов не образуют, неподвижны.

Температурный оптимум 37-38°C. Первичная изоляция микроорганизма требует повышенного содержания CO₂ (10%). Потребности в X- и V-факторах не доказаны. На плотных питательных средах через 24 ч образует круглые, гладкие колонии диаметром 0,2-0,6 мм. При более длительном инкубировании возможно появление выпуклого центра, плоской периферии и зернистости.

H. agni

Вид с неясным систематическим положением. Выделен при сепсисе, артритях, менингитах, миозитах, пневмониях и маститах овец. Грамотрицательные коккобактерии или полиморфные палочки, до неправильной формы нитевидных клеток. Неподвижные, некислотоустойчивые. Некоторые штаммы образуют капсулу.

На кровяном агаре при 5-10% CO₂ формирует выпуклые, просвечивающие колонии диаметром 0,5-1,6 мм, возможен рост в аэробных условиях. Несмотря на отсутствие четкой потребности в ростовых факторах, лучше растет на шоколадном агаре, не дает роста на агаре Мак-Конки.

H. equigenitalis

Вид с неясным систематическим положением. Обитает в генитальных органах здоровых жеребцов, возможно длительное носительство у кобыл в области клитора. Возбудитель эндометритов и цервицитов у кобыл.

Клетки имеют форму мелких, грамотрицательных, иногда биполярно окрашенных палочек, коккобактерий, нитей. Некислотоустойчивы, неподвижны, образуют капсулу. Температурный оптимум 37-38°C. Плохо растет в аэробных и анаэробных условиях, оптимальным является содержание 5-10% CO₂ в атмосфере. Рост на питательных средах стимулируется X-фактором. На шоколадном агаре формирует через 24 ч единичные, мелкие (около 1 мм), круглые, выпуклые, блестящие колонии серо-белого цвета. При надавливании бактериологической петлей колонии скользят по поверхности среды. Гемолитической активностью не обладает. Плохо растет на кровяном, сывороточном агаре, не растет на агаре Мак-Конки.

Остальные виды рода *Haemophilus*, по современным данным, не играют роли в патологии сельскохозяйственных животных.

Питательные среды для культивирования гемофильных бактерий

Среды для выращивания гемофильных бактерий должны содержать специальные ростовые факторы. Для этого в основную среду крови добавляют свежий стерильный экстракт дрожжей или чистые препараты ростовых факторов: V-, X-фактор.

Шоколадный агар. Содержит X- и V-факторы. Агаровую питательную среду (МПА, агар Хоттингера) расплавляют на водяной бане и, не охлаждая, добавляют в нее 10—15% по объему стерильной дефибрированной или нитратной крови лошади, барана или кролика. После охлаждения питательной среды до 55—60°C содержимое сосуда тщательно перемешивают и разливают по чашкам или пробиркам.

Агар Левинталя. Содержит X- и V-факторы. Готовят при изучении морфологии колоний, так как шоколадный агар непрозрачен. В этом случае к расплавленной и затем охлажденной до 60°C агаровой среде добавляют, встряхи-

вая, 10% стерильной дефибрированной или цитрированной крови барана или лошади. Кровь добавляют дробно (5—7 раз) при тщательном перемешивании питательной среды, флакон с которой в промежутках выдерживают на водяной бане с температурой 65°C. После внесения всего объема крови питательную среду нагревают до кипения и оставляют в кипящей воде в течение 5 минут. Затем среду вынимают из водяной бани и 2-3 минуты выдерживают при комнатной температуре. Процедуру прогрева среды повторяют три раза. Далее питательную среду ставят на 2 ч на водяную баню при температуре 60°C для осаждения темных хлопьев свернувшейся крови. По истечении указанного срока осторожно, стараясь не взмучивать осадок, верхнюю прозрачную часть агара разливают по пробиркам или чашкам Петри.

Сывороточно-дрожжевой агар. Содержит V-фактор. К расплавленному МПА или агару Хоттингера (рН 7,2-7,4) добавляют 5-10% стерильной сыворотки крови лошади, крупного рогатого скота, овцы, кролика и такое же количество дрожжевого экстракта.

Приготовление дрожжевого экстракта. 250 г прессованных пекарских дрожжей суспендируют до образования гомогенной суспензии в 1 л дистиллированной воды. Суспензию в колбе из термостойкого стекла кипятят в течение 4—5 минут, непрерывно перемешивая. Микробную массу осаждают центрифугированием при 3-4 тыс. об/мин в течение 30 минут. Надосадочную жидкость сливают и стерилизуют, пропуская через стерилизующие пластины фильтра Зейтца. Полученный таким образом дрожжевой экстракт хранят в посуде из темного стекла при 4-5°C и используют в течение 8-10 суток после изготовления.

Среда с баккормилкой. Метод применяется для культивирования видов, рост которых зависит от наличия в среде V-фактора. Исследуемый материал (или изучаемую культуру) засевают газоном на сывороточной или кровяной МПА, можно на агар Хоттингера в чашки Петри. После этого по диаметру чашки крестообразно в виде непрерывной линии бактериологической петлей засевают «питающую» культуру бактерий. Чаще используют *E. coli* или *Staphylococcus albus*, не обладающие гемолитическими свойствами. Эти виды бактерий в процессе роста выделяют V-фактор, который диффундирует в толщу агаровой среды. В зоне диффузии V-фактора, вблизи питающей культуры, так называемой «баккормилки», способны расти колонии гемофильных бактерий (сателлитный рост), нуждающиеся в V-факторе.

Среды с добавлением чистых препаратов X- и V-факторов. Используют препарат гемин (X-фактор) и НАД (V-фактор). В питательную среду (плотную, жидкую) вносят растворы гемина, НАД или оба препарата, в зависимости от ростовых потребностей бактерий. При этом учитывают, что НАД термолабилен, его необходимо стерилизовать фильтрацией и добавлять в охлажденную до 45°C среду, а гемин термостабилен и выдерживает автоклавирование.

Среды с селективными свойствами используют для выделения гемофильных бактерий из загрязненного патологического материала.

Среда Conroni с соавт. (1972). Предназначена для культивирования X- и V-фактор -зависимых видов бактерий. На чашке Петри с кровавым агаром (5% крови овцы) засевают по всей поверхности исследуемый материал. Затем на питательную среду помещают бумажный диск, пропитанный раствором, содержащим 5% сапонина и 2 ЕД бацитрацина. Сапонин разрушает эритроциты, вокруг диска образуется зона гемолиза, и из крови, находящейся в агаре, освобождаются фактор X и V-фактор, которые обеспечивают рост гемофильных бактерий. Бацитрацин подавляет рост бацилл.

Среда Chapin с соавт. (1983). Состоит из шоколадного агара, содержащего 5 мкг/мл ванкомицина, 300 мкг/мл бацитрацина и 1 мкг/мл клиндамицина. Данная среда неблагоприятна для различных видов бактериальных контаминантов. Высеваемость гемофильных бактерий (*H. influenzae*) в 10 раз выше, чем на обычном шоколадном агаре.

Среда Gilbride с соавт. (1983). Обладает ингибирующим действием на наиболее часто встречающиеся контаминанты (*E. coli*, *P. haemolytica*, *P. multocida*, *S. faecalis*, *S. aureus*). Представляет собой трипозную среду с дрожжевым экстрактом, содержащую 1 мкг/мл кристалвиолета, 1 мкг/мл линкомицина, 8 мкг/мл спектиномицина, 128 мкг/мл бацитрацина.

Среда Pijoan с соавт. (1983). Рекомендуется использовать для подращивания *H. pleuropneumoniae* перед высевом на плотную среду. Состоит из сердечно-мозгового бульона с 5% лошадиной сыворотки, 5% дрожжевого экстракта, 100 мкг/мл ДПН, 0,5 мкг/мл линкомицина и 1,5 мкг/мл бацитрацина.

По данным Т. Little (1970), получены положительные результаты при выделении *H. pleuropneumoniae* из контаминированного материала на шоколадном МПА, содержащем 1:25 000 кристалвиолета и 1,6 ЕД бацитрацина.

Микроорганизмы рода Campylobacter

Микроорганизмы, объединенные в данный род, включают 13 видов. Они известны с 1909 г, со времени выделения в Англии Мак Федиеном и Штокманом культуры *S. fetus* из эмбрионов при инфекционных абортках овец. Позднее, у КРС эту культуру выделили Смит и Тейлор (США, 1918). В СССР заболевание впервые диагностировано у коров, в 1926 В. Якимовым. Морфологически это спиральные, S-образные или изогнутые в виде запятой, «крыла чайки» бактерии; размеры которых — 0,5-5,0 × 0,2-0,8 мкм, могут иметь один и более витков и достигать длины 8 мкм. При культивировании более 48-72 ч образуют кокковидные формы. Подвижные, обладают характерным «винтообразным движением», подвижность обусловлена наличием жгутика, расположенного на одном или двух полюсах (могут в 2-3 раза превышать длину клетки). Спор не образуют; хемоорганотрофы, у большинства видов метаболизм дыхательный. Углеводы не ферментируют и не окисляют, не образуют кислых и нейтраль-

ных конечных продуктов метаболизма, энергию получают расщеплением аминокислот и интермедиатов цикла Кребса. Оксидазоположительны, редуцируют нитраты. Патогенные для человека виды капнофилы (необходимая концентрация CO_2 10-15%) и микроаэрофилы (необходимая концентрация O_2 3-15%) Некоторые могут также расти и в аэробных условиях (21% O_2), другие, например, *C. fetus subsp. fetus*, способны к росту в анаэробных условиях. Для роста в микроаэробных условиях некоторые виды нуждаются в ионах H^+ и формиатах. Некоторые виды растут в анаэробных условиях в присутствии фумарата, либо фумарата + формиата, формиата и H^+ . Грамотрицательны, но водные и спиртовые растворы анилиновых красителей воспринимают с трудом, для идентификации их обычно окрашивают карболовым фуксином Циля (в разведении 1:5). Типовой вид — *C. fetus*. Род включает виды, патогенные для человека и теплокровных животных, вызывают поражения известные как кампилобактериозы. Обычно их выделяют из органов мочеполовой системы, кишечника и ротовой полости. Виды, патогенные для человека и вызываемые ими поражения, представлены в табл. 21, дифференциальные признаки — в табл. 22. Среди них наибольшее медицинское значение имеет *C. jejuni*, чья патогенность для человека, как возбудителя пищевой токсикоинфекции, была установлена сравнительно недавно (1972 г).

Группа *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*)

Культуральные свойства

Температурный оптимум 42°C; оптимум pH 7,0-7,2; для создания микроаэрофильных условий в анаэрокате замещают 75% воздуха смесью из 90% азота и 10% CO_2 . Оптимальную газовую среду получают с помощью коммерческих газогенераторных пакетов (например, Camru Pak II); удовлетворительный рост можно получить в анаэрокате со свечой. В полевых условиях используют стерильные пластиковые пакеты, в которые вносят чашку, засеянную исследуемым материалом, и чашку, засеянную чистой культурой любого факультативного анаэроба (например, эшерихиями); последние будут поглощать O_2 и выделять CO_2 в процессе роста. Кампилобактерии плохо переносят транспортировку; при наличии опыта можно проводить непосредственную их идентификацию в образцах фекалий; в противном случае их следует помещать в консервант, например, тиогликолевый бульон (pH 8,5) или щелочную пептонную воду, содержащую 0,05% тиогликолята Na и 0,025% цистеина, и хранить при температуре 4°C. Для получения более чистых культур используют метод фильтрации через мембранные фильтры (диаметр пор 0,65 мкм), основное достоинство метода — возможность посева фильтрата на неселективные среды (например, КА или ША), основной недостаток — возможность больших потерь бактерий, но обычно ее не принимают во внимание, т.к. 1 г фекалий больного содержит 10^7 - 10^8 жизнеспособных кампилобактерий.

Таблица 21. Патогенные для человека кампилобактеры и вызываемые ими поражения

Вид	Природный резервуар	Поражения
<i>C. jejuni</i>	ЖКТ диких и домашних животных или птиц	Гастроэнтериты
<i>C. fetus</i> подвид <i>fetus</i>	ЖКТ и мочеполовая система овец и крупного рогатого скота	Бактериемии, мертворождения ;
<i>C. fetus</i> подвид <i>venerealis</i>	Мочеполовая система крупного рогатого скота	Иногда выделяют из испражнений гомосексуалистов и влагаллица при вагинитах
<i>C. hyointestinalis</i>	ЖКТ свиней	Проктиты, диареи
<i>C. coli</i>	ЖКТ диких и домашних животных и птиц	Гастроэнтериты
<i>C. lari</i>	ЖКТ чаек	Диареи, бактериемии
<i>C. cinaedi</i> , <i>C. fennelliae</i>	?	Проктиты, проктоколиты, энтериты у гомосексуалистов
<i>C. sryaerophila</i>	ЖКТ и мочеполовая система овец и крупного рогатого скота	Диареи
<i>C. concisus</i>	Ротовая полость человека	Болезни периодонта
<i>C. sputorum</i> подвид <i>sputorum</i>	Ротовая полость человека	Диареи, кожные поражения
<i>C. sputorum</i> подвид <i>bubulus</i>	Мочеполовая система крупного рогатого скота	?
<i>C. sputorum</i> подвид <i>faecalis</i>	Мочеполовая система крупного рогатого скота	?

Для более быстрого выделения производят посев на селективные среды, например, среды Скирроу, Бутцлера или Престона. На твердых средах образуют колонии двух типов — плоские, влажные, прозрачные с мелкой грануляцией, слизистые, сероватые, «расползающиеся» колонии с неровными краями (могут быть очень мелкими и напоминать капли конденсата) либо мелкие дискретные блестящие выпуклые колонии размером до 1-2 мм, ровными краями. На полужидких и жидких средах образуют поверхностную голубовато-серую пленку.

Биохимические свойства. Инертны к углеводам; кислых или нейтральных конечных продуктов не образуют; большинство видов редуцирует нитраты; образуют H_2S ; молоко не свертывают; не проявляют гемолитическую активность. Для роста не требуют сыворотки, энергию получают от аминокислот или промежуточных продуктов цикла Кребса, реакции Фогеса-Проскауэра и с метиловым красным отрицательные; желатину и мочевины не гидролизуют; оксидазоположительны; липазная активность отсутствует, пигментов не образуют.

Таблица 22. Дифференциально-диагностические признаки патогенных для человека бактерий рода *Campylobacter*

Вид	Рост при		Гидролиз гиппурата	Каталаза	Образование H ₂ S	Восстановление нитратов	Чувствительность к	
	25°C	42°C					цефалотину	налидиксовой кислоте
<i>C. cinaedi</i> *	–	±	–	+	–	+	+	+
<i>C. coli</i>	–	+	–	+	±	+	–	+
<i>C. concisus</i>	–	+	–	–	+	+	–	–
<i>C. cryaerophila</i>	+	–	–	+	–	+	–	+
<i>C.fennelliae</i> *	–	–	–	+	–	–	+	+
<i>C. fetus</i> подвид <i>fetus</i>	+	±	–	+	–	–	***	–
<i>C. hyointestinalis</i>	±	+	–	+	+	+	+	–
<i>C. jejuni</i>	–	+	***	+	–	+	–	***
<i>C. lari</i>	–	+	–	±	+	+	+	–
<i>C. sputorum</i>	–	+	–	±	–	+	+	+

* *C. cinaedi* и *C.fennelliae* напоминают *Helicobacter pylori* и, очевидно, скоро будут перенесены в род *Helicobacter*.

** В настоящее время выделены штаммы *C. fetus* подвид *fetus*, резистентные к цефалотину.

*** В настоящее время выделены гиппурат-отрицательные и резистентные к налидиксовой кислоте штаммы *C. jejuni*.

Для дифференцирования *Campylobacter jejuni* и *C. coli*, вызывающих абсолютно идентичные поражения, применяют экспресс-тест с гиппуратом (свеже-выделенные штаммы *C. jejuni* всегда дают положительный результат).

Для дифференцирования *Campylobacter jejuni* и *C. laridis* можно использовать тест чувствительности к налидиксовой кислоте (первый вид чувствительный, второй — резистентный).

Антигенная структура

Важнейшие поверхностные Аг представлены ЛПС (О-Аг) и кислоторастворимыми белковыми фракциями, играющими ведущую роль в серотипировании. Общий Аг энтеробактерий отсутствует. Идентифицирован жгутиковый (H-) Аг. По термостабильному, соматическому О –Аг, штаммы подразделяются на 60 сероваров, по термолабильному, поверхностному на 50 сероваров.

О-Аг определяют иммунологическую специфичность кампилобактеров, выявляемую в РНГА; они представлены низкомолекулярными веществами, а антигенные различия между разными сероварами обусловлены варьированием углеводного состава внутреннего ЛПС.

Белковый жгутиковый Аг, общий для всех сероваров.

Патогенез

Патогенез заболеваний обусловлен высокой адгезивной и инвазивной активностью кампилобактерий. Последние размножаются в присутствии желчи и быстро колонизируют верхние отделы тонкой кишки.

Прикрепление бактерий к слизистой оболочке во многом обеспечивают поверхностные специфические адгезины; большое значение имеет способность бактерии проникать через слизь и перемещаться вдоль эпителия (жизнеспособность в слизи сохраняют более 30 минут), т.е. жгутики — также важный фактор адгезии.

Данные микроорганизмы легко проникают через мембрану эпителиальных клеток и межклеточные ходы, например, после внесения бактерий в культуру клеток HeLa и часовой инкубации практически во всех клетках обнаруживают бактерии. Клинический признак, подтверждающий их инвазивность, — наличие крови и слизи в испражнениях больных.

Колонизация кампилобактериями тонкой кишки приводит к развитию воспалительных изменений и отека слизистой оболочки; в lamina propria обнаруживают инфильтрат, содержащий полиморфноядерные лейкоциты, лимфоциты и плазматические клетки. Эндоскопия выявляет отек и гиперплазию слизистой оболочки, эрозии, сливающиеся в крупная изъязвления (в тонкой и толстой кишках).

Определенный вклад в патогенез поражений вносят термолабильный и термостабильный энтеротоксины.

По механизму действия термолabileльный энтеротоксин напоминает термолabileльные диареогенные токсины эшерихий и холерного вибриона (повышает уровень внутриклеточного цАМФ).

Термостабильный энтеротоксин (эндотоксин) высвобождается после гибели кампилобактерий; проявляет все свойства эндотоксинов грамотрицательных бактерий. Вызывает гибель мышей после введения живых или убитых микроорганизмов.

Характер и выраженность поражений определяют факторы макроорганизма и, в первую очередь, состояние иммунной системы. Группу повышенного риска составляют дети (особенно до 2 лет), пожилые, страдающие сопутствующими заболеваниями, пациенты с иммунодефицитами либо получающие стероиды и цитостатики.

Лабораторная диагностика

Основана на выделении возбудителя из испражнений; следует помнить, что на характер колоний возбудителя влияет качество среды – на «свежих» средах колонии более склонны расплзаться. При посеве фекалий от больных на селективные среды рост возбудителя отмечают на 3 и 4 квадрантах, но следует тщательно осматривать всю чашку, т.к. они могут вырасти на 1 квадранте в окружении колонии контаминирующей микрофлоры.

Для быстрой идентификации можно провести микроскопическое исследование фекалий; кампилобактеры видны как нежные грамотрицательные спиралевидные или S-образные бактерии (особенно часто типичные формы наблюдают при окраске кристаллическим фиолетовым). Также можно применять фазово-контрастную микроскопию суспензии испражнений в жидкой среде (например, в среде для культивирования бруцелл или Мюллера-Хинтона).

Для идентификации кампилобактериозов также могут быть использованы серологические методы, например РА (на 2 нед. титр АТ составляет 1:8-1:32) или РСК (видоспецифическая реакция, требующая соответствующего Аг). В РФ разработаны экспериментальные партии диагностикумов для выявления АТ в реакции РНГА.

Распространенность

Кампилобактериальные гастроэнтериты выявляют повсеместно; однако получению более полной картины препятствует несовершенство методов диагностики.

Заболееваемость может носить спорадический, преимущественно аутохтонный характер (у городского населения - чаще при выездах в сельскую местность), особенно при слабой или умеренно выраженной диарее. Характерная особенность — сезонность заболевания (подъем заболеваемости в сельской местности наблюдают в зимние месяцы, а у горожан пик заболеваемости приходится на теплый сезон). Однако во многих случаях она может быть связана с

выездом в другие страны («диарея путешественников»). Отмечены эпидемические вспышки различного происхождения (пищевые, водные, молочные).

Резервуар. Источники инфекции — животные (в том числе домашний скот и птица), от которых возбудители могут попадать в организм человека при употреблении сильно обсемененных продуктов. Важная роль принадлежит диким водоплавающим птицам, способным загрязнять источники водопользования. В ряде случаев резервуаром может быть больной человек, но процент носителей обычно бывает очень низким (менее 1% в популяции) и, учитывая относительно низкую вирулентность возбудителей, его можно не принимать во внимание.

C. fetus подвид *fetus*

Впервые выделен в 1909 г. при инфекционных абортах; у человека (от беременных женщин, госпитализированных по поводу лихорадки неясного генеза) возбудитель выделил Венсан (1947). У части пациентов инфицирование приводило к выкидышам. Из крови ребенка, родившегося у одной из пациенток, был выделен микроорганизм, позднее идентифицированный как *C. fetus* подвид *fetus* и его посчитали причиной абортов. В настоящее время известно много случаев, зарегистрированных в США, Германии, Франции, Южной Африке и Непале. Однако, механизмы инфицирования остаются плохо изученными; доказана возможность заражения при контактах с животными, при употреблении загрязненной воды и пищи; но в 30% случаев подобные факторы исключены и, предположительно, инфекция происходит из эндогенного источника. Клиническая картина поражений вариабельна: пиогенные менингиты и шингоэнцефалиты, аборты, эндокардиты, тромбофлебиты, артриты и желтуха с гепатомегалией. Установление точного диагноза возможно лишь при выделении возбудителя (чаще из крови, реже из гнойного отделяемого). Поскольку более 75% поражений приходится на возраст старше 45 лет, то можно полагать, что важную роль в развитии заболеваний играет состояние организма и наличие сопутствующих заболеваний (например, сахарный диабет, почечная или печеночная недостаточность, дефекты кроветворения), а сам возбудитель следует рассматривать как условно-патогенный. Иногда микроорганизм колонизирует ротовую полость; стоматологические манипуляции могут вызвать бактериемию. Выделение возбудителя проводят способами, рассмотренными выше; культуральные характеристики аналогичны таковым у прочих кампилобактеров.

C. coli

На плотных средах образуют округлые, выпуклые, гладкие, блестящие колонии диаметром 1-2 мм. На кровяном агаре не дают гемолиза. При посеве уколом на полужидких средах растут ближе к поверхности среды. Рост на сре-

де с 8%-ной глюкозой и резистентность к бриллиантовой зелени, способность гидролизовать гиппураты являются дифференцирующими признаками от *C. jejuni*.

C. sputorum sb. *mucosalis*

Изогнутые, короткие клетки длиной 1,0-2,8 мкм, В старых культурах преобладают клетки кокковидной или нитчатой формы. Для развития микроба необходимы в атмосфере микроаэрофильные условия, обеспечиваемые газовой смесью (5% O₂, 10% CO₂ и 85% H₂) или анаэробные (H₂).

На агаре образуют грязно-желтого цвета, приподнятые, с плоской поверхностью колонии диаметром до 1,5 мм. Растут на средах, содержащих 0,5% дезоксихолата натрия, бриллиантовый зеленый (1:100 000), 6% желчи. Не обладают уреазной активностью. Не гидролизуют желатин. Не образуют индол. Известно три серологических варианта: А, В и С.

Патогенны для свиней. Выделяются из слизистой кишечника с явлениями аденоматоза, некротического энтерита, локального илеита и пролиферативной геморрагической энтеропатии. Кроме того, могут быть выделены из ротовой полости у свиней.

Spirillum pulli

Вид с неустановленным систематическим положением. Представляют собой ригидные спиралевидные клетки диаметром 1 мкм, длиной 5-12 мкм. Подвижны, имеют на концах по одному жгутику. Предположительно вызывают у цыплят месячного возраста заболевание, сходное с дифтероидным стоматитом. Возможность культивирования на искусственных питательных средах не установлена.

Питательные среды для культивирования и идентификации кампилобактерий

Сафранино-железо-новобиоциновая (СЖН) среда. В смесь, состоящую из 250 мл экстракта мышцы сердца, 250 мл печеночной воды и 500 мл дистиллированной воды, вносят 10 г пептона, 5 г NaCl. Кипятят 15 минут, доводят дистиллированной водой до первоначального объема, устанавливают рН 7,1-7,2, после чего добавляют 2 г агара и кипятят до его полного растворения (15-20 минут).

К 985 мл полученного полужидкого агара добавляют 5 мл 2%-ного раствора сернокислого железа, 5 мл 0,5%-ного водного раствора сафранина Т и 5 мл 0,2%-ного водного раствора новобиоцина. Среду фильтруют через бумажный фильтр, разливают в пробирки и автоклавируют при 115°C 25 минут. Готовая к использованию среда должна быть розового цвета, рН 6,8. При культивиро-

вании на данной среде культур кампилобактерий ее цвет не изменяется, другой микрофлоры — приобретает ярко-желтую окраску,

Плотная среда ВИЭВ. В смесь, состоящую из 745 мл сердечного и 245 мл мозгового отвара, вносят 10 г пептона, 5 г хлорида натрия, 20 г агара, 1 г цистеина, 5 мл 0,5%-ного раствора сафранина Т и 5 мл 0,2%-ного раствора новобицина. Среду автоклавируют при 115°C 25 минут, охлаждают до 45-50°C, добавляют 10% дефибринированной крови барана или крупного рогатого скота и разливают в чашки Петри. Рост культуры становится заметен на 2-3 сутки.

Дифференциальные среды предназначены для дифференциации кампилобактерий в пределах рода по их способности расти в присутствии 1% глицина, 3,5% хлорида натрия, 1% желчи, бриллиантового зеленого (1:100 000, 1:33 000).

Полужидкий агар ВГНКИ с 1% глицина. В смесь, состоящую из 500 мл водопроводной, 250 мл мясной и 250 мл печеночной воды, вносят 10 г пептона, 2 г агара. Кипятят до полного растворения агара (15-20 минут). Устанавливают рН 7,3-7,4. Добавляют 10 г глицина, 35 г хлорида натрия, 10 мл желчи, 1 или 3 мл раствора бриллиантового зеленого 1:1000, разливают и автоклавируют при 115°C 30 минут.

Бактерии рода Leptospira

Род включает 10 свободноживущих и паразитических вида; типовой вид — *L. interrogans*. Впервые как самостоятельное заболевание лептоспироз описал в 1888 г. Н.П. Васильев и почти одновременно с ним А. Вейль (Германия). Однако возбудителя болезни открыли японские исследователи Инадао и Идо только в 1914-1915 гг.

Бактерии рода образуют спиральные одиночные клетки (размеры 6-20 × 0,1 мкм); один или оба конца могут быть изогнуты в виде крючков; движение винтообразное: гибательное или вдоль продольной оси, некоторое время могут быть неподвижными, напоминая веревку или прихотливо изогнутые петли. Плохо окрашиваются по Граму и Романовскому-Гимзе, но хорошо различимы при импрегнации серебром, легко выявляются темнопольной микроскопией и несколько хуже — фазовоконтрастной. Хемоорганотрофы, метаболизм дыхательный, субстраты-доноры энергии должны включать жирные кислоты в качестве источника углерода (паразитические формы нуждаются в ненасыщенных жирных кислотах, содержащих 15 и более атомов углерода), потребность возрастает при росте в неоптимальных условиях. Для роста нуждаются в присутствии в среде сыворотки или сывороточного альбумина. Строгие аэробы, температурный оптимум 28-30°C оптимум рН 7,2-7,4. В средах с 1% агара образуют глубинные колонии, в средах с 2% агаром большинство штаммов образует поверхностные колонии.

L. interrogans

Вид представлен более чем 180 серологическими вариантами. По биологическим свойствам их разделяют на сапрофиты, свободноживущие в пресноводных водоемах, и варианты, патогенные для людей и животных, вызывающие поражения, известные как лептоспирозы. Патогенные серовары чувствительны к действию солнечного света и высоких температур (при 45°C в воде погибают через 45 минут, при 70°C — через 10с), высушивание вызывает немедленную гибель. Выживаемость патогенных вариантов в пресноводных водоемах переменна — от нескольких часов до 30 суток (наиболее долго — в чистой воде с $pH < 7$ и низкой минерализацией), в сухой почве сохраняются 2-3 ч, а заболоченной — до 200 суток. Все лептоспирозы чувствительны к действию дезинфектантов (солей, кислот и щелочей).

Морфология и культуральные свойства

Строение спирохеты весьма типично, средние размеры 7-14×0,07-0,1 мкм (свежевыделенные организмы всегда короче, чем лептоспирозы, выращенные на искусственных средах); цитоплазма нежная, гомогенная, включений не содержит. Микроаэрофил, температурный оптимум — 30°C; наиболее часто патогенные лептоспирозы выращивают на жидких и полужидких средах с добавлением сыворотки кролика (например, среда Ферворта-Вольфа) рост наблюдают на 5-8 сутки инкубирования (иногда на 21-25 сутки). В старых культурах можно наблюдать различные дегенеративные формы и «зернистый» распад лептоспироза. По Граму и Романовскому-Гимзе окрашивается в розовый цвет, при импрегнации серебром — в коричневый или черный; в культурах часто можно обнаружить образование клубков из лептоспирозов. При микроскопии можно обнаружить около 20 мелких, тесно расположенных первичных завитков, придающих клетке форму C, S.

Распространенность

Лептоспирозы человека и животных выявляют практически повсеместно в самых разнообразных климато-географических и ландшафтных зонах. Заболеваемость также тесно связана с деятельностью человека (сельскохозяйственные работы, скотоводство и т.д.).

Основной резервуар инфекции — различные дикие и домашние животные (более 80 видов), включающие жвачных, хищников, грызунов и рукокрылых. Из домашних животных особенно часто болеют свиньи, крупный рогатый скот; реже — собаки.

Пути передачи. Механизм передачи возбудителя сходен у всех лептоспирозов; основной магистралью для заражения человека и животных служит вода. Возбудитель сохраняется в почках больного животного и выводится с мочой, которой могут быть загрязнены водоемы, почва, растительность и пищевые продукты. Человек заражается при проведении сельскохозяйственных ра-

бот, например при покосах, в низинах при проведении ирригационных и мелиоративных работ, а также при купании и использовании воды из загрязненных водоемов. Реже регистрируют случаи инфицирования при контактах с животными и через пищевые продукты; в свежем молоке возбудитель выживает до 2 суток, в картофельном супе — до 11 суток, в заливной рыбе и холодце — до 24 ч. Поскольку заражение через воду считают доминирующим, выделяют три основных фактора эпидемиологии лептоспирозов: первично-исходные природные очаги; антропоургические очаги (преимущественно сельскохозяйственные) и больные люди (обычно тупиковые хозяева). Случаев заражения человека через укусы членистоногих (слепни, мухи-жигалки) не описано, однако получены вполне убедительные экспериментальные данные, указывающие на способность кровососущих насекомых и клещей сохранять (до месяца) и передавать лептоспиры.

Сезонность. Очаги лептоспироза характеризует определенная полигостальность (множественность хозяев), однако роль разных животных в поддержании очага весьма разнообразна, при непрерывной циркуляции наибольшую зараженность грызунов наблюдают в июле-сентябре, наименьшую — в январе-апреле. Соответственно, у человека пик заболеваемости приходится именно на эти периоды.

Патогенез поражений

В организм лептоспиры проникают через слизистые оболочки носа, рта пищевода (но не желудка, где они обычно погибают), глаз, а также через микротравмы кожных покровов; чаще наблюдают комбинированное заражение (через слизистые оболочки и кожу). Продвигаясь по лимфатическим путям лептоспиры обычно не вызывают развития лимфаденитов (исключая случаи японской семидневной лихорадки с характерным увеличением регионарных лимфатических узлов). Затем возбудитель проникает в кровь и циркулирует в ней, генерализованная лептоспиремия продолжается 4-5 суток со дня заражения и сопровождается избирательной концентрацией возбудителя в почках и печени (5-6 суток). Соответственно, гепаторенальные поражения характерны для всех лептоспирозов и особенно для болезни Васильева-Вейля. Начиная со 2 недель, возбудитель депонируется преимущественно в извитых канальцах почек и исчезает из крови и других тканей

Поражения печени обусловлены как механическим повреждением гепатоцитов активно подвижными лептоспирами, так и токсическим действием метаболитов и продуктов распада микроорганизмов, что может приводить к развитию желтухи. Определенная роль в происхождении желтухи принадлежит массивному гемолизу, опосредованному множественными кровоизлияниями вследствие повреждения эндотелия сосудов лептоспирами.

Поражения почек. Способность возбудителя избирательно депонироваться, располагаясь на поверхности эпителиальных клеток и в межклеточном пространстве, приводит к тяжелым повреждениям почечных канальцев и на-

рушению мочеобразования, а в тяжелых случаях к анурии и уремии. После выздоровления лептоспирсы длительно сохраняются в почках и выделяются с мочой (до 40 дня болезни).

Поражения сосудов. Механическое воздействие лептоспир на эндотелий сосудов вызывает множественные кровоизлияния, нарушает проницаемость сосудистой стенки с потерей жидкости вплоть до развития гиповолемического шока. В свою очередь, массивные кровоизлияния и прогрессирующая тромбоцитопения могут вызвать развитие ДВС-синдрома.

Менингеальные явления, часто наблюдаемые при лептоспирозах, связаны с непосредственным действием микроорганизмов и продуктов их распада на ЦНС; в СМЖ лептоспирсы регулярно обнаруживают с 7 по 15 сутки болезни.

Клинические проявления достаточно variabelны — от бессимптомных (субклинических) до тяжелых желтушных форм.

Лабораторная диагностика

Включает бактериологические и серологические исследования (рис. 20). При проведении исследований необходимо учитывать эпизоотические, эпидемиологические предпосылки (сезонность, контакт с собаками, свиньями, грызунами и др.).

Микроскопия крови наиболее эффективна в первые дни заболевания; проводят темнопольную микроскопию либо исследуют мазки, окрашенные по Романовскому-Гимзе. Количество лептоспир, циркулирующих в крови, невелико. Необходимо микроскопировать несколько образцов, либо предварительно отцентрифугировать исследуемый образец (эффективность прямой микроскопии не превышает 10%), более адекватные результаты может дать заражение лабораторных животных или выделение гемокультуры.

Биологическая проба. Проводят внутрибрюшинное заражение морских свинок (массой 150-200 г) 2-3 мл крови, взятой в первые дни заболевания (до появления желтухи), через 48-72 ч проводят микроскопию брюшинного экссудата и крови, а также наблюдают за животными и отмечают повышение температуры тела и появление желтухи. Павших животных подвергают патогистологическому и микроскопическому исследованию.

Выделение гемокультуры проводят в первые 2-4 сутки. 8-10 мл венозной крови засевают отдельными порциями на 6-10 пробирок со средой Ферворта-Вольфа, пробирки энергично встряхивают для предупреждения сворачивания крови, заливают жидким парафином и инкубируют при температуре 28-30°C. Через каждые 4-5 суток культуры исследуют, при отсутствии роста в течение 15-20 суток желательнее сделать пересевы на свежую среду. Наиболее часто положительные результаты получают при посевах крови, взятой в 1-2 сутки. Начиная с 4 дня, высеваемость резко падает. На 2-3 неделе возбудитель можно обнаружить в моче и СМЖ, используя все упомянутые методы.

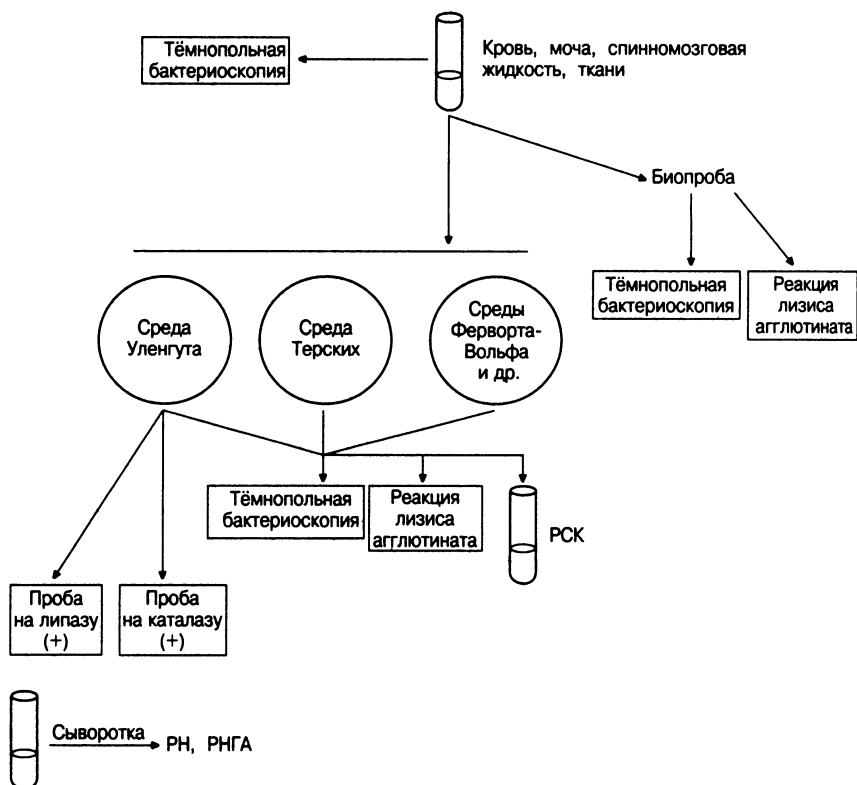


Рисунок 20. Принципиальная схема бактериологического выделения возбудителей лептоспирозов

Серологические исследования проводят на 2-3 неделе заболевания, ставят РСК, реакции микроагглютинации и лизиса с сывороткой пациента и стандартным набором микроорганизмов; при положительном результате можно видеть образование клубков из лептоспир (специфичной считают реакцию при титре не ниже 1:400) или возникновение «зернистого» распада бактерий. Реакции необходимо ставить повторно для выявления нарастания титров АТ.

Питательные среды для культивирования лептоспир

Водно-сывороточная среда. Разлитый во флаконы фосфатный буферный раствор (рН 7,2-7,4) автоклавируют при 115°C 30 минут. К охлажденному буферному раствору добавляют 5-10% инактивированной при 56-58°C в течение 1 ч сыворотки крови кролика или барана, фильтруют через фильтр Зейтца и

разливают в пробирки. Для проверки на стерильность среду выдерживают при 37°C в течение 3-5 суток.

Среда Ферворга-Вольфа в модификации Тарасова. К 900 мл дистиллированной воды добавляют 0,5 мл хлорида натрия, 1 г пептона, 100 мл фосфатного буферного раствора (рН 7,2) и автоклавируют при 115°C 30 минут. Полученную смесь дважды фильтруют через бумажный фильтр, разливают по 5 мл в пробирки и автоклавируют при 115°C 30 минут. В каждую пробирку вносят по 0,5 мл стерильной сыворотки крови кролика или барана, прогревают при 56-58°C 30 минут. Для проверки на стерильность среду выдерживают при 37°C в течение 3-5 суток.

Полужидкая среда Флетчера. К 1000 мл дистиллированной воды добавляют 2 г агара и кипятят 30 минут. Затем разливают по 5 мл в пробирки и автоклавируют при 0,8 атм. 30 минут. После охлаждения в каждую пробирку вносят по 0,5 мл стерильной сыворотки крови кролика или барана, инактивируют при 56-58°C 30 минут. Проверяют на стерильность в течение 3-5 суток при 37°C.

Бактерии рода *Mycobacterium*

Это бактериальные клетки с характерным свойством кислотоустойчивости являются свободноживущими или паразитами позвоночных. Виды данного рода могут быть ошибочно приняты за другие близкие роды. Свойство кислотоустойчивости, обусловленное присутствием восков в клеточных стенках, особенно важно для типирования микобактерий. Эти бактерии не обесцвечиваются под действием подкисленного спирта или сильных неорганических кислот после окрашивания. Некоторые другие бактерии частично кислотоустойчивы, они легко обесцвечиваются спиртом, но могут быть устойчивы к действию слабой кислоты.

В состав рода *Mycobacterium* включены кислото- и спиртоустойчивые (признак особенно выражен у паразитических видов) аэробные неподвижные грамположительные прямые или изогнутые палочковидные бактерии. Иногда они образуют нитевидные или мицелиальные структуры, фрагментирующиеся при легком механическом воздействии на палочки или кокковидные элементы. Характерно высокое содержание липидов и восков (до 60%) в клеточных стенках, образованных пептидогликано-арабиногалактановым комплексом; некоторые виды образуют каротиноидные недиффундирующие пигменты. Каталазо- и арилсульфатазоположительны; резистентны к действию лизоцима. Растут медленно или очень медленно, видимые колонии появляются через 2-60 суток при оптимальной температуре. Колонии часто розовые, оранжевые или желтые, особенно при росте на свету. Пигмент не диффундирующий, поверхность колоний обычно матовая или шероховатая (сапрофитные виды растут несколько быстрее). Характерные биохимические признаки медленно растущих патогенных микобактерий представлены в табл. 23. Микобактерии широко

распространены в окружающей среде — воде, почве, на растениях и животных. Несмотря на то, что в настоящее время идентифицировано около 50 видов, некоторые авторы считают, что род насчитывает около 200 паразитических и сапрофитных видов; типовой вид — *Mycobacterium tuberculosis*. По признаку патогенности выделяют собственно патогенные, вызывающие конкретные заболевания, и атипичные микобактерии. Для систематики последних предложены различные классификации, основанные на генетическом сходстве с *Mycobacterium tuberculosis* или сходстве с сапрофитными видами; среди предложенных вариантов наибольшее распространение нашла классификация Раньона (1959), в основу которой положены два свойства — цвет колоний и скорость роста. Она выделяет 5 групп микобактерий — патогенные (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. leprae*, *M. bovis*, *M. microti* и *M. lepraemurium*) и 4 группы атипичных микроорганизмов:

- 1) фотохромогенные микобактерии, приобретающие темно-оранжевую окраску только при выращивании на свету;
- 2) фотохромогенные микобактерии, приобретающие ярко-оранжевую окраску независимо от того, выращивались ли они на свету или в темноте;
- 3) нефотохромогенные микобактерии, колонии их могут быть неокрашенными или иметь желтовато-оранжевые оттенки независимо от освещенности;
- 4) быстрорастущие микобактерии - за неделю при температуре 25°C и 37°C образуют колонии.

Знание микобактерий этих групп необходимо для дифференциации от патогенных микобактерий.

Основные микобактерии, патогенные для человека, представлены в табл. 24. Бактериологические методы идентификации различных микобактерий включают определение следующих параметров: способность к образованию пигмента, скорость роста, рост при разных температурах (табл. 25), способность к росту на МПА, формы колоний и микроколоний, толерантность к NaCl и некоторые биохимические особенности.

Mycobacterium tuberculosis (палочка Коха).

Возбудитель туберкулеза человека — хронического инфекционного заболевания, характеризующегося поражениями органов дыхания, костей, суставов, кожи, мочеполовых и некоторых других органов. Заболевание известно с глубокой древности. Легочная форма туберкулеза описана античными авторами (Артеем Каппадокийским, Гиппократом и др.). Однако древние авторы не рассматривали его как инфекцию, а Ибн-Сина вообще считал его наследственной болезнью. Первым прямо указал на его инфекционную природу Фракасто-ро, а Сильвий отметил связь легочных бугорков с чахоткой.

Таблица 23. Биохимические признаки патогенных, медленно растущих микобактерий

Активность	<i>M. marinum</i>	<i>M.tuber- culosis</i>	<i>M. bovis</i> *	<i>M. avium</i> **	<i>M. kansasii</i>	<i>M. scrofu- laceum</i>
Уреаза	+	+	+	—	+	+
Пиразинамидаза (в агаре)	+	+	—	+	±	+
Кислая фосфатаза	+	+	+	—	+	—
Восстановление нитратов	—	+	—	—	+	±
α-эстераза	—	+	+	+	—	±
Каталаза	±	—	—	±	+	+
Аккумуляция ниацина	—	+	—	—	—	—
Гидролиз твина (через 10 сут)	+	±	—	—	+	—

* комплекс *M. bovis* включает *M. bovis*, BCG и *M. africanum*.

** комплекс *M. avium* включает *M. avium* и *M. intracellulare*.

Многообразие клинических проявлений туберкулеза (или, как его называли, чахотки) обусловило много ошибочных представлений; де Лаэннек относил легочные бугорки к злокачественным новообразованиям, и даже великий Вирхов не связывал казеозный некроз с туберкулезным процессом. Рост городов, скученность населения и низкий санитарный уровень жизни привели к тому, что в XVIII-XIX вв. туберкулез собирал обильную жатву среди разных слоев населения: достаточно вспомнить Моцарта, Шопена, Некрасова, Чехова и др. Инфекционная природа заболевания была впервые доказана Вильменом (1865), а важнейшим этапом в изучении и совершенствовании мер борьбы с туберкулезом стало короткое сообщение Коха на заседании Берлинского физиологического общества 24 марта 1882 г. об этиологии туберкулеза, в котором он изложил основные постулаты-критерии для оценки патогенности любого микроорганизма.

Распространение

Резервуар *Mycobacterium tuberculosis* — больной организм; основной путь заражения — аэрогенный, реже через кожу и слизистые оболочки. В редких случаях возможно трансплацентарное инфицирование плода. Проникновение микобактерий далеко не всегда вызывает развитие патологического процесса; особую роль играют неблагоприятные условия жизни и содержания.

Таблица 24. Патогенные для человека микобактерии и их свойства

Вид	Резервуар	Патогенность для человека	Основные поражения	Возможность передачи от человека человеку
<i>M. tuberculosis</i>	Человек	+++	Туберкулез	Да
<i>M. bovis</i>	Животные	+++	Туберкулез	Редко
<i>M. kansasii</i>	ООС	+	Туберкулезоподобные поражения	Очень редко
<i>M. scrofulaceum</i>	ООС	+	Лимфадениты	Нет
<i>M. aviumimracellulare</i>	ООС, птицы	+	Туберкулезоподобные поражения	Нет
<i>M. fortuitum</i>	ООС	+	Кожные абсцессы	Нет
<i>M. marinum</i>	Вода, рыбы	±	Кожные гранулемы	Нет
<i>M. ulcerans</i>	ООС	±	Кожные язвы	Нет
<i>M. leprae</i>	Человек	+++	Проказа	Да

ООС — объекты окружающей среды.

Морфология и тинкториальные свойства

Тонкие, прямые или слегка изогнутые палочки размерами 1-10×0,2-0,6 мкм, со слегка закругленными концами; в цитоплазме содержат зернистые образования. Морфология существенно варьирует в зависимости от возраста культуры и условий культивирования — в молодых культурах палочки более длинные, а в старых склонны к простому ветвлению. Иногда образуют кокковидные структуры и L-формы, сохраняющие инфекционность. Неподвижны, спор не образуют, лишены капсул, но имеют микрокапсулу, отделенную от клеточной стенки осмиефобной зоной. Кислотоустойчивы, что обусловлено высоким содержанием липидов (от 30,6% до 38,9%) и миколовой кислоты с длинными цепями атомов углерода (до 80) в клеточной стенке. Образуют кислотолабильные гранулы, преимущественно состоящие из метафосфата (зерна Муха), располагающиеся свободно либо в цитоплазме палочек. Грамположительны, анилиновые красители воспринимают плохо; по Циль-Нильсену окрашиваются в ярко-красный цвет, по Муху-Вайссу — в фиолетовый (йодофильность); гранулы также окрашиваются в соответствующий цвет.

Культуральные свойства

Аэробы, но способны расти в факультативно анаэробных условиях; 5-10% содержание CO₂ способствует более быстрому росту. Размножаются делением, процесс проходит очень медленно, в среднем за 14-18 ч. Оптимум температурный — 37-38°C, pH 7,0-7,2 (растет в пределах 4,5-8,0).

Таблица 25. Основные дифференциально-диагностические морфологические и ростовые характеристики микобактерий

Вид	Колонии		Рост	
	Морфология	Пигмент*	Скорость**	Температура
<i>M. tuberculosis</i>	R-колонии	H (кремовые)	Медленная	31-37
<i>M. bovis</i>	Мелкие, прозрачные R-колонии	H (бесцветные или кремовые)	Медленная	37
<i>M. africanum</i>	R-колонии	H	Медленная	37
<i>M. aviumintracellulare</i>	Мелкие, выпуклые, мутные S-колонии, реже R-диссоциаты	H (иногда окрашены)	Медленная (более 8 нед)	37 (оптимум): растет от 25 до 45
<i>M. scrofulaceum</i>	Круглые S-колонии	C (желто-оранжевые)	Медленная	25-37
<i>M. kansasii</i>	R-колонии, содержат кристаллы β-каротина	Φ (редко H или C)	Медленная	25-37
<i>M. fortuitumcheloneae</i>	S- и R-колонии	H(кремовые)	Быстрая	25-40
<i>M. xenopi</i>	S-колонии с выростами	H(C)	Медленная	42-43 (оптимум)
<i>M. szulgai</i>	S- и R-колонии	C (37°C); Φ(25°C)	Медленная	25-37
<i>M. malmoense</i>	S-колонии	Бесцветные	Умеренная	25-37
<i>M. simiae</i>	S-колонии	Φ (при дли тельной экспозиции)	Медленная	37
<i>M. marinum</i>	Неровные, блестящие S-колонии; реже R-диссоциаты	Φ	Умеренная	31-33 (оптимум)
<i>M. haemophilum</i>	R-колонии; реже S-диссоциаты	H	Медленная	20-32 (оптимум)
<i>M. gordonae</i>	S-колонии	C, оранжевые	Медленная	25-37
<i>M. asiaticum</i>	?	Φ	Медленная	25-37
<i>M. thermoresistibile</i>	Чаще S-колонии; реже R-диссоциаты	Φ (желто-оранжевые, позднее коричневые)	Быстрая	37-45 (оптимум)
<i>M. terratriviale</i>	S- (<i>M. terra</i>) и R- (<i>M. triviale</i>) колонии	H	Медленная	25-37
<i>M. nonchromogenicum</i>	R-колонии	H	Медленная	25-37
<i>M. flavescens</i>	S-колонии	C	Умеренная	25-37
<i>M. smegmatis</i>	Чаще R-колонии; реже S-диссоциаты	H (кремовые)	Быстрая	25-45
<i>M. shimoidei</i>	R-колонии	H	Медленная	37

* H — нефтохромогенные; C — скотохромогенные; Φ — фотохромогенные.

** Скорость роста на твердых средах: медленная — рост в течение 4-6 недель; умеренная — рост в течение 2-3 недель; быстрая — в течение 5-7 суток.

Для роста нуждаются в присутствии белкового субстрата и глицерина, а также углерода, хлора, серы, фосфора, азота, факторов роста (биотина, никотиновой кислоты, рибофлавина и др.), ионов (Mg^{2+} , K^+ , Na^+ , Fe^{2+}). Для выращивания наиболее часто используют плотные яичные среды (Левенштайна-Йенсена, Виноградова, Петраньяни, Дорсе и др.), синтетические и полусинтетические жидкие среды (например, среда Сотона) и др. На жидких средах рост наблюдают на 15-17 сутки в виде сухой морщинистой пленки (R-форма) поднимающейся на края пробирки; среда остается прозрачной. В средах, содержащих детергент (твин-80), дают равномерный рост по толще среды (особенно при периодическом встряхивании). На плотных средах рост отмечают на 14-40 сутки в виде, сухого морщинистого налета кремового цвета; колонии с приподнятым центром, напоминающие цветную капусту, крошковатые, плохо смачиваются водой и имеют приятный аромат. Культуры плохо снимаются со среды, а при прокаливании трещат. Под влиянием антибактериальных препаратов могут диссоциировать с образованием мягких влажных S-колоний либо расти в виде гладких или пигментированных колоний. Отличительная особенность *Mycobacterium tuberculosis* — способность к синтезу значительного количества никотиновой кислоты, что используют для ее дифференциальной диагностики с прочими микобактериями (ниациновый тест); одно из условий — необходимость посева на среду Левенштайна-Йенсена, не содержащую маляхитовый зеленый (т.к. краситель вступает в реакцию с используемыми реагентами). На средах с желчью образуют сероватый маслянистый налет, образованный удлиненными ветвящимися палочками.

Палочка Коха достаточно устойчива к различным воздействиям; в молоке погибает через 15-20 минут при температуре 60°C; при аналогичной температуре в мокроте сохраняется до часа; при кипячении погибает через 5 минут. Прямой солнечный свет убивает палочку Коха через 45-55 минут, рассеянный свет — через 8-10 суток. Хорошо сохраняется при высушивании (до нескольких недель). Обычные химические дезинфектанты относительно мало эффективны; 5% раствор фенола убивает *Mycobacterium tuberculosis* лишь через 5-6 ч; возбудитель также способен быстро вырабатывать устойчивость ко многим антибактериальным средствам.

Патогенез поражений и клинические проявления

Наиболее часто заражение происходит посредством ингаляции аэрозоля, содержащего микобактерии, либо при употреблении контаминированных продуктов. Ингалированные микобактерии фагоцитируют альвеолярные и легочные макрофаги и транспортируют их в регионарные лимфатические узлы; фагоцитарные реакции носят незавершенный характер, и возбудитель переживает в цитоплазме макрофагов. Способность снижать активность фагоцитов обуславливают сульфатиды (серосодержащие гликолипиды), усиливающие токсическое действие корд-фактора (поражает мембраны митохондрий) и ингибирующие фагосомо-лизосомальное слияние. Воспалительный ответ обычно не

выражен, что в значительной степени опосредовано способностью корд-фактора тормозить миграцию полиморфноядерных фагоцитов. Но в месте проникновения может развиваться первичный аффект. В динамике по ходу регионарных лимфатических путей и узлов формируется первичный комплекс, характеризующийся развитием гранулем в виде бугорков (отсюда бугорчатка, или туберкулез).

Образование гранулем не имеет характерных особенностей и представляет собой клеточную реакцию ГЗТ. Сенсибилизация организма обусловлена действием ряда продуктов микобактерий, известных как старый туберкулин Коха, проявляющих местный и системный эффект. В определенной степени формированию гранулем способствуют образование большого количества молочной кислоты, низкое значение рН и высокая концентрация CO_2 . Туберкулезная грануляционная ткань содержит также значительное количество лимфоидных и плазматических клеток, а в периферических отделах выявляют фибробласты. В центре каждого бугорка расположен участок творожистого некроза (казеоза), где располагаются палочки Коха. Участок некроза окружен эпителиоидными и гигантскими (многоядерными) клетками Пирогова-Ланганса. Центр окружают эпителиоидные клетки, а по периметру — лимфоциты, плазмциты и мононуклеары, наиболее часто первичный очаг наблюдают в легких (очаг Гона). В гранулемах размножение возбудителя обычно замедляется или прекращается совсем.

Довольно характерен «период латентного микробизма» — состояние, при котором проникшие микобактерии не вызывают развития воспалительных реакций и свободно диссеминируют по организму. В большинстве случаев первичные очаги заживают с полной деградацией содержимого, его кальцификацией и фиброзом паренхимы.

Клинические проявления обычно отсутствуют либо напоминают гриппоподобный синдром, иногда первичный очаг или увеличенные бронхолегочные лимфатические узлы можно выявить рентгенологически.

Для первичного туберкулеза характерна высокая чувствительность тканей к метаболитам микобактерий, что способствует их сенсибилизации, при заживлении аффекта повышенная чувствительность исчезает и нарастает выраженность иммунных реакций. Однако в этих условиях возможно диссеминирование возбудителя из первичных очагов (особенно лимфатических узлов) и формирование очагов отсевов (послепервичные очаги реинфицирования); обычно они локализованы в легких, почках, половых органах и костях.

При ослаблении иммунитета организма очаги активизируются и прогрессируют с развитием вторичного процесса. Определенный вклад в патогенез заболевания вносит сенсибилизация организма, вызывающая разнообразные токсико-аллергические реакции у пациентов.

В более редких случаях, у ослабленных организмов, а также у пациентов с иммунодефицитами, наблюдают диссеминированный (милиарный) туберкулез, характеризующийся образованием гранулем в различных органах.

Развитие генерализованных поражений наиболее часто происходит после прорыва содержимого гранулемы в кровотоки.

Общие проявления аналогичны таковым при вторичном туберкулезе, но к ним часто присоединяются поражения мозга и его оболочек, прогноз подобной формы заболевания неблагоприятный.

Многообразие форм туберкулезного процесса обусловило сложность его классификации. В настоящее время клиническая классификация выделяет три основные формы.

- Туберкулезная интоксикация у молодых особей.
- Туберкулез органов дыхания, включая первичный комплекс, поражения внутригрудных лимфатических узлов, плевры, верхних дыхательных путей, очаговый, инфильтративный, кавернозный, фиброзно-кавернозный, цирротический туберкулез легких, туберкулема и др.
- Туберкулез других органов и систем, включая поражения мозговых оболочек, глаз, суставов и костей, кишечника и брюшины, кожи и подкожной клетчатки (папуло-некротический туберкулид Бека), органов мочеполовой системы и др.

При постановке клинического диагноза учитывают также локализацию, протяженность и фазу процесса, а также способность к активному выделению микобактерий.

Лабораторная диагностика

Лабораторная диагностика (рис. 21) включает методы, входящие в обязательный диагностический минимум, и дополнительные методы исследования. Первые включают, помимо физикального и рентгенологического исследования, следующие манипуляции.

В случае заболевания микроскопия патологического материала (мокрота, отделяемое свищей, моча, промывные воды из бронхов) в мазках, окрашенных по Цилю-Нильсену, может выявить красные кислотоустойчивые палочки, в последние годы в практику внедрен метод Мурахаси-Йошиды (1957), позволяющий дифференцировать мертвые и живые бактерии. Однако бактериоскопический метод наименее чувствителен, т.к. позволяет выявить возбудитель при содержании 100 000-500 000 микобактерий в 1 мл материала.

При незначительном содержании возбудителя можно использовать метод накопления по Уленгуту — материал смешивают с равным или двойным объемом смеси NaCl и NaOH, энергично встряхивают и инкубируют 30 минут при температуре 21°C. Затем клеточный детрит и посторонние бактерии (в виде супернатанта), разрушившиеся под действием щелочи, удаляют центрифуги-

рованием; осадок нейтрализуют 30% раствором уксусной кислоты и готовят мазки, окрашиваемые по Цилю-Нильсену или Киньону.

Более эффективен метод флотации — в материал вносят раствор NaOH, дистиллят и ксилол (бензол) и энергично длительно встряхивают, образующаяся пена всплывает и захватывает микобактерий; ее отсасывают и готовят мазки.

Определенную ценность в оценке тяжести процесса, эффективности лечения и прогноза заболевания имеет количественная оценка популяции микобактерий методом Гаффки-Стинкена (подсчет бактерий на калиброванных стеклах в определенных полях зрения). Наиболее результативный бактериоскопический метод — люминесцентная микроскопия, т. к. окраска флюорохромом (например, аурамин-родамином) позволяет выявлять даже незначительное количество микобактерий (окрашиваются в бело-желтый цвет), а также формы с измененными культуральными и тинкториальными свойствами.

Выделение возбудителя

Перед посевом исследуемый материал можно обработать по Уленгуту или Сумиоши (15-20% раствором HCl или H₂SO₄), исследуемые образцы центрифугируют, отмывают физиологическим раствором и засевают, тщательно протирая, на твердые питательные среды (обычно Левенштайна-Йенсена). Для простоты можно обработать образцы различными антибиотиками, подавляющими рост контаминирующей флоры. Недостаток метода — длительность получения результата от 2 до 12 недель; достоинство — возможность получения чистой культуры, что позволяет ее идентифицировать, оценить вирулентные свойства и определить чувствительность к лекарственным препаратам.

Разработаны ускоренные методы выделения возбудителя (например, Прайса): материал помещают на предметное стекло, обрабатывают H₂SO₄, отмывают физиологическим раствором и вносят в питательную среду, дополненную цитратной кровью. Стекло вынимают через 3-4 суток и окрашивают по Цилю-Нильсену.

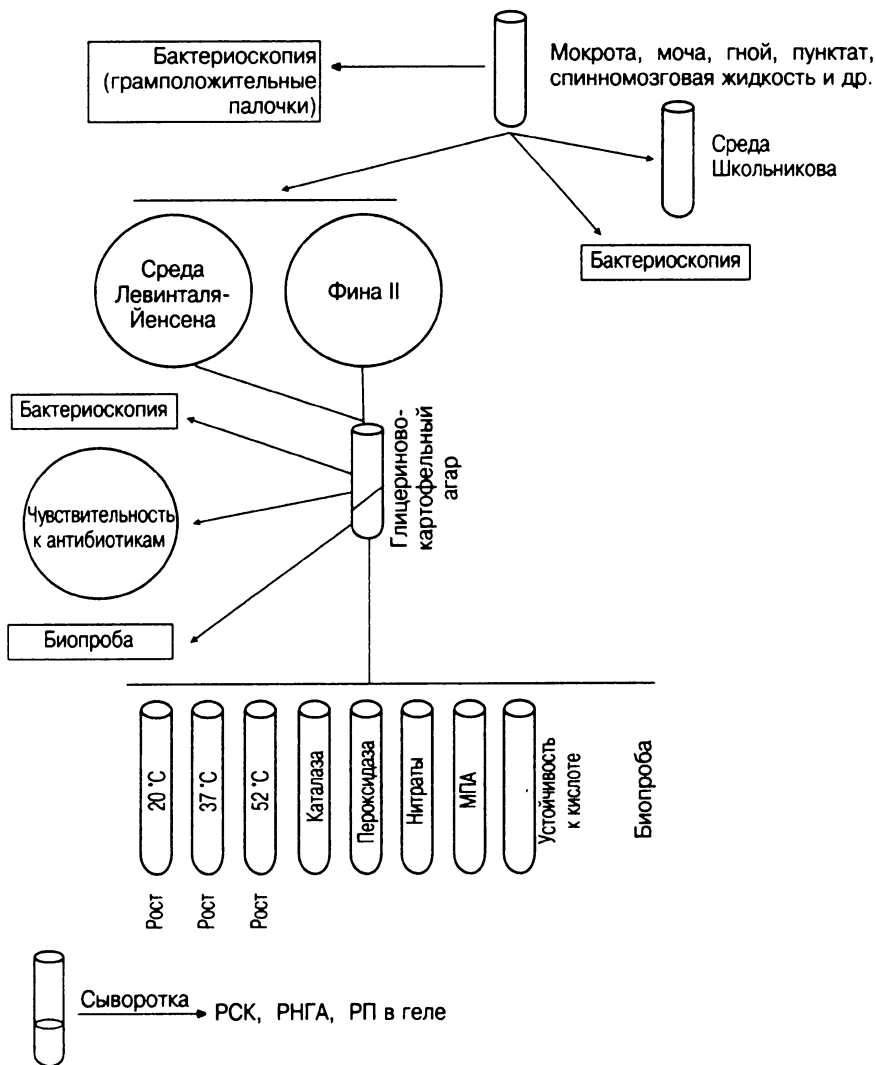
Биологическая проба

«Золотой стандарт» в диагностике туберкулеза — биологическая проба на морских свинках, зараженных подкожно или внутрибрюшинно 1 мл материала, полученного от больного.

У животных развивается генерализованная инфекция, приводящая к смерти через 1-2 месяца; однако заболевание можно распознать раньше постановкой проб с туберкулином — через 3-4 недели после заражения, а лимфадениты обнаруживают уже на 5-10 сутки. Пунктаты последних содержат значительное количество микобактерий.

Появление в последние годы резистентных (особенно изониазид-устойчивых) или измененных микобактерий снизило чувствительность биологической пробы. Для ее повышения применяют интратестикулярное заражение

либо подавляют иммунитет организма животных введением глюкокортикоидов.



Кожная проба гиперчувствительности замедленного типа (проба Манту)

Рисунок 21. Принципиальная схема бактериологического выделения возбудителей туберкулеза

Серологические исследования

Предложено большое количество различных реакций, выявляющих Ag микобактерий и АТ к ним, например РСК, РА, РПГА по Бойдену, агрегатагглютинации и др.; однако они либо не обладают необходимой специфичностью, либо требуют дифференциальной диагностики при получении ложноположительных реакций с Ag и АТ к другим микобактериям.

Кожные пробы с туберкулином

Имеют особую значимость, т.к. позволяют проводить широкомасштабные скрининговые обследования населения; метод включает внесение небольших доз ППД-Л (новый туберкулин Коха) в кожные насечки (реакция Пирке), внутрикожно (реакция Манту) и подкожно (реакция Коха). При положительном результате через 48 ч (у пожилых лиц — через 72 ч) в месте введения формируется папула диаметром 10 мм с гиперемизированными краями. В большинстве стран наиболее распространена проба Манту, т.к. результаты реакции Пирке часто вызывают затруднения при их интерпретации.

Положительная реакция Манту указывает на контакт лица с Ag *Mycobacterium tuberculosis* или других бактерий, дающих перекрестную реакцию; *положительный результат нельзя рассматривать как признак активного процесса.*

При появлении папулы меньших размеров (5-10 мм) результат считают сомнительным, и рекомендовано повторить пробу с введением 10 ЕД. При еще меньших размерах папулы реакцию считают отрицательной; следует помнить, что *отрицательная реакция Манту не всегда указывает на отсутствие процесса*, т.к. у больных с иммунодефицитами реакция обычно также отрицательна.

Дополнительные лабораторные методы

Включают оценку иммунного статуса пациента, что имеет прогностическое значение, т.к. у больных с дефектами Т-лимфоцитов прогноз хуже.

Лечение

Разработка средств лечения туберкулеза — важная страница в истории бактериологии, ставшей трагедией всей жизни Роберта Коха. В 1890 г. он доложил на X Международном съезде врачей о терапевтической эффективности экстракта убитых туберкулезных бактерий, названного им туберкулин (старый туберкулин), и опубликовал сообщение в «*Deutsche Medizinische Wochenschrift*». Значимость открытия была так велика, что автор был награжден орденом Красного Орла (чего не удостоивался ни один медик). Однако широкое применение препарата показало, что он не только не излечивал, но и активизировал латентный процесс, что вызвало бурную критику в прессе. Следует отметить, что и в настоящее время арсенал специфической химиотерапии остается небольшим, особенно учитывая способность микобактерий к разви-

тию резистентности. Противотуберкулезные средства разделяют на препараты первого ряда и альтернативные средства.

Первая группа включает изониазид, этамбутол, стрептомицин, пиперазинид, рифампицин: комбинация из двух препаратов обычно позволяет преодолеть химиорезистентность возбудителя.

Альтернативные средства — канамицин, циклосерин, парааминосалициловая кислота (ПАСК), этионамид, виомицин, капуреомидин и тиоацетазон.

Лечение активного туберкулеза требует проведения интенсивной терапии, при положительных результатах выделение возбудителя прекращается в среднем в течение 2–4 недель, и больного можно выписать из стационара, но лечение следует проводить не менее года.

Профилактика туберкулеза

Включает соблюдение элементарных правил гигиены, а также проведение специализированных мероприятий по диспансеризации больных лиц и широкомасштабному профилактическому обследованию населения.

При положительной кожной пробе и отсутствии признаков активного процесса назначают изониазид курсом до года.

Иммунопрофилактика включает внутрикожное введение аттенуированного штамма *Mycobacterium bovis* (штамм Лейт-Нокар-Альфорт), известного как бацилла Кальметта-Герена (БЦЖ).

Mycobacterium bovis

Возбудитель туберкулеза крупного рогатого скота, вызывает 5% случаев туберкулеза у человека. Морфологические отличия от *Mycobacterium tuberculosis* не выражены, микобактерии бычьего типа несколько короче, с менее выраженной склонностью к ветвлению. Культуральные свойства также сходны; однако на искусственных средах растут медленно и только при температуре 37°C, в глицерине не нуждаются. В первичных культурах и на средах, не содержащих пируват, отмечают скудный рост; колонии мелкие, плоские, шероховатые. Принципы выделения аналогичны таковым для микобактерий человеческого типа (рис. 21). Основными методами дифференциальной диагностики с *Mycobacterium tuberculosis* считают ниациновый тест и биологическую пробу на кроликах (кролики резистентны к заражению *M. tuberculosis*). Возбудитель — рекордсмен по числу возможных хозяев и выявлен у 60 видов млекопитающих, но эпидемическую опасность для человека представляют крупный рогатый скот (наибольшее значение), верблюды, козы, овцы, свиньи, собаки и кошки. Больные животные выделяют микобактерии с молоком, мочой и калом: человек заражается при контактах с больным животным или при употреблении сырого молока, или (реже) плохо обработанного мяса. В сливочном масле возбудитель может сохраняться до 240 суток, в сыре — до 200 суток.

Mycobacterium africanum

Основной возбудитель туберкулеза в Африке, морфологически и культурально сходен с *Mycobacterium bovis*; идентифицирован Кастетсом с соавторами (1968-1969) при изучении вспышки туберкулеза в Западной Африке. Истинное распространение возбудителя определить сложно, т. к. во многих лабораториях его не идентифицируют либо путают с *M. bovis*, во всяком случае, при обследовании более чем 7000 больных туберкулезом в Великобритании выявлено свыше 90 случаев инфицирования *M. africanum*.

Mycobacterium avium

Возбудитель туберкулеза птиц. Бактериальные клетки тонкие, от коротких до длинных, иногда ветвятся. Оптимум температуры 38-41°C, pH 6,8-7,3. На питательных средах растет быстрее (10-20 дней), чем *M. bovis* и *M. tuberculosis*.

На плотных яичных средах растет в виде гладкого маслянистого налета. Колонии округлые, слизистые, мягкие, серовато-белые, с возрастом могут желтеть. Могут иметь пуговицеобразное возвышение с кратерообразным углублением. При первичной изоляции из патологического материала колонии плоские и полупрозрачные. Бактериальная масса легко суспендируется в физиологическом растворе. В жидких питательных средах возбудитель дает диффузный рост, на поверхности формируется влажная жирная пленка, на дне рыхлый осадок. Вид антигенно неоднороден. Дифференцируют три серовара. Серовар 2 отличается большой патогенностью для кур (Molmsky, Schaeter, 1973).

Кроме больных птиц, может быть изолирован из лимфатических узлов и пораженных тканей крупного рогатого скота, свиней и других животных. В эксперименте при внутривенном заражении кур обуславливает заболевание с летальным исходом в течение месяца, реже позднее. На вскрытии у павших кур обнаруживают очаги в печени и селезенке. У зараженных внутривенно кроликов развивается септический процесс, и они гибнут на 11-30-е сутки. После подкожного заражения у морских свинок наблюдают изменения (абсцесс) на месте инъекции.

В соответствии с «Наставлением по диагностике туберкулеза животных» (1986) бактериологическое исследование предусматривает микроскопическое исследование препаратов, окрашенных по методу Циля-Нельсена, люминесцентную микроскопию, выделение культуры посевом материала на стерильные питательные среды (Петраньяни, Гельберга, Левенштейна-Иенсена). Выделенные культуры идентифицируют с учетом скорости появления первичного роста, культурально-морфологических и тинкториальных свойств, способности к росту при различных температурных режимах (20-25, 37-38, 45°C) на разных питательных средах (яичные, яичные с салицилатом натрия, МПБ).

Проводят биопробу с целью обнаружения возбудителя в испытуемом материале или определения видовой принадлежности выделенной культуры микобактерий. Вид подопытного животного определяется целью исследования (морские свинки, куры, кролики).

Mycobacterium paratuberculosis

Возбудитель паратуберкулеза. Болеют крупный рогатый скот, овцы, козы и другие виды домашних и диких животных. Клетки палочковидной формы, размером $0,6-2,0 \times 0,2-0,5$ мкм, окрашиваются равномерно, однако в удлинённых клетках могут наблюдаться неоднородные по тинкториальным свойствам участки. В старых культурах возможно наличие кокковидных или удлинённых форм. В мазках из патологического материала характерно расположение клеток кучками, в виде «палисада».

Культивирование затруднительно. Поэтому в питательные среды добавляют, особенно при первичной изоляции, ростовой фактор — микобактин (0,03 мкг/мл). Остальные микобактерии продуцируют его самостоятельно. Препарат микобактина можно заменить экстрактами из микобактерий других видов, которые вносят в питательную среду в количестве 1-4%. Наибольшее количество ростового фактора содержится в экстрактах из *M. phlei* (Twort, Ingram, 1913).

Аэроб, температурный оптимум 38°C. В жидких питательных средах растёт с образованием нежной, беловатой плёнки (через 3-4 месяца культивирования становится толще и опускается на дно пробирки). На плотных питательных средах макроскопически видимый рост появляется через 1,5-2 месяца. Колонии сухие, сморщенные, беловато-серого или желтого цвета

Mycobacterium intracellulare

Изолируют при ограниченных поражениях у свиней, крупного рогатого скота и туберкулезоподобной патологии у людей.

Наряду с перечисленными видами в природе обитают микобактерии, не вызывающие патологию у животных, но способные сенсибилизировать организм и обуславливать положительные реакции на туберкулин. К этой группе микобактерии относятся следующие виды: *M. xenopi*, *M. ulcerans*, *M. haemophilum*, *M. farcinogenes*, *M. malmoense*, *M. asiaticum*, *M. gordone*, *M. szulgai*, *M. shimoidei*, *M. simiae*, *M. serofuicium*, *M. microti*, *M. kansassii*, *M. nonchromogenicum* и др.

Питательные среды для культивирования патогенных микобактерий

Среда Петраньяни. В стерильную колбу со стеклянными шариками вносят 250 мл свежего цельного молока, 6 г картофельной муки, 1 г пептона, одну

мелко нарезанную картофелину размером с куриное яйцо. Помешивая, выдерживают колбу с содержимым в кипящей водяной бане 10 минут, охлаждают до 60°C и вносят один желток и содержимое 4 свежих куриных яиц, 12 мл стерильного глицерина, 6 мл 2%-ного (на дистиллированной воде) раствора малахитового зеленого. Компоненты перемешивают, фильтруют через двойной слой марли, разливают по стерильным пробиркам и свертывают в наклонном положении в аппарате Коха при 85°C 30 минут. В последующие двое суток прогревают при 75°C по 15 минут. Готовая среда светло-зеленого цвета. Хранят на холоде.

Среда Левенштейна-Иенсена. Готовят солевой раствор следующего состава. В 600 мл дистиллированной воды растворяют первоначально 2,4 г основного фосфата калия, далее последовательно 0,24 г сульфата магнезии, 0,6 г цитрата магнезии, 3,6 г L-аспарагина, 12 г химически чистого глицерина. Раствор стерилизуют текучим паром 120 минут, добавляют 30 г картофельного крахмала, разливают в колбы по 150 мл и нагревают в кипящей водяной бане до загустения смеси.

Затем готовят яичную массу. В литровую стерильную колбу с бусами асептично вносят содержимое 20-22 куриных яиц (свежих), перемешивают, фильтруют через марлю. К 1000 мл яичной смеси добавляют 20 мл стерильного 2%-ного раствора малахитового зеленого и перемешивают.

К 1 л яичной смеси с малахитовым зеленым добавляют 600 мл солевого раствора с крахмалом, выдерживают около одного часа до исчезновения пузырьков, асептично разливают по 8-10 мл в пробирки и в скошенном положении в аппарате Коха прогревают при 80-85°C 40 минут. Далее выдерживают в термостате для контроля стерильности. Хранят на холоде. Если среду используют для определения лекарственной устойчивости микроорганизмов, крахмал не добавляют.

Яичная среда Гельберга. Пять свежих куриных яиц моют, обтирают спиртом, слегка обжигают, вскрывают. Асептично извлекают два желтка и помещают их в стерильную колбу с бусами, встряхивают. Добавляют 50 мл солевого раствора, 50 мл молока, 50 мл картофельного отвара, 2,5 мл 10%-ного стерильного раствора лимонной кислоты. Компоненты перемешивают, добавляют 3,5 мл 2%-ного раствора малахитового зеленого и вновь содержимое колбы тщательно перемешивают. Смесь фильтруют через стерильную марлю и по 4-6 мл разливают в пробирки. Стерилизуют в аппарате Коха при 85°C 60 минут однократно. Готовую питательную среду для контроля стерильности выдерживают 48 ч в термостате. Используют в течение недели после изготовления при хранении на холоде.

Приготовление картофельного отвара. Очищенный и нарезанный картофель заливают двойным (по весу) количеством воды, кипятят 15 минут, отстаивают, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают в колбы по 110 мл и стерилизуют при 120°C 20 минут.

Приготовление молока. Снятое коровье молоко разливают по 110 мл в колбы, стерилизуют первый день при 105°C 10 минут и второй — 15 минут текущим паром.

2%-ный раствор малахитового зеленого стерилизуют при 120°C 20 минут. 10 г кристаллической лимонной кислоты растворяют в 100 мл дистиллированной воды, разливают по 10 мл в пробирки и стерилизуют 20 минут при 120°C.

Приготовление солевого раствора. Берут K_2HPO_4 — 1 г, натрия лимоннокислого — 1 г, магнезии сернокислой — 1 г, пептона — 6 г, глицерина химически чистого — 30 мл, воды дистиллированной — до 1000 мл. Каждый компонент растворяют в небольшом количестве воды, потом вносят глицерин и добавляют дистиллированную воду до 1000 мл. Смесь слегка подогревают, фильтруют через бумажный фильтр, разливают в колбы по 110 мл и стерилизуют 20 минут при 105°C.

Картофель Павловского. Белый картофель тщательно моют с мылом, насухо вытирают, очищают, прокаленным ножом срезают оба полюса картофелины. Специальным стерильным бором вырезают из картофеля цилиндры длиной 5—6 см, шириной в соответствии с диаметром пробирки. Цилиндры по диагонали разрезают на два клина и опускают последние в 5%-ную стерильную глицериновую воду на 1-2 ч. Далее клинья подсушивают при помощи стерильной фильтровальной бумаги и пинцетом опускают в пробирки Р_у с перетяжкой, содержащие в нижней части 5%-ную стерильную глицериновую воду (рН 7,0-7,2), с расчетом, чтобы нижняя часть картофельного клина касалась жидкости. Пробирки стерилизуют при 110°C 10 минут. Сразу после стерилизации пробирки размещают в наклонном положении поверхностью посевов вниз, что позволяет сохранить их влажными. Стерильность контролируют выдерживанием пробирки в термостате в вертикальном положении двое суток. Хранят на холоде.

Среда Петрова. Приготавливают компоненты. Смешивают 500 г мясного говяжьего фарша с 500 мл 15%-ной глицериновой воды и выдерживают 24 ч на холоде. Перед употреблением фильтруют.

Асептически извлекают содержимое куриных яиц, помещают в мерный цилиндр и перемешивают. Далее готовят 1%-ный спиртовой раствор генцианвиолета и выдерживают 24 ч в термостате. Для изготовления среды в 1 часть мясного настоя вносят 2 части яичной смеси и 1 мл раствора генцианвиолета на каждые 100 мл среды. Компоненты тщательно перемешивают, разливают по пробиркам и прогревают первый день при 85°C, а два последующих дня — при 75°C по 45-60 минут. Готовую среду контролируют на стерильность, выдерживая в термостате 3-5 дней.

Яично-картофельная среда Виноградова. Вымытый, очищенный и нарезанный мелкими кусочками картофель заливают водой (1:2) и варят при 120°C 1,5 ч. Горячий отвар фильтруют через марлю. В фильтрат вносят 1% пептона, 0,5% натрия хлорида, 5% глицерина. Смесь стерилизуют в автоклаве и исполь-

зуют по мере необходимости. При изготовлении среды к 1 части картофельного отвара добавляют 2 части яичной смеси, перемешивают, разливают по пробиркам и прогревают при 90°C. Затем в каждую пробирку вносят 0,5-1,0 мл МПБ с глицерином или картофельного отвара и повторно стерилизуют при 100°C два дня по 45 минут.

Среда Дорсе. Вымытые куриные яйца помещают на 10-15 минут в сосуд с этиловым спиртом, затем обжигают на пламени горелки, содержимое асептично переносят в колбу с известным весом и доливают 10% (вес/вес) дистиллированной воды. Смесь тщательно перемешивают, фильтруют через стерильную марлю, разливают по пробиркам и свертывают в наклонном положении при 70-75°C 60 минут. Контролируют на стерильность, выдерживая 3 суток в термостате.

Среда Международной лиги борьбы с туберкулезом (MIUT). Среда Левенштейна-Иенсена без крахмала. Пробки в пробирках герметизируют парафином, хранят при 4°C. Среда пригодна для использования в течение полугода.

Кислотная яичная среда №1а (Zaher, Marks, 1977). В 600 мл дистиллированной воды растворяют 6,3 г KH_2PO_4 , 0,3 г $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 12 мл глицерина и автоклавируют при 110°C 15 минут. К раствору асептически добавляют 1100 мл полной яичной смеси, 3 мл 1 н HCl, 11 мл раствора малахитового зеленого (2%-ный вес/объем) и 100 000 ЕД натриевой соли пенициллина. Среду разливают по пробиркам, прогревают при 75-85°C 45 минут.

Кислотная яичная среда №1б. Готовится аналогично среде №1а, вместо глицерина добавляют 7 г натрия пирувата.

Кислотная яичная среда №2а (Zaher, Marks, 1977). В 600 мл дистиллированной воды растворяют 2,4 г KH_2PO_4 , 0,3 г $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 12 мл глицерина, автоклавируют при 110°C 15 минут. Солевой раствор асептично смешивают с 1000 мл полной яичной смеси, добавляют 40 мл 1 н HCl, 10 мл раствора малахитового зеленого (2%-ный раствор вес/объем) и 100 000 ЕД натриевой соли пенициллина.

Кислотная яичная среда №2б. Готовится аналогично среде №2а, глицерин замещают 7 г натрия пирувата.

Кислотные яичные среды предназначены для выделения возбудителя туберкулеза из материалов, подвергнутых обработке различными способами. Для посева высокощелочных инокулятов рекомендуются среды № 1а и 1б, нейтральных и кислых — № 2а и 2б, без добавления HCl (Zaher, Marks, 1977).

Глицериновый МПБ. К МПБ добавляют 5-10% химически чистого глицерина, pH 7,2, стерилизуют при 110°C. На основе глицеринизированного МПБ, добавляя агар-агар, готовят глицериновый МПА.

Синтетическая среда Сотона. В 940 мл дистиллированной воды растворяют 0,5 г двухосновного фосфорнокислого калия, 0,5 г сернокислой магнезии, 0,05 г лимоннокислого аммиачного железа, 2 г лимонной кислоты, 4 г аспарагина, 60 мл глицерина химически чистого.

Кровяная среда. Непосредственно перед посевом дистиллированной водой 1:2-1:3 разводят стерильную нитратную кровь, разливают по 3 мл в пробирки и вносят раствор пенициллина из расчета 2 ЕД/мл (Тогунова, 1973).

Синтетическая среда Вишневого. Берут 3 г аспарагина, 7 г щавелевокислого аммония, 5 г двухосновного фосфорнокислого калия, 0,5 г сернокислого магния, 0,05 г сернокислого железа, 40 мл глицерина и дистиллированной воды до 1000 мл. Подщелачивают до pH 6,8-7,2, фильтруют через бумажный фильтр и стерилизуют 30 минут при 120°C.

Среда Данкина. Используют для культивирования *M. paratuberculosis*. На 4%-ном глицериновом бульоне выращивают 10-15 суток культуру *M. phlei*. Путем фильтрации через бу мл мажный фильтр отделяют бактериальную массу, переносят ее в ступку с 10 мл глицерина и 100 мл печеночного экстракта Дедляу. Смесь несколько минут кипятят, отстаивают и надсадочную жидкость сливают в мерный сосуд, добавляют содержимое трех куриных яиц. Перемешивают и вносят 2,5% (объем/объем) 1%-ного спиртового раствора генцианвиолета. Фильтруют через стерильную марлю, разливают по пробиркам и помещают в аппарат для свертывания. Стерилизуют дробно, первый день при 80°C до уплотнения среды и два дня подряд по 60 минут при 80°C.

Печеночный экстракт по Дедляу. В 1000 мл воды вносят 400 г говяжьей печени, стерилизуют 120 минут текучим паром и фильтруют через марлю. Устанавливают pH 7,0. Фильтрат разливают по емкостям и стерилизуют при 100°C по 20 минут в течение 3 дней.

Среда Ренжара. Используют для культивирования *M. paratuberculosis*. Смешивают 4 части печеночного (pH 7,3) и 8 частей телячьего бульона (pH 7,3), добавляют 3% агар-агара. После растворения агара смесь фильтруют, вносят 5% глицерина и 1 часть глицериновой вытяжки из *M. phlei*, стерилизуют при 115°C 20 минут. Среду охлаждают до 55°C. Добавляют 1 часть сыворотки крови крупного рогатого скота, прогретой при 56-58°C, разливают по пробиркам и окрашивают.

Приготовление вытяжки из *M. phlei*. Бактериальную массу *M. phlei*, выращенную на глицериновом бульоне, фильтруют через бумажный фильтр. 5 г биомассы растирают с 30 мл 20%-ного раствора глицерина в дистиллированной воде, встряхивают, прогревают при 110-120°C 1,5 ч. Центрифугированием отделяют жидкую часть, которую и используют для изготовления среды.

Микроорганизмы рода Mycoplasma

Микоплазмы (или молликуты), бактерии без клеточной стенки. Клетки ограничены только трехслойной цитоплазматической мембраной и неспособны к синтезу пептидогликана. Соответственно, эти микроорганизмы устойчивы к пенициллину и его аналогам, угнетающим синтез пептидогликана, но чувствительны к лизису, вызываемому осмотическим шоком, детергентами, спиртами. Большинство видов — факультативные анаэробы; представлены мелкими (0,1-

0,45 мкм) клетками, характеризующимися выраженным плеоморфизмом; могут образовывать кокковидные, ветвящиеся и более крупные многоядерные формы, способные образовывать псевдомицелий. Обычно размножаются бинарным делением, подобно большинству бактерий, особенно после образования мелких кокковидных образований (элементарные тельца) в нитевидных структурах. Также способны к почкованию и сегментации. Включают подвижные и неподвижные виды, грамтрицательны (лучше окрашиваются по Романовскому-Гимзе), нуждаются в стеролах и нативном белке. На плотных средах образуют характерные мелкие колонии с приподнятым центром («яичница-глазунья»), имеющие тенденцию вращаться в среду; морфология колоний достаточно специфична — на поверхности располагаются крупные, часто вакуолизированные клетки, в глубине — мелкие оптически плотные организмы. Вызывают адсорбцию, агглютинацию и лизис эритроцитов. У человека и животных выделяют представителей родов *Mycoplasma*, *Ureaplasma* и *Acholeplasma*, включающих патогенные и сапрофитные виды. В частности, человек — естественный хозяин 12 видов микоплазм — *M. buccale*, *M. fermentans*, *M. hominis*, *M. pneumoniae*, *M. genitalium*, *M. lipophilum*, *M. orale*, *M. faucium*, *M. primatum* и *M. salivarium*. Представители других родов — *Ureaplasma urealyticum* и *Acholeplasma laidlawii* — патогенны для человека.

Первые патогенные микоплазмы обнаружены Нокаром, Ру, Бореллем и др. (1893-1898), выделившими возбудителя контагиозной перипневмонии крупного рогатого скота (в настоящее время классифицирован как *M. mycoides*), полное морфологическое описание возбудителя проведено Борде (1910) и Бореллем с соавторами (1910), М.Г. Тартаковский и Е.П. Джунковский позднее разработали способы его культивирования. Первоначально все сходные возбудители плевропневмониеподобных поражений были объединены в группу PPLO (pleuropneumonia-like organisms), первые патогенные для человека микоплазмы были выделены из абсцессов бартолиниевых желез Диенесом и Эдзаллом (1937), а также Итоном от большого атипичной пневмонией (1944). Однако изучить возбудитель не представилось возможным, и он длительное время был известен как агент Итона. Тем не менее, окончательная этиологическая роль *M. pneumoniae* в развитии пневмоний была установлена лишь в 1962 г. Род образуют хемоорганотрофные организмы, у большинства видов метаболизм бродильный, основным источником энергии обычно служит глюкоза или аргинин. Подавляющее большинство составляют подвижные факультативные анаэробы, также растущие в аэробных условиях (иногда рост стимулирует внесение 5% CO₂). Микроорганизмы растут при температуре 22-41°C (оптимальная 36-37°C); оптимум pH 6,8-7,4. Микоплазмы широко распространены в природе, включают много видов, патогенных для растений и животных; некоторые входят в состав микробных ассоциаций организма человека; 5 видов патогенно для человека — *M. pneumoniae*, *M. hominis*, *M. genitalium*, *M. incognitum* и *M. fermentans*. Типовой вид рода — *M. mycoides*.

Морфология

Клетки характеризует выраженный полиморфизм, что обусловлено отсутствием ригидной клеточной стенки; по данным разных авторов, их средний размер варьирует в пределах 0,1-1,2 мкм. В ранней экспоненциальной стадии сферические или овальные, позднее удлиняются - вплоть до разветвленных нитей. Клеточная мембрана находится в жидкокристаллическом состоянии (ее молекулы способны перемещаться), средняя толщина 0,07-0,1 мкм; включает белки (идентичны белкам цитоплазмы, состоят из 17 аминокислот), мозаично погруженные в 2 липидных слоя, основной компонент которых — холестерин.

Микроорганизмы не способны к образованию холестерина (и прочих стероидов) и потребности в нем восполняют утилизацией его из тканей или питательной среды, дополненной его внесением.

Холестерин стабилизирует мембрану клетки, придает ей эластичность и обуславливает проникновение и утилизацию жирных кислот.

Стерины детоксифицируют жирные кислоты, способные вызвать гибель клетки, и служат субстратом для получения энергии.

Адсорбцию на клетках обеспечивают адгезины белковой природы и нейраминидаза, входящие в состав клеточной мембраны микоплазм.

Культуральные свойства

Микоплазмы прихотливы к условиям культивирования, в питательные среды необходимо вносить нативную сыворотку, холестерин, нуклеиновые кислоты, углеводы, витамины и различные соли. Подходящие основы для них — триптический перевар сердца крупного рогатого скота (например, среды, разработанные В.Д. Тимакиным и Г.Я. Каган), перевар Хоттингера, пептон Мартена и др.; также широко применяют среду Эдварда. При их отсутствии для первичного выделения также пригодны куриные эмбрионы; гибель последних наблюдают с 3-5 пассажа. Чувствительны к микроэлементному составу среды — высокое содержание Zn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} и Fe^{2+} может ингибировать рост.

На твердых средах образуют характерные мелкие колонии (0,2-1,5 мм) с более темным и зернистым центром типа «яичницы-глазуньи», напоминающие мелкие колонии L-форм бактерий. На средах, содержащих кровь, некоторые виды дают α - и β -гемолиз, преимущественно обусловленные образованием перекисей; на средах, содержащих значительное количество сыворотки, могут образовывать преципитаты в их глубине. Обычно колонии появляются на 5-7 сутки (адаптированные штаммы растут быстрее).

На полужидких средах растут по уколу, формируя дисперсные, крошковатые колонии.

На жидких средах дают очень незначительное помутнение или опалесценцию; некоторые штаммы способны образовывать тончайшую жирную пленку. Чаще более обильный рост отмечают около поверхности или стенок сосуда, но некоторые виды дают и придонный рост.

Биохимические свойства

Биохимические свойства микоплазм разнообразны. Выделяют 2 основные группы.

1. Разлагающие с образованием кислоты глюкозу, мальтозу, маннозу, фруктозу, крахмал и гликоген («истинные» микоплазмы).
2. Восстанавливающие соединения тетразолия, окисляющие глутамат и лактат, но не ферментирующие углеводы; все виды не гидролизуют мочевины и эскулин. Основные биохимические свойства патогенных микоплазм представлены в табл. 26.

Таблица 26. Основные биохимические свойства патогенных микоплазм

Вид	Гидролиз аргинина	Образование кислоты при ферментации глюкозы	Образование кислоты при ферментации маннозы	Восстановление солей тетразолия (а.у. / ан.у.)
<i>M. pneumoniae</i>	–	+	+	+/+
<i>M. hominis</i>	+	–	–	–/–
<i>M. fermentans</i>	+	+	–	–/+
<i>M. genitalium</i>	–	+	±	+/-

а.у. — аэробные условия; ан.у. — анаэробные условия.

Антигенная структура

Сложная, имеет видовые различия; основные Аг представлены липидами (фосфо- и гликолипидами), полисахаридами и белками; наиболее иммуногенны поверхностные Аг, включающие углеводы (глюкозу, маннозу, галактозу, фукозу и глюкозамин) в составе сложных гликолипидных, липогликановых и гликопротеиновых комплексов. Идентификацию Аг микоплазм проводят в реакциях РПГА, РСК, ИФА и иммунодиффузии, антигенная структура может изменяться после многократных пассажей на бесклеточных питательных средах. Для микоплазм характерен выраженный антигенный полиморфизм с высокой частотой спонтанных и индуцированных мутаций. В геномах микоплазм, некоторых вирусов и эукариот обнаруживают гомологичные участки ДНК.

Факторы патогенности

Факторы патогенности микоплазм разнообразны и могут значительно варьировать; основные факторы — адгезины, экзо- и эндотоксины, гемолизины, различные ферменты и продукты метаболизма.

Адгезины входят в состав поверхностных Аг и обуславливают взаимодействие с клетками хозяина. Взаимодействие происходит по типу лиганд-рецепторных взаимодействий и имеет ведущее значение в развитии начальной фазы инфекционного процесса; они способны находиться в инвагинатах кле-

точных мембран, что делает микоплазмы недоступными для действия АТ, комплемента и прочих факторов защиты.

Эзотоксины. В настоящее время подобные продукты идентифицированы лишь у нескольких микоплазм, в частности у *M. neurolyticum* и *M. gallisepticum*; мишени для их действия — мембраны астроцитов. Тем не менее, можно предполагать наличие нейротоксина у некоторых штаммов *M. pneumoniae*, т. к. часто инфекции дыхательных путей сопровождаются поражением нервной системы.

Эндотоксины выделены у многих патогенных микоплазм; их введение лабораторным животным вызывает пирогенный эффект, лейкопению, тромбгеморрагические поражения, коллапс и отек легких. По своей структуре и некоторым свойствам (например, не вызывают хемотаксического ответа нейтрофилов человека) не тождественны ЛПС грамотрицательных бактерий.

У некоторых видов микоплазм присутствуют **гемолизины** (наибольшей гемолитической активностью обладает *M. pneumoniae*); большая часть видов вызывает выраженный β -гемолиз, обусловленный синтезом супероксидантов (O_2^- , H_2O_2 и др.). Предположительно микоплазмы не только сами синтезируют окислительные продукты, но и индуцируют их образование в клетках, что ведет к окислению мембранных липидов.

Ферменты

В числе основных факторов патогенности — фосфолипаза А и аминокептидазы, гидролизующие фосфолипиды клеточной стенки.

Как указывалось выше, многие микоплазмы синтезируют нейраминидазу, через которую осуществляется взаимодействие с поверхностными клеточными структурами, содержащими сиаловые кислоты; кроме того, активность фермента нарушает архитектуру клеточных мембран межклеточные взаимодействия.

Среди прочих ферментов, активность которых вносит определенный вклад в патогенез поражений, следует упомянуть протеазы, вызывающие дегрануляцию клеток (в том числе и тучных), расщепление молекул АТ и незаменимых аминокислот (в частности, аргинина), РНКазы, ДНКазы и тимидинкиназы, нарушающие метаболизм нуклеиновых кислот в клетках организма. До 20% общей ДНКазной активности сосредоточено в мембранах микоплазм, что облегчает вмешательство фермента в метаболизм клетки.

Некоторые микоплазмы (например, *M. hominis*) синтезируют эндопептидазы, расщепляющие молекулы Ig А на интактные мономерные комплексы.

Патогенез

Включает формирование местных воспалительных и генерализованных аутоиммунных реакций. Микоплазмы проникают в организм человека ингаляционным или контактным путем, мигрируют через слизистые оболочки и прикрепляются к эпителию сначала посредством неспецифического (в результате броуновского движения), а затем лиганд-рецепторного взаимодействия (через

сиалогликопротеиновые рецепторы, посредством связывания поверхностных белков с различными рецепторами, через взаимодействие мембранных липидных структур контактирующих клеток и т. д.). Микроорганизмы не проявляют выраженного цитопатогенного действия, но вызывают значительные нарушения функциональных свойств клеток с последующим развитием местных воспалительных реакций.

Само взаимодействие с рецепторным аппаратом клеток может приводить к нарушению их антигенной структуры и запускать аутоиммунные процессы.

Микоплазмы способны избегать действия микробицидных механизмов циркулирующих и фиксированных фагоцитов; в частности, при отсутствии АТ макрофаги не способны фагоцитировать микоплазмы, что обусловлено наличием микрокапсул, поверхностных Аг, перекрестно реагирующих с Аг некоторых тканей организма человека (легкие, печень, головной мозг, поджелудочная железа, гладкая мускулатура и эритроциты). В цитоплазме нейтрофилов возбудитель сохраняет свою жизнеспособность. В значительной степени подобные свойства варьируют у различных видов и даже штаммов.

Взаимодействия с иммунокомпетентными клетками вызывают поликлональную активацию Т- и В-лимфоцитов и могут иметь своим следствием подавление их функциональной активности либо развитие аутоиммунных реакций.

Микоплазмы чувствительны к компонентам комплемента, активированным как по классическому, так и альтернативному пути; их дефицит и дефекты создают условия для персистенции возбудителя

Хроническая циркуляция приводит к расстройствам системы гемостаза.

Питательные среды для культивирования микоплазм

Среда Мартена. В 1 л теплой (50°C) кипяченой водопроводной воды суспендируют 250 г фарша из свежих свиных желудков и добавляют 10 мл концентрированной соляной кислоты. Смесь выдерживают 24 ч при 45-50°C, периодически перемешивая. Прогревают 30 минут текучим паром и оставляют на 5 суток при 4°C. Надосадочную прозрачную жидкость декантируют, фильтруют через бумажный фильтр, разливают в колбы и стерилизуют 30 минут при 120°C.

Модифицированная плотная среда ВИЭВ. К горячему 20%-ному агару на дистиллированной воде добавляют смесь (поровну) среды Мартена и мясной воды с таким расчетом, чтобы получить 1,5-2%-ную концентрацию агара. Далее разливают в колбы и стерилизуют 30 минут при 120°C. Перед использованием в расплавленный и остуженный до 45-50°C агар добавляют 10% дрожжевого экстракта, 20% стерильной сыворотки крови лошади и 0,5% глюкозы.

Модифицированная жидкая среда ВИЭВ. Смешивают равные объемы среды Мартена и мясной воды, устанавливают рН 8-8,2 и стерилизуют 30 ми-

нут при 120°C. Перед использованием в среду добавляют 10% стерильного дрожжевого экстракта, 20% сыворотки крови лошади и 0,5% глюкозы.

Среда Эдварда. Смешивают 500 мл отвара сердечной мышцы, 500 мл водопроводной воды и 10 г пептона. Устанавливают рН 8,4. Стерилизуют 30 минут при 120°C. Перед использованием в среду асептически добавляют 20% инактивированной сыворотки крови лошади или крупного рогатого скота и 10% дрожжевого экстракта. Для получения полужидкой или плотной среды Эдварда к жидкой среде добавляют соответственно 3 или 20 г агар-агара.

Приготовление отвара сердечной мышцы. К 1 л дистиллированной воды добавляют 1 кг фарша из мышцы сердца крупного рогатого скота и оставляют на 16-18 ч, периодически перемешивая. Кипятят 40 минут, отстаивают, надосадочную жидкость фильтруют через бумажный фильтр. Полученный отвар разливают в колбы и стерилизуют 30 минут при 120°C.

Приготовление дрожжевого экстракта. В 200 мл дистиллированной воды суспендируют 50 г хлебных (пекарских) дрожжей, нагревают до закипания с пенообразованием. Охлаждают, после центрифугирования надосадочную жидкость стерилизуют фильтрованием через фильтр Зейтца. Экстракт пригоден в течение 2 недель.

Среда Надь-Погани. В 1 л дистиллированной воды растворяют 2,5 г натрия хлорида, 0,075 г пептона, 2,5 г гидрофосфата натрия. Добавляют 1 мл 2,4%-ного водного раствора фенолового красного. Устанавливают рН 8,0-8,2. Стерилизуют 30 минут при 120°C. Перед использованием в среду асептически добавляют 200 мл дрожжевого экстракта и 200 мл стерильной сыворотки крови лошади.

Среда из гидролизата мышцы сердца крупного рогатого скота. Смешивают 1 часть фарша из мышцы сердца крупного рогатого скота с 1,5 частями дистиллированной воды, кипятят 10-15 минут. Остывшую массу пропускают через мясорубку, отстаивают. К 600 г отстоявшегося фарша добавляют 1 л полученного бульона. Устанавливают рН 8,0. Вносят 150 г измельченной свежей поджелудочной железы крупного рогатого скота и 30 мл хлороформа. Оставляют в закрытой бутылки в темном месте при 45-48°C на 10 сут. Периодически перемешивают. Надосадочную жидкость фильтруют через ватно-марлевый или полотняный фильтр. Устанавливают рН 8,0. Добавляют 2% хлороформа и хранят при 4-8°C. К 200 мл гидролизата сердечной мышцы добавляют 400 мл мясной воды, 400 мл дистиллированной воды, 5 г натрия хлорида. Устанавливают рН 8,2. Прокипятив 15-20 минут, фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Стерилизуют 30 минут при 120°C.

Среда Хофстад-Доерр. В 2 части дистиллированной воды вносят 1 часть фарша из мяса, сердца и печени кур, перемешивают. Выдерживают 12 ч при 4-8°C. Прогрев на водяной бане (кипящей) 30 минут, фильтруют через ватно-марлевый фильтр. К фильтрату добавляют 0,5% натрия хлорида, 5% крови птиц. Устанавливают рН 7,8 и кипятят 30 минут на водяной бане. Фильтруют,

добавляют 0,5% мальтозы, 20% сыворотки крови птиц, ацетат таллия и пенициллин в конечной концентрации 1:4000 и 100 ИЕ на 1 мл соответственно. Стерилизуют фильтрованием через фильтр Зейтца.

Grynnia Rickettsiaceae

Представители данной группы – Rickettsiaceae представлены небольшими плеоморфными (палочки, кокки и диплококки) микроорганизмами; граммотрицательны, культивирование на бесклеточных средах невозможно. Они подразделяются на несколько видов: виды, патогенные для паукообразных, членистоногих, теплокровных и человека; переносчики — вши, блохи и клещи; вызываемые заболевания называют риккетсиозами. По типу дыхания — аэробы, поглощают O_2 , выделяют CO_2 , дыхание своеобразно — клетки активно окисляют глутаминовую кислоту и индифферентны к глюкозе. Систематическое положение многих видов остается спорным; подавляющее большинство патогенных риккетсий входит в состав родов: *Rickettsia*, *Rochalimea* и *Coxiella*, спорадические заболевания также вызывают виды семейства *Ehrlichia* (*E. chaffeensis* и *E. sennetsu*). Основоположник современного учения о риккетсиозах — бразильский бактериолог да Роха-Лима, впервые применивший термин «риккетсия» (1916) для обозначения возбудителя сыпного тифа в память американского бактериолога Риккетса, погибшего при его исследовании (1910).

Морфология патогенных риккетсий (род *Rickettsia*)

Строение аналогично строению прочих бактерий; у риккетсий выделяют оболочку, протоплазму и зернистые включения. Ядерная структура представлена зернышками (от 1-2 до 4); в клетках выявляют ДНК и РНК. Для микроорганизмов, особенно для риккетсий сыпного тифа, характерен полиморфизм, выявляемый при помощи специальных методов окрашивания; изменений вирулентности в зависимости от того или иного морфологического типа не наблюдают. По П.Ф. Здродовскому (1972) выделяют следующие типы:

Тип а. Кокковидные мелкие гомогенные зернистые клетки овоидно-эллипсоидной формы (около 0,5 мкм); часто образуют диплоформы (в виде гантелей) или конгломераты; являются основной морфологической формой, типичны для интенсивного размножения возбудителя в клетках.

Тип б. Палочковидные двузернистые образования (зерна расположены на полюсах, связаны плохо окрашиваемой протоплазмой); средний диаметр 1-1,5 мкм; также характерны для интенсивного размножения возбудителя.

Тип с. Удлиненные (или изогнутые) двузернистые палочки (3-4 мкм); иногда могут включать по 4 зернышка, парно расположенных на полюсах; соответствуют более медленному размножению (занимают промежуточное положение между типами а, б и d).

Тип d. Нитевидные (до 20-40 мкм) многозернистые формы, представляющие своеобразный «мицелий» из а- и b-клеток; характерны для начальных стадий инфекции и фазы замедленного роста.

Размножение

Риккетсии размножаются, подобно бактериям, простым поперечным делением; выделяют 2 типа деления: 1) обычное деление кокковидных а- и b-форм с образованием гомогенных популяций; 2) размножение мицелия дроблением нитевидных d-форм с последующим образованием популяций, состоящих из клеток а- и b-типов.

Культуральные свойства

Патогенным риккетсиям свойственен внутриклеточный паразитизм; они не способны размножаться на бесклеточных средах и мертвых субстратах. Для жизнедеятельности оптимален пониженный метаболизм зараженных клеток, поэтому сроки максимального накопления отодвигаются до 7-12 суток. Для культивирования пригодны куриные эмбрионы, фибробласты куриных эмбрионов и некоторые стационарные линии клеток млекопитающих (например, клетки McCoу); нестабильны при отделении от компонентов клеток хозяина (могут сохранять стабильность в средах с белками снятого молока или альбуминами сыворотки, в растворах с сахарозой, глутаматом и K_3PO_4). Температурный оптимум 32-35°C; рост угнетается при 40°C; погибают при 56°C.

Токсикообразование. Патогенные риккетсии образуют токсические вещества, играющие важную роль в патогенезе риккетсиозов. От бактериальных экзотоксинов их отличает неотделимость от микробных клеток и их чрезвычайная неустойчивость (поэтому о токсическом действии судят по влиянию живых культур). Они не тождественны эндотоксинам, т.к. термолабильны (белки), неустойчивы к действию формалина. Всем патогенным видам присущи гемолитические свойства в отношении эритроцитов различных животных.

Устойчивость. Для подавляющего большинства видов характерна низкая устойчивость во внешней среде; они плохо переносят повышение температуры до 50-70°C (исключая *Coxiella burnetii*), но хорошо консервируются при температуре -20-70°C; неустойчивы к действию дезинфектантов и антисептиков (исключая *Coxiella burnetii*). Выживаемость в жидких средах зависит от их состава, pH и температуры; лучше сохраняются в белковых средах с нейтральной или слабо щелочной pH, например при 4°C *C. burnetii* сохраняется в молоке до 2 месяцев. В высушенном состоянии сохраняются гораздо дольше — на различных субстратах (овчина, фекалии вшей) до 1-3 лет; лиофилизация обеспечивает неопределенно долгое сохранение. Активность подавляют антибиотики тетрациклинового ряда, но они резистентны к сульфаниламидам и некоторым антибиотикам.

Патогенез всех риккетсиозов (исключая Q-лихорадку) носит черты несомненного сходства.

После проникновения в организм (с укусом членистоногого-переносчика или заноса инфицированных фекалий в место укуса, например, при расчесывании) возбудитель активно размножается в эндотелии прилегающих капилляров; эта стадия раннего размножения составляет инкубационный период заболевания длительностью 7-10 суток.

В течение нескольких первых суток инкубационного периода в месте укуса развивается реакция ГЗТ, иногда сопровождаемая лимфаденопатией. Первоначально риккетсии размножаются в месте первичного очага, затем диссеминируют по лимфоток; до развития иммунных реакции основной барьер для возбудителя — фагоциты (преимущественно макрофаги), поглощающие их спонтанно. Однако неопсонизированные риккетсии способны выживать и размножаться в их цитоплазме, т.к. синтезируют фосфолипазы, разрушающие фагосомы; следствие этого — воспалительные реакции в лимфатических узлах, индуцируемые макрофагами.

Через 7-10 суток возбудитель диссеминирует гематогенно; активное размножение риккетсий в ядрах и цитоплазме эндотелиальных клеток вызывает васкулиты с образованием периваскулярных мононуклеарных инфильтратов. Пораженные клетки содержат риккетсии в виде телец-включений (тельца включений, или клетки Музера); при этом риккетсии Провацекса чаще расположены в цитоплазме, а риккетсии Риккетса — в ядрах зараженных клеток.

По мере диссеминирования возбудителя поражения сосудов принимают генерализованный характер, что обуславливает клинические проявления — на коже появляется пятнистопапулезная сыпь, в сосудах отмечают диссеминированный тромбоз с развитием ишемии и некротических изменений в периваскулярных тканях. Генерализованное поражение эндотелия приводит к повышению проницаемости сосудов, появлению отеков и геморрагий с развитием гипотензивного шока; повреждение эндотелиоцитов активирует свертывающую систему крови с возможным формированием синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания. Смерть пациентов обуславливают острая сердечная недостаточность (основная причина), поражения ЦНС либо расстройства кровообращения, опосредованно приводящие к сердечной недостаточности.

Принципы лабораторной диагностики

Возбудитель может быть выделен от больных и трупов, из переносчиков и (при эндемических риккетсиозах) от диких животных (обычно грызунов), заражающихся в эндемичных очагах. При всех риккетсиозах источник выделения — кровь, взятая из вены больного в ранние сроки лихорадки; можно использовать цельную, дефибринированную кровь или сгустки (что лучше всего).

Один из основных методов — микроскопия возбудителя в окрашенных мазках; методы окрашивания имеют первостепенное значение. В практике

применяют окраску по Романовскому-Гимзе, по Кастанеде и по Маккиавело (можно использовать модификацию П.Ф. Здродовского).

Биологическая проба (проба Музера-Нейла) Исследуемый материал вводят лабораторным животным; наиболее приемлемы морские свинки, которым материал вводят внутрибрюшинно. При эпидемическом риккетсиозе предпочтительно использовать самцов, т.к. у них развивается специфический периорхит с накоплением риккетсии в мезотелии влагиаличных оболочек яичка (клетки Музера). Для выделения возбудителей везикулярного, осповидного риккетсиозов и лихорадки цуцугамуши можно заражать белых мышей (вводят 0,5 мл крови). Для диагностики Q-лихорадки рекомендуют заражать морских свинок непосредственно в тестикулы (0,3-0,5 мл крови). Однако для выделения риккетсии Провачека эти методы малоэффективны. Выделение возбудителя сыпного тифа можно провести, используя платяных вшей, в желудках которых риккетсии активно размножаются. После кормления вшей инфекцию воспроизводят на чувствительном животном (в очень большом количестве накапливаются в головном мозге). Любые манипуляции с возбудителем представляют большую опасность.

Серологические исследования составляют основу современной лабораторной диагностики; получение надежных результатов возможно лишь к концу 1 недели заболевания, и лечение больного следует начинать эмпирически, не дожидаясь результатов лабораторных исследований.

Реакция Вейля-Феликса — диагностическая реакция, основанная на способности сыворотки пациентов, страдающих различными риккетсиозами, агглютинировать ОХ-штаммы (особенно ОХ₁₉ и ОХ₂) *Proteus vulgaris*. Следует помнить, что АТ к возбудителю сыпного тифа перекрестно реагируют только с бактериями штамма ОХ₁₉. Реакция обусловлена структурным сходством поверхностных Аг.

РСК — основной метод диагностики в РФ и других странах, включая США; обладает достаточной чувствительностью и специфичностью; малопригодна для диагностики свежих случаев, т.к. для выявления достоверного увеличения титров АТ необходим большой временной интервал. Исследование проводят в парных сыворотках (титры 1:20-1:80).

Более чувствительна и специфична реакция непрямой иммунофлюоресценции; метод позволяет идентифицировать IgM и IgG, что удобно для ранней диагностики и определения стадии болезни. При постановке реакции существует риск получения ложноотрицательных результатов, особенно на ранней стадии заболевания.

Для выявления *R. rickettsii* используется реакция прямой иммунофлюоресценции, позволяющая идентифицировать Аг возбудителя в биоптатах кожных поражениях (можно использовать и другие иммунохимические методы); специфичность реакции — 100% (чувствительность достигает 70%); позволяет

диагностировать заболевание уже на 3-4 сутки; единственный адекватный серологический тест, пригодный для диагностики.

Для диагностики активных форм эрлихиозов разработана ПЦР; учитывая спорадический характер заболевания, широко не применяется.

Род *Coxiella*

Представлен короткими палочками 0,2-0,4×0,4-1 мкм; по тинкториальным свойствам, зависимости от клеток хозяина, естественной связи с переносчиками-членистоногими и позвоночными сходны с прочими риккетсиями; образуют фильтрующиеся формы. Размножаются преимущественно в вакуолях и фаголизосомах клеток, хорошо растут в желточном мешке куриного эмбриона. Способны к фазовой изменчивости с образованием форм, аналогичных S- и R-формам бактерий; в природе встречаются в I фазе, после длительных пассажей трансформируются во II фазу; диссоциация носит обратимый характер (после пассажей на животных). Риккетсии II фазы склонны к спонтанной агглютинации и агглютинации в нормальной сыворотке, фагоцитируются при отсутствии АТ. Образуют спорообразные формы, обеспечивающие устойчивость к высоким температурам и высушиванию: типовой вид — *C. burnetii*, вызывает своеобразное заболевание, известное как Q-лихорадка (лихорадка девятой мили, квадрилатеральная лихорадка). Как отдельное заболевание впервые была выявлена в 1935 г. Дерриком в Южном Квинсленде (Австралия); возбудитель был идентифицирован в 1937 г. и по предложению Деррика назван *C. burnetii*. Независимо от австралийских исследователей в США Кокс выделил фильтрующийся агент из клещей-переносчиков лихорадки Скалистых Гор и доказал его риккетсиозную природу (1938). В Европе история заболевания связана с эпидемиями так называемого «балканского гриппа», отмечаемыми в 1941-1943 гг. среди немецких войск, дислоцированных на Балканах, в Греции и Крыму. Заболевание регистрируют повсеместно, особенно в районах с развитым животноводством. Переносчики — многие виды иксодовых, аргасовых и гамазовых клещей (среди животных и птиц). Резервуар — клещи (возможна трансвариальная передача), грызуны, птицы и домашние животные (крупный рогатый скот). Основной путь заражения — ингаляция возбудителя.

Род *Rochalimaea*

Морфологически сходны с представителями рода *Rickettsia* и проявляют аналогичные тинкториальные свойства. Растут преимущественно в вакуолях клеток позвоночных; в организме членистоногого-хозяина живут во внеклеточной среде (очень устойчивы к физическим и химическим агентам во внеклеточном окружении). Их также можно культивировать на бесклеточных средах, например на КА или ША. Систематика рода остается незавершенной, не-

которые авторы предлагают отнести их к семейству Bartonellaceae. Реакция Вейля-Феликса отрицательна. Типовой вид — *R. quintana*.

Вольтинская лихорадка (пятидневная или тибальная лихорадка, болезнь Вернера-Хисса). Доброкачественное инфекционное заболевание; известно еще с античного времени, т.к. поражения с похожей симптоматикой упоминаются в трудах Гиппократ и Галена. Под названием «молдаво-валахской лихорадки» было описано в период русско-турецкой войны 1877-1878 гг. В современную инфекционную патологию заболевание вошло во время первой мировой войны, впервые появившись в английском экспедиционном корпусе во Фландрии (1915); заболеваемость исчислялась сотнями тысяч человек, и тогда болезнь получила свое наиболее популярное название — траншейная, или окопная лихорадка. Еще до начала войны в Польше были зарегистрированы эндемичные очаги, где заболевание получило название «вольтинская лихорадка» (Лаверан, 1927). Возбудитель — *R. quintana*, выделен Тепфером (1916), Эркритом и Бэкотом (1919). Заболевание распространено в очагах педикулеза (но часто не распознается врачами), и при наличии педикулеза в местах скопления большого количества людей может формировать эпидемические вспышки. Переносчик — платяная вошь. Резервуар — больной человек (возможно длительное носительство).

Болезнь «кошачьих царапин» (гранулема Малларе). Возбудитель — *Rochalimaea henselae* — полиморфная грамотрицательная бактерия 1-3×0,2-0,5 мкм. Оксидазо-, каталазо- и уреазоотрицательна, инертна к углеводам. Заболевание протекает доброкачественно и напоминает поражения, вызываемые *Alipia felis*. Распространено повсеместно; обычно возникает после кошачьего укуса или царапин; наиболее часто наблюдают у детей. Характерны медленно заживающие повреждения, регионарный лимфаденит, лихорадка; в большинстве случаев заболевание спонтанно разрешается в течение нескольких месяцев.

В некоторых случаях наблюдают осложнения: поражения ЦНС (энцефаломенингиты, парезы), дыхательных путей (пневмонии), печени и селезенки (увеличение печени и селезенки, печеночная пурпура); наиболее часто они ассоциированы с дефектами иммунологического реагирования.

Род Ehrlichia

В последние годы отмечают рост заболеваний вызываемых риккетсиями рода *Ehrlichia* (семейство Ehrlichieae), известных как эрлихиозы. Подавляющее большинство эрлихий патогенно для различных животных: собак (особенно немецких овчарок), лошадей и др. Первой эрлихией, выделенной от человека, была *E. sennetsu* (1986), позднее в Форт Чэффи (Арканзас, США) у пациента с эрлихиозом был выделен ранее неизвестный микроорганизм, получивший название *E. chaffeensis*. Со дня выявления первого случая зарегистрированы больше 200 больных. Резервуар — олени и, по мнению некоторых авторов,

собаки; переносчики – клещи и прочие кровососущие членистоногие. Для поражений характерна выраженная сезонность — до 80% поражений отмечают с мая по июль. Наибольшее количество случаев зарегистрировано в центральных и юго-западных штатах США — Арканзасе, Оклахоме, Миссури, Вирджинии и Теннесси.

Эрлихии размножаются в тканевых макрофагах и моноцитах периферической крови с последующей их гибелью (механизм цитотоксического действия остается неизвестным) и гематогенным диссеминированием возбудителя по всему организму (включая костный мозг и органы ЦНС). Формирующийся симптомокомплекс напоминает симптомы пятнистой лихорадки, Скалистых Гор (на фоне лейко- и тромбоцитопении), но сыпь и васкулиты отмечают редко; характерный признак болезни — повышенное содержание аминотрансфераз в сыворотке крови.

Диагностика заболевания: обычно проводят микроскопию мазков периферической крови; при эрлихиозе в 1-2% нейтрофилов, моноцитов и лимфоцитов обнаруживают внутриклеточные гроздеобразные включения-морулы, напоминающие ягоды малины. Морулы — вакуоли размером 2-5 мкм, содержащие эрлихии. Приемлемо проведение серологических исследований с использованием доступных Ag *E. canis*, перекрестно реагирующих с АТ к *E. sennetsu*.

Список литературы

1. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th edition. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994 (перевод: Определитель бактерий Берджи, т.1 и т.2. М.: Мир,1997)
2. Butterworths Medical Dictionary, 2nd edition. McDonald Critchey ed. London-Boston: Butterworths, 1980.
3. Color atlas of medical microbiology. Hart T., Shears P. Mosby'Wolf, 1996.
4. Diagnostic Pathology of Infectious Diseases. Woods G.L., Gutierrez Y. Philadelphia-London: Lea & Febiger, 1993.
5. Handbuch der mikrobiologischen Laboratoriumstechnik. Dickseit R., Janke D. Dresden: Verlag Theodor Steinkopff, 1969.
6. Infectious disease secrets. Gates R. Philadelphia; Hartley & Belfus, 1998.
7. Mechanisms of Microbial Diseases, 2th edition. Schaechter M., Medoff G., Eisenstein B. Baltimore: Williams & Wilkins, 1993.
8. Microbiology and Immunology. Johnson A.G., Ziegler R., Fitzgerald T.J., Lukasewycz O., Hawley L. Baltimore: Williams & Wilkins, 1989.
9. Microbiology and Infectious Diseases, 3rd edition. Virella G. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997
10. Stedman's Medical Dictionary, 26th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1995.
11. The Enterobacteria. Janda J.M., Abbott S.L. Lippincott Raven, 1998.
12. Webster's Medical Desk Dictionary. Springfield; Merriam-Webster, 1995.
13. Антропозоозы. Руднев Г.П. М.: Медицина, 1976
14. Биомолекулярные основы патогенности бактерий. Езепчук Ю.В. М.: Медицина, 1973.
15. Биохимическая организация микробной клетки. Кашкин П.Н., Любимов Ю.А. Ленинград: ЛенГИДУВ, 1977.
16. Ветеринарная микробиология и иммунология. М.: Агропромиздат, 1991.
17. Внутрибольничная инфекция. Руководство по лабораторным методам исследования. Parker M. М.: Медицина, 1988.
18. Возбудители пастереллезов и близких к ним заболеваний. Доморацкий И.В.М.: Медицина, 1971.
19. Иммунологические аспекты инфекционных заболеваний. Под редакцией G.Dick. М.: Медицина, 1982.
20. Генетика бактерий и бактериофагов. Haas W. М.: Мир, 1965.
21. Кампилобактериоз. Чайка Н.А., Хазенсон Л.Б., Butzler J. М.; Медицина., 1988.
22. Клиническая микробиология. Нейчев С. София: Медицина и физкультура, 1977.
23. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология. Под редакцией Л.Б. Борисова и А.М. Смирновой. М.: Медицина, 1994.
24. Медицинская микробиология. Под редакцией В.И. Покровского. М.: ГЭОТАР МЕДИЦИНА 1998.
25. Методы общей бактериологии. Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Никишина Н.М.. Ульяновск: изд-во УГСХА, 1998.
26. Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам. Ведьмина Е.А., Власова И.В., Гивенталь М.И. М.: ЦОЛИУВ, 1979.
27. Микоплазмозы. Прозоровский Н.С. и др. М.: Медицина, 1978.
28. Микробиология. Лебедева М.Н.. М. Медицина 1969.
29. Микробиология. Тимаков В.Д. М.: Медицина, 1973.

30. Микрофлора человека в норме и в патологии. Петровская В.Г., Марко О.П. М.: Медицина, 1976.
31. Мир микробов, 4-е издание. Stainer R.Y., Adetberg E.A., Ingraham J.L, тт. I-III. М.: Мир, 1979.
32. Молекулярная микробиология. М.:Мир.1977.
33. Общая микробиология. Schlegel H. М.: Мир, 1972.
34. Основы микробиологии. Фробишер М. М.:Мир 1965.
35. Приобретенный иммунитет и инфекционный процесс. Покровский В., Авербах М., Литвинов В., Рубцов И. М.:Медицина, 1979.
36. Руководство по медицинской микробиологии. Джавец Э., Мельник Д., Эйдельберг Э., 1-3 т.т. М.:Мир, 1982.
37. Руководство по микробиологии, клинике и эпидемиологии инфекционных болезней, тт.I-X.М.: Медицина, 1968.
38. Руководство по микробиологической диагностике инфекционных болезней, 2-е издание. Под редакцией К.И. Матвеева. М.: Медицина, 1973.
39. Сальмонеллезы Покровский В.И., Черкасский Б.Л. «Мед газета», 1995.
40. Санитарная микробиология. Под редакцией Г.П. Калины и Г.Н. Чистовича. М.: Медицина, 1969.
41. Сибирская язва. М.: Колос, 1996.
42. Справочник по лабораторной диагностике зооантропонозов. Шляхов Э.Н., Андриеш Л., Груз Е. Кишинев: Картя Молдовеняске, 1979.
43. Учебник медицинской микробиологии. Аристовский В.М, Минкевич И.Е., Фрид С.М. М.: Медгиз, 1945.
44. Учение о риккетсиях и риккетсиозах. Здродовский П.Ф., Голиневич Е.М. М.: Медицина, 1972.
45. Физиология бактерий. Месровяну Л., Пэунеску Э. Бухарест: Editura Academiei Reepublicii Populare Romine, 1960.
46. Частная эпизоотология. М.: Сельхозгиз 1948.
47. Эпизоотология. М.: Колос, 1974.

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие.....	3
Введение.....	4
Бактерии рода <i>Bacillus</i>	6
<i>Bacillus anthracis</i>	6
<i>Bacillus cereus</i>	14
Прочие виды, имеющие значение.....	16
Питательные среды для культивирования бактерий рода <i>Bacillus</i>	16
Бактерии рода <i>Clostridium</i>	18
Столбнячная палочка.....	26
<i>Clostridium botulinum</i>	31
<i>Clostridium novyi</i>	35
Прочие возбудители анаэробной раневой инфекции.....	40
Питательные среды для культивирования клостридий.....	45
Грамположительные, аэробные и факультативные кокки.....	49
Микроорганизмы рода <i>Staphylococcus</i>	49
<i>Staphylococcus aureus</i>	511
<i>S. epidermidis</i>	54
<i>S. saprophyticus</i>	55
Питательные среды для культивирования стафилококков.....	55
Микроорганизмы рода <i>Streptococcus</i>	58
Стрептококки группы А.....	59
Стрептококки группы В.....	633
<i>S. pneumoniae</i> (пневмококк).....	66
Негемолитические стрептококки.....	68
Прочие стрептококки.....	70
Питательные среды для культивирования стрептококков.....	73
Бактерии рода <i>Listeria</i>	744
Внутривидовая дифференциация листерий.....	77
Рецепты и способы приготовления питательных сред для выделения листерий.....	86
Бактерии рода <i>Erysipelothrix</i>	95
Питательные среды для культивирования <i>E. rhusiopathiae</i>	97
Микроорганизмы рода <i>Actinomyces</i>	9898
<i>A. bovis</i>	101
<i>A. viscosus</i>	1033
<i>A. hordeovultae</i>	1044
<i>A. pyogenes</i>	1044
<i>A. suis</i>	1055
<i>A. humiferis</i>	1055
Питательные среды для культивирования актиномицетов.....	1055
Микроорганизмы рода <i>Pseudomonas</i>	10707
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (синегнойная палочка).....	10808
<i>Pseudomonas (Burkholderia) cepacia</i>	11919
<i>Pseudomonas (Burkholderia) mallei</i>	1200
<i>Pseudomonas (Burkholderia) pseudomallei</i> (палочка Уитмора).....	1233
Питательные среды для культивирования и идентификации псевдомонад.....	12727
Микроорганизмы рода <i>Francisella</i>	128

Питательные среды для культивирования франциселл	132
Микроорганизмы рода <i>Yersinia</i>	1333
Схема бактериологического выделения и идентификации <i>Yersinia</i> enterocolitica.....	1466
Питательные среды для культивирования иерсиний	14949
Микроорганизмы рода <i>Pasteurella</i>	151
Питательные среды для культивирования пастерелл	156
Микроорганизмы рода <i>Brucella</i>	15757
Питательные среды для культивирования бруцелл	1644
Микроорганизмы рода <i>Haemophilus</i>	16767
<i>Haemophilus influenzae</i> (палочка Афанасьева-Пфейффера).....	16868
Питательные среды для культивирования гемофильных бактерий	1722
Микроорганизмы рода <i>Campylobacter</i>	1744
Группа <i>Campylobacter jejuni</i> (<i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> , <i>C. lari</i>).....	1755
<i>C. fetus</i> подвид <i>fetus</i>	1800
<i>C. coli</i>	1800
<i>C. sputorum</i> sb. <i>mucosalis</i>	1811
<i>Spirillum pulli</i>	1811
Питательные среды для культивирования и идентификации кампилобактерий.....	1811
Бактерии рода <i>Leptospira</i>	182
<i>L. interrogans</i>	1833
Питательные среды для культивирования лептоспир.....	18686
Бактерии рода <i>Mycobacterium</i>	18787
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (палочка Коха).....	18988
<i>Mycobacterium bovis</i>	198
<i>Mycobacterium africanum</i>	19999
<i>Mycobacterium avium</i>	199
<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>	2000
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	2000
Питательные среды для культивирования патогенных микобактерий	2000
Микроорганизмы рода <i>Mycoplasma</i>	204
Питательные среды для культивирования микоплазм.....	20909
Группа <i>Rickettsiaceae</i>	2111
Род <i>Coxiella</i>	2155
Род <i>Rochalimaea</i>	2155
Род <i>Ehrlichia</i>	21616
Список литературы.....	21818

МЕТОДЫ ЧАСТНОЙ БАКТЕРИОЛОГИИ

Учебно-методическое пособие

Дмитрий Аркадьевич Васильев
Анатолий Анисимович Щербаков
Лидия Владимировна Карпунина
Сергей Николаевич Золотухин