

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН
САМАРКАНДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ

УДК: 616.988.15:614.88

МОНОГРАФИЯ

КОМПЛЕКС ЛАБОРАТОРНЫХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ
КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Ташкент - 2025

Автор:	
Маматова М.Н.	- СамГМУ профессор кафедры клинической лабораторной диагностики и КЛД ФПДО, д.в.н.
Рецензенты	
Маматкулов И.Х.	- Заместитель директора ТашНИИВС профессор, д.м.н.
Ташкенбаева Э.Н.	- Заведующий кафедры внутренних болезней и кардиологии № 2, профессор, д.м.н.

Монография посвящена к проблемам борьбы с кишечными инфекциями, включая вопросы комплексной лабораторной диагностики. Комплексные методы лабораторных исследований действительно отвечают требованиям диагностической работы сегодняшнего дня. Учитывая, что определение природы кишечных заболеваний только на основании клинических данных, без лабораторных исследований, в большинстве случаев невозможно.

В результате проведенной работы автором монографии предложен комплекс лабораторных исследований, направленных на наиболее полное выявление биологических свойств возбудителей кишечных инфекций. В монографии использовано и творчески переосмыслено большое количество как отечественных, так и зарубежных литературных источников, охватывающих практически весь период развития кишечных инфекций.

Монография своевременна, материалы высококвалифицированно проанализированы, полезны для специалистов не только противоэпидемического профиля, но и вполне может служить учебником для студентов медицинских вузов.

ОГЛАВЛЕНИЕ

	ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА - I.	КОМПЛЕКС ЛАБОРАТОРНЫХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ	9
	БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ	15
ГЛАВА - III.	ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЭНТЕРОКОЛИТОВ	18
3.1.	Бактериологическая диагностика энтероколитов	18
3.2.	Выделение серогрупп энтеропатогенных эшерихий у детей с острой диареей	25
ГЛАВА-IV.	ПАТОГЕННЫЕ СВОЙСТВА КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИИ	
4.1.	Бактериоциногенные свойства стафилококков	29
4.2.	Токсикоинфекции стафилококковой этиологии	33
4.3.	Особенности изменения биоценоза кишечника при сальмонеллезной инфекции	36
ГЛАВА-V.	О ЦЕННОСТИ ЛАБОРАТОРНЫХ РЕАКЦИЙ В ДИАГНОСТИКЕ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ	51
5.1.	Реакция нейтрализация при кишечных инфекций	51
5.2.	О диагностическом значении пробы на С- реактивный белок при стафилококковом сепсисе	58
ГЛАВА-VI.	АНТИТОКСИЧЕСКИЙ И ФАГОЦИТАРНЫЙ ИММУНИТЕТ ПРИ СТАФИЛОКОККОВЫХ ИНФЕКЦИЙ	64

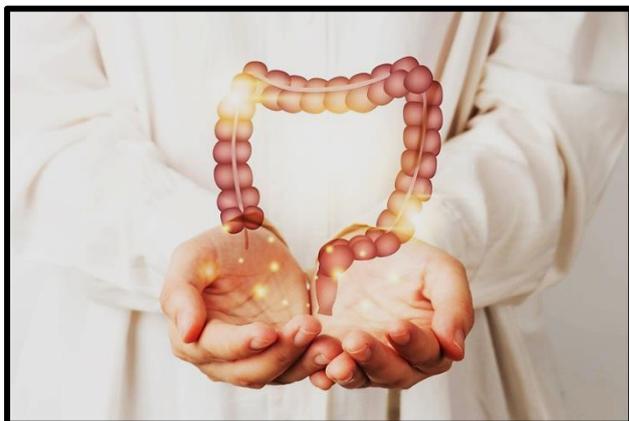
6.1.	Применение реакции непрямой гемагглютинации для определения антител к стафилококковому токсину	64
6.2.	Защитное действие стафилококкового анатоксина при заражении животных разными штаммами стафилококка	72
ГЛАВА- VII.	СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ПРОФИЛАКТИКА СТАФИЛОКОККОВЫХ ИНФЕКЦИЙ	79
7.1.	Специфическая профилактика стафилококковым анатоксином животных и людей	79
7.2.	Экспериментальное изучение зависимости «доза - эффект» при иммунизации стафилококковым анатоксином	92
7.3.	Фагоцитарный и антитоксический иммунитет при стафилококковых инфекций	97
	Использованные литературы:	103

УСЛОВНЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

ВОП	- врач общей практики
ДВС	- диссеминированное внутрисосудистое свертывание
ЖКТ	- желудочно-кишечный тракт
ИВБДВ	- Интегрированное Ведение болезней детского возраста
ИФА	- иммуноферментный анализ
КИНЭ	- кишечные инфекции неуточненной этиологии
КОС	- кислотно-основное состояние
КТ	- компьютерная томография
МЕ	- международные единицы
НПВС	- нестероидные противовоспалительные средства
ОАК	- общий анализ крови
ОАМ	- общий анализ мочи
ОКИ	- острые кишечные инфекции
ОПО	- общие признаки опасности
ОРС	- оральные регидратационные средства
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ПТИ	- пищевая токсикоинфекция
РГА	- реакция гемагглютинация
РНГА	- реакция непрямой гемагглютинации РПГА - реакция пассивной гемагглютинации
СОЭ	- скорость оседания эритроцитов
СРБ	- С - реактивный белок
ESPGHAN	- Европейское общество по педиатрической гастроэнтерологии, гепатологии и нутрициологии
	УПМ - условно-патогенный микроб УПФ - условно-патогенная флора

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы: Кишечные инфекции относятся к наиболее распространенным инфекционным болезням, характеризующимся единым



механизмом заражения и различными путями передачи. Кишечные инфекции - это большая группа заболеваний, объединенных развитием диарейного синдрома. Число клинических форм превышает 30 нозологических единиц,

возбудителями которых могут быть бактерии, вирусы и простейшие.

ГЛАВА - I. КОМПЛЕКС ЛАБОРАТОРНЫХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Для заболеваний этой группы характерны локализация возбудителей в кишечнике и выделение их в окружающую среду с испражнениями. Для кишечных инфекций характерен: Механизм передачи - фекально-оральный. Пути передачи - водный, пищевой, контактно-бытовой. Возбудители устойчивы в окружающей среде. Хорошо переносят умеренное охлаждение, но при нагревании и под действием дезинфекционных растворов погибают. Источником инфекции являются больной человек или бактерионоситель. Сезонность в теплое время года - летом и в летне-осенний период.

В клинике преобладают:

- симптомы интоксикации;
- поражения ЖКТ;
- диарея присутствует практически при всех кишечных инфекциях, но при каждой имеет свои характерные особенности.
- Диагностика кишечных инфекций основывается:
- на клинической картине;

- эпидемиологических данных;
- лабораторных исследованиях.

Лабораторные исследования:

ОАК - лейкоцитоз, нейтрофилез, ускорение СОЭ; Общий анализ крови (нормоцитоз или лейкоцитоз с палочкоядерным сдвигом, иногда до 40-50% при дизентерии и увеличение эритроцитов и гемоглобина при выраженном обезвоживании) с определением гематокрита.

- Серологический анализ крови в динамике заболевания (РНГА при подозрении на дизентерию, сальмонеллез, кампилобактериоз, иерсиниоз и др.).

- Посев рвотных масс и промывных вод на патогенную микрофлору.

- Биохимический анализ крови с определением К, Na, Са, Cl, общего белка, мочевины, креатинина, КОС.

- кал на яйца глист и простейшие;

- копрограмма: наличие непереваренной клетчатки, слизи, лейкоцитов, эритроцитов, нейтральных жиров;

- бактериологическое исследование рвотных масс или промывных вод желудка и кала выделение патогенной/условно патогенной флоры;

- Посев кала на дизентерию, сальмонеллез, эшерихиозы, патогенный стафилококк, иерсиниоз, условно-патогенную флору, а также по эпидемическим и клиническим показаниям на холеру и обследование кала на антигены ротавирусов (ИФА) и энтеровирусов.

- Копрологическое исследование кала позволяет уточнить преимущественный отдел кишечника, подвергшийся поражению.

- Исследование кала на криптоспоридиоз, амебиаз (вегетативные формы амев в теплом кале), балантидиаз, лямблиоз, глистные инвазии по показаниям.

- бактериологическое исследование кала на Ф-30 (холеру):

1) больные ОКИ, имеющие водянистую диарею, рвоту в сочетании с признаками обезвоживания (судороги мышц, снижение тургора кожи);

2) умершие от ОКИ неясной этиологии.

По эпидемиологическим показаниям:

1) все больные ОКИ;

2) беженцы, прибывшие из неблагополучных по холере стран;

3) граждане, прибывшие из неблагополучных по этой инфекции стран и заболевшие в течение 5 (пяти) календарных дней с момента прибытия;

– б/х анализ крови: концентрация электролитов в сыворотке крови, мочевины, креатинин, остаточный азот, общий белок (при обезвоживании);

– коагулограмма (при ДВС-синдроме);

– бактериологическое исследование крови и мочи - выделение патогенной/условно патогенной флоры (при лихорадке более 5 дней);

– Посев крови на стерильность и гемокультуру при сохраняющейся лихорадке и подозрении на брюшной тиф, сальмонеллез, стафилококковый сепсис.

– Общий анализ мочи (могут быть токсические изменения и высокий удельный вес при обезвоживании);

– ИФА- иммуноферментативный метод (на обнаружение антигенов).

– ПЦР - определение ДНК кишечных инфекций бактериальной этиологии;

– РПГА (РНГА) крови со специфическими антигенными диагностикумами - нарастание титров антител при повторной реакции в 4 и более раза (по показаниям);

– исследование уровня С-реактивного белка в сыворотке крови: уровень СРБ коррелирует с тяжестью воспалительного процесса (по показаниям) и т.д.

– Дуоденальное зондирование при подозрении на лямблиоз.

- Ректороманоскопия или колоноскопия при диарее свыше двух недель с наличием примеси крови в кале.
- Фиброгастроскопия.
- УЗИ органов брюшной полости.

Тщательное изучение этиологической структуры кишечных заболеваний является необходимым условием для организации правильного лечения их и проведения профилактических мероприятий. В настоящее время в связи с полимикробной этиологией кишечных заболеваний значение бактериологической диагностики неизмеримо возрастает. Настало время, когда, кроме поисков патогенных микробов кишечной группы, крайне необходимо выявлять роль и условно патогенных микробов в возникновении ряда желудочно-кишечных заболеваний, изучать влияние так называемого дисбактериоза в развитии тех или иных расстройств.

Крайне ценным, было бы изучение иммунологического состояния макроорганизма путем постановки в динамике реакции агглютинации с сывороткой крови больного и выделенными микробами, особенно с условно патогенными, чтобы подтвердить этиологическую роль того или иного микроорганизма. Комплексное микробиологическое исследование испражнений отвечает стремлению лабораторных работников расшифровать этиологию желудочно-кишечных расстройств. Бесспорно, врачи-бактериологи должны владеть методикой комплексного исследования любого материала, уметь выделять не только известные патогенные микробы семейства кишечных, но и условно патогенные, чтобы доказать на основании совокупности микроскопических, количественных, серологических данных роль выделенных микробов в возникновении и развитии того или иного расстройства.

За последние годы в диагностическую работу бактериологических лабораторий внедрено много новых методик, увеличилось число идентифицируемых микроорганизмов.

Снижение частоты бактериологического подтверждения клинического диагноза дизентерии заставляет сомневаться, что все заболевания, при которых диагноз дизентерии поставлен только клинически, действительно вызваны возбудителем дизентерии. Нередко наблюдаются случаи, когда при клиническом диагнозе дизентерии высевают сальмонеллы или энтеропатогенные кишечные палочки.

Бактериологи отмечают в своих статьях, что возросшая резистентность людей к инфекционным заболеваниям, увеличение иммунной прослойки среди населения, массивное применение антибиотиков и связанная с этим изменчивость микроорганизмов, а также нарушение оптимального биоценоза в организме больного (дисбактериоз) изменили характер и течение острых кишечных заболеваний. Это затрудняет клиническую диагностику и увеличивает значимость лабораторной. Необходимы методы, позволяющие идентифицировать возбудителей с измененными свойствами. Следует улучшить качество питательных сред, наладить снабжение практических лабораторий полным набором диагностических агглютинирующих сывороток. Нужны сыворотки, диагностикумы для обнаружения условно патогенных микробов.

В случае, когда стертая, атипично протекающая форма заболевания вызвана измененным вариантом возбудителя дизентерии, который не выявляется при существующих методах исследования, будет ли полезно, если бактериолог, по предложению авторов, выделит из испражнений протеи, щелочеобразователей и других представителей условно патогенной микрофлоры. Здесь может помочь улучшение методов диагностики, расширение набора диагностических сывороток. Так, выпуск дополнительных сывороток для диагностики сальмонелл каждый раз способствовал расшифровке заболеваний, которые раньше оставались бактериологически не подтвержденными.

Большое значение для результатов бактериологического анализа имеет кратность исследования и тщательность сбора материала. При многократных

исследованиях испражнений, которые брали каждый раз из различных мест в несколько пробирок, показано, что из проб в 10 пробирках положительный результат получали 1, 2, реже в 3. Положительные результаты получали при анализе не всех проб испражнений от одного больного, присланных в течение дня.

Число анализов значительно возросло. Комплексные методы исследований действительно отвечают требованиям диагностической работы сегодняшнего дня. Но до практических лабораторий они часто не доходят. Например, как может лаборатория инфекционной больницы, обеспечить проведение исследований по предлагаемым комплексным методом, если в штате лаборатории всего 2 врача лаборанта. Чтобы все новейшие достижения нашей науки внедрялись в жизнь и новые методы исследований нашли широкую дорогу в практику, необходимы соответствующие условия.

Учитывая, что определение природы острых кишечных заболеваний только на основании клинических данных, без лабораторных исследований, в большинстве случаев невозможно, мы изучили различные методы диагностики этих заболеваний у больных. В результате проведенной работы предложен комплекс лабораторных исследований, направленных на наиболее полное выявление этиологии кишечных заболеваний у детей раннего возраста. Комплекс включает - предусмотренные инструкцией исследования для выявления дизентерийных микробов, сальмонелл, патогенных кишечных палочек и простейших; посев испражнений наряду с дифференциальными средами на среду Плоскирева с синтомицином; в случае отрицательных результатов посевов постановку реакции нарастания титра фага с индикаторными фагами; при отсутствии бактериологического подтверждения дизентерии постановку реакции агглютинации с сыворотками крови больных в динамике которая подтверждает клинического диагноза дизентерии на 30-40 %; посев испражнений детей раннего возраста на желточно-солевой агар для выделения стафилококков с последующим определением их патогенности по реакции плазмокоагуляции; учет наличия

протeya при просмотре чашек со средой Эндо; посев испражнений на среду Сабуро для выделения дрожжеподобных грибов рода Кандида.

На основании опыта нашей работы по бактериологическому обследованию на общую микрофлору, патогенный стафилококк или кандиду мы считаем, что проводить эти анализы нужно только по указанию лечащего врача по клиническим показаниям. Важно, чтобы работа по диагностике кишечных инфекций проводилась совместно клиницистом, эпидемиологом и бактериологом, и чтобы они имели общие взгляды на этиологию этих заболеваний. Таким образом, для комплексного анализа испражнений при кишечных расстройствах неясной этиологии необходим целенаправленный поиск бактериолога, определенный данными эпидемиолога и лечащего врача.

ГЛАВА - I I. БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ

Использование инфектологического подхода в системе «паразит-хозяин» представляет несомненный интерес в плане выяснения патогенетической значимости персистентного потенциала микроорганизмов, обеспечивающего их устойчивость к естественным и приобретенным механизмам антиинфекционной защиты. Не расшифрованы важные патогенетические аспекты кишечной инфекции, связанные с оценкой роли некоторых иммунных механизмов и факторов естественной резистентности в ее исходе, включая участие Т- и В- систем иммунитета, цитокиновую регуляцию в динамике инфекционного процесса.

Наряду с выявлением патогенетических особенностей взаимодействия возбудителя с макроорганизмом и исхода кишечной инфекции, реализация инфектологического подхода в прикладном отношении предусматривает разработку способов санации бактерионосителей, основанных на усилении эффекторных механизмов иммунитета и подавлении персистентного потенциала патогена.

Многочисленные биологические свойства микроорганизмов тесно связаны с фазой развития микробной популяции и зависят, кроме того, от состава питательной среды, концентрации питательных веществ в ней, физико-химических показателей, условий культивирования и т. п.

Для изучения зависимости того или иного свойства микробной популяции от одного из перечисленных выше условий необходимо соблюдение равенства (равнозначности) всех прочих условий, в том числе и фазы размножения. Например, при определении зависимости иммуногенных свойств от состава питательной среды требуется изучить иммуногенную активность многочисленных популяций, выросших в разнообразных питательных средах.

Проводить анализ полученных данных можно только в том случае, если все изучаемые популяции имеют одну и ту же фазу развития. При этом, по понятным причинам, абсолютно нецелесообразно использовать в качестве показателя фазы срок, прошедший от момента посева, что еще нередко встречается в практике микробиологических исследований.

Более обоснованно определение фазы развития популяции путем вычисления скорости размножения и продолжительности одной генерации.

Наличие фазы экспоненциального роста определяют по постоянству значений этих показателей в течение нескольких часов, а замедление скорости размножения и увеличение продолжительности генерации свидетельствуют о наступлении фазы отрицательного ускорения размножения.

Однако соблюдение равенства фаз нескольких популяций при этом способе определения фазы затрудняется в связи с тем, что абсолютные значения скорости размножения и продолжительности генерации микроорганизмов, культивируемых на разных средах, могут быть весьма различными в один и тот же период развития популяции и одинаковыми в разные периоды.

В литературе есть данные, свидетельствующие, что в этом периоде развития популяции происходят значительные изменения свойств микроорганизмов. Поэтому для сравнения результатов, полученных в опытах с несколькими популяциями, находящимися в фазе замедления скорости размножения, особенно необходим относительный количественный показатель.

Острые кишечные инфекции, а общей структуре детской инфекционной патологии остаются одной из основных проблем, занимая по частоте второе место после острых респираторных вирусных инфекций. Заболеваемость острыми кишечными инфекциями за последние годы не имеет тенденции к снижению. Возрастает эпидемиологическая роль условно-патогенных микроорганизмов, в том числе энтеробактерий. В структуре острых кишечных инфекций у детей и подростков на долю заболеваний, вызванных условно-патогенными *Enterobacteriaceae*, приходится от 3,1 % до 38,2 %, а у детей первого года жизни - от 66,6 % до 78,5 %.

Относительно этиологической роли условно-патогенных энтеробактерий при кишечных инфекциях мнение исследователей разноречиво. На современном этапе диагностика острых кишечных инфекций, вызванных условно-патогенными микроорганизмами, основывается на оценке клинических и лабораторных данных, включающих определение вида микроорганизма и микробной обсемененности, однако факт выделения условно-патогенного микроорганизма не всегда свидетельствует о его роли при данном заболевании. В этой связи активно разрабатываются и совершенствуются методы оценки этиологической роли данных микроорганизмов, в частности, через обнаружение мобильных генетических элементов (в т.ч. «островов» патогенности), с которыми связывают эволюцию условно-патогенных видов и появление патогенных клонов. Сведения об особенностях ответной реакции организма на внедрение условно-патогенных бактерий не многочисленны. В настоящее время научный и практический интерес представляет характеристика

патогенетических возможностей данных микроорганизмов и сопряженных с ними иммунных реакций организма. Изучение продукции цитокинов и белков острой фазы позволяет установить особенности системной воспалительной реакции при кишечных инфекциях у детей и подростков, связанных с условно-патогенными эктеробактериями.

ГЛАВА - III. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЭНТЕРОКОЛИТОВ

3.1. Бактериологическая диагностика энтероколитов

В последние годы в работах как зарубежных, так и отечественных авторов установлено, что острые кишечные заболевания, протекающие с синдромом энтероколита, могут быть вызваны энтеропатогенной кишечной палочкой новой серологической группы.

Острые кишечные инфекции, по определению ВОЗ «диарейные болезни», - это группа инфекционных заболеваний, клинически



характеризующаяся ведущим острым диарейным синдромом. Острые кишечные заболевания у детей продолжают оставаться актуальной проблемой здравоохранения, поскольку наносят большой ущерб здоровью детей и экономике страны.

Семейство Enterobacteriaceae включает 30 родов и более 100 видов: *Arsenophonus*, *Budvicia*, *Buttiarella*, *Cedecea*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enerobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Ewingella*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Kluuyvera*, *Lecclerica*, *Leminorella*, *Moellerella*, *Morganella*, *Obesumbacterium*, *Pantoea*, *Pragia*, *Proteus*, *Providencia*, *Rahnella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Tatumella*, *Xenorabdus*, *Yersinia*, *Yokenella*. Роды *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* являются безусловно-патогенными микроорганизмами - «классическими» патогенами, остальные представители семейства - условно-патогенными.

По данным американских исследователей более 99 % всех энтеробактерий, выделенных из клинического материала, принадлежат к 23 видам, причем, наиболее часто (в 80-95 % случаев) выделяют *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*.

За последнее время в бактериологических лабораториях санэпидстанций расширился набор агглютинирующих сывороток к энтеропатогенным кишечным палочкам. Это обстоятельство вынуждает практических работников лаборатории искать пути рационализации общепринятого метода исследования на патогенные кишечные палочки. При массовых исследованиях на энтероколиты мы пользуемся некоторыми удобными приемами, которые излагаем в настоящем сообщении.

Энтероколит - это распространенное заболевание органов желудочно-кишечного тракта, которое характеризуется одновременным воспалением тонкой (энтерит) и толстой (колит) кишки. Он развивается на фоне инфекций, неправильного питания, токсических воздействий и других причин.

С целью определить основной метод лабораторной диагностики энтероколитов в лабораториях инфекционных больниц и санэпидстанций организовали комплексную диагностику заболеваний у лиц, поступивших в инфекционную больницу по поводу различных желудочно-кишечных расстройств. Всего за последние 3 года обследовано 825 человек, из них 410 детей и 415 взрослых. Как взрослые, так и дети «поступали в больницу с различными диагнозами: дизентерии (чаще у взрослых), гастроэнтерита, энтерита, энтероколита, колита, пищевой токсикоинфекции, сальмонеллеза, лямблиоза, диспепсии, колиэнтерита, желудочно-кишечного расстройства (чаще у детей).

Произведено бактериологических исследований кала, выделено 24 культур энтеропатогенных кишечных палочек O-145 от 20 больных (11 детей и 9 взрослых). И у всех больных был выделен из кала в 1-й день поступления в больницу возбудитель энтероколита O-145 (в первые 3 дня заболевания). У

большинства больных энтеропатогенные кишечные палочки O-145 высевали однократно, лишь у 3 возбудитель выделен двукратно и у 1-троекратно.

Материалы собирали в пробирку с консервирующей глицериновой смесью обязательно до начала лечения антибиотиками и засевали на среду Плоскирева и Эндо.

Поскольку энтеропатогенные кишечные палочки O-145 хорошо растут на среде Плоскирева и рост их очень сходен с ростом шигелл, дополнительных питательных сред для бактериологической диагностики энтероколитов O-145 не требуется. Патогенные кишечные микробы выделяли по общепринятым методикам.

Подозрительные колонии на среде Плоскирева (нежные, почти прозрачные, слегка выпуклые, с четкими ровными краями) снимали на трехсахарный агар с мочевиной. На другой день просматривали на этой среде и для дальнейшего исследования брали лишь те пробирки с посевами, где косая поверхность оставалась неизменной (лактоза не ферментирована), в столбике - пожелтение и разрывы в агаре (глюкоза расщеплена до кислоты и газа) и почернения в столбике агара не было (сероводород не образуется).

По нашим наблюдениям, у всех выделенных культур энтеропатогенных кишечных палочек O-145 в столбике агара отмечено наличие газа, хотя в отличие от патогенных энтеробактерий разрывы агара были небольшими.

Если результат агглютинации на стекле с указанными сыворотками был отрицательным, мы испытывали эти культуры на стекле диагностической сывороткой O-145, разведенной физиологическим раствором в отношении 1:10.

Все 24 выделенных культур энтеропатогенных кишечных палочек O-145 давали на стекле быструю, четкую, крупнохлопчатую агглютинацию.

Культуры, давшие положительную реакцию агглютинации на стекле, пересеивали на «пестрый ряд», содержащий лактозу, глюкозу, маннит, сахарозу, среду Пешкова, мясо-пептонный бульон и скошенный мясо (из сухого питательного агара). На другой день со скошенного агара делали

мазки, окрашивали их по Граму, отмечали углеводов, подвижность, образование индола и сероводорода, повторно ставили на стекле реакцию агглютинации с сывороткой О-145 (1:10). При наличии хорошей агглютинации со скошенного агара культуру стерильным физиологическим раствором и ставили развернутую реакцию агглютинации с живыми микробами после прогрева их в водяной бане в течение часа при 100° С. Результаты реакции учитывали на другой день с помощью агглютиноскопа. По нашим данным, агглютинация с живой культурой была крупнохлопчатой, четкой, с полным просветлением жидкости, при титре сыворотки 1:3200 доходила до 1:800-1: 1600; в 2 случаях была до титра 1:200. Реакция агглютинации с прогретой культурой была также четкой, с полным просветлением, однако характер агглютинина оказался более зернистым. Титр реакции доходил до титра сыворотки (1:3200), а в некоторых случаях . превышал его (1:6400). Положительный ответ о выделении энтеропатогенной кишечной палочки О-145, мы давали в случаях, когда культура была типичной по биохимическим признакам и развернутая реакция агглютинации с гретой культурой была положительной до титра сыворотки, превосходя агглютинацию с живой культурой на 2-4 разведения.

Мы изучили также способность выделенных культур энтеропатогенных кишечных палочек О-145 лизироваться поливалентным дизентерийным, сальмонеллезным и коли-протейным бактериофагами. Из 24 изученных культур 8 лизировались дизентерийным фагом, 2-сальмонеллезным. Ни одна культура не лизировалась коли-протейным бактериофагом.

У всех выделенных культур определяли чувствительность к антибиотикам методом бумажных дисков. Чаще отмечена чувствительность к левомицетину (у 18 из 24), несколько реже - к стрептомицину. К препаратам тетрациклиновой группе культуры были устойчивыми и лишь в единичных случаях слабо чувствительными.

Практическое значение серодиагностики при энтероколитах O-145 невелико, поскольку бактериологический метод позволяет диагностировать заболевание в более ранние сроки.

Так как колонии кишечных бактерий на бактоагаре Плоскирева часто дают слизистый рост, из-за чего плохо эмульгируются, мы используем бактоагар лишь в тех случаях, когда посеы на среде Эндо покрываются ползучим ростом вульгарного протей. На 2-й день исследования из среды Эндо, с сплошного роста, мы производили пробную агглютинацию с 2 комплексными коли-сыворотками которые содержат в смеси типовые сыворотки в разведении 1:5.

При отрицательных результатах пробной агглютинации со смешанной культурой исследование на данном этапе заканчиваем и даем отрицательный ответ относительно энтеропатогенных кишечных палочек. При положительном результате реакции агглютинации мы выделяем и изучаем изолированные колонии, причем наряду с типичными колониями кишечной палочки исследуем и нехарактерные колонии типа параколи.

Мы описали лактозонегативные варианты кишечных палочек серологического типа № 145, которые по реакции агглютинации не отличались от типичных.

Обнаружены также лактозонегативные варианты других серологических типов (025, 055). При учете этого обстоятельства до некоторой степени повышаются возможности обнаружения патогенных кишечных палочек.

С целью дальнейшего облегчения общепринятой методики исследования мы предлагаем комплексные сыворотки наносить на внутреннюю поверхность крышки чашек Петри, что позволяет исключить применение предметных стекол.

Из проб с положительным результатом агглютинации мы пересеваем колонии прямо на скошенный агар. Опасность загрязнения культур при этом исключается, так как внутренняя поверхность крышек стерильна.

Комплексные сыворотки наносим на внутреннюю поверхность крышек чашек с двух сторон на расстоянии 0,5-1 см от диаметра. Упомянутым способом на крышке чашки диаметром 9-9,5 см можно свободно разместить по 10-12 капель сывороток. При получении агглютинации с одной из комплексных сывороток необходимость в применении второй комплексной сыворотки отпадает. Таким образом, в некоторых случаях для выявления агглютинабельности кишечных палочек фактически приходится применять одну комплексную сыворотку. С этой целью на одной стороне крышки наносят 4-5 капель той комплексной сыворотки, с которой агглютинировалась смешанная культура.

Обычно путем изучения 4-5 колоний удается обнаружить агглютинабельные микробы. При отсутствии же агглютинации в этих каплях можно параллельно взятым дополнительно нанести на крышку чашки еще 4-5 капель сыворотки. Часто из-за родственных антигенов смешанная культура агглютинируется с 2 комплексными сыворотками. Разумеется, и в этих случаях для выявления агглютинабельных микробов достаточно пользоваться одной комплексной сывороткой. Применение 2 комплексных сывороток дает возможность в дальнейшем при определении типа кишечной палочки на стекле пользоваться только теми типовыми сыворотками, которые входят в данную комплексную сыворотку (*чтобы предупредить загрязнение посева с воздуха после взятия очередной колонии, вторую половину чашки с посевом удобно держать в левой руке или положить на стол дном вверх*).

Иногда при выдержке посевов в термостате на внутренней поверхности крышки образуется конденсационная жидкость в виде мельчайших росинок. Ее легко удалить путем 2-3-кратного проведения наружной стороны крышки над огнем спиртовки, чтобы капли агглютинации при учете результатов не слились. После учета результатов агглютинации дно чашки с посевом вкладывают в крышку и сдают в стерилизацию. В ходе исследования на колиэнтериты мы отказались и от применения пастеровских пипеток для

нанесения агглютинирующих сывороток на стекло. Агглютинирующие сыворотки разводим во флаконах из-под пенициллина, куда через резиновые пробки продеты и погружены в жидкость так называемые постоянные пипетки. Для этой цели лучше приспособить отрезки пипеток (на 1-2 мл) длиной 8-10 см.

Чтобы предотвратить загрязнение сыворотки воздушной микрофлорой через пипетки, их верхнее отверстие слегка закрывают ватой. Эти пипетки применяют вместе с резиновыми пробками без помощи рта, и при небольшом навыке, наклонив флакон, набирают нужное количество сыворотки, а затем, зажав указательным пальцем свободный конец, пипетки вынимают из флакона. Выход жидкости из пипетки и величину наносимых на стекло капель регулируют нажимом пальца и прикосанием пипетки к стеклу. После того как нанесли необходимое количество капель, пипетку вновь вставляют во флакон. Можно рекомендовать во избежание прорастания сывороток хранить их в холодильнике и разводить физиологическим раствором с добавлением 0,25 % карболовой кислоты. Флаконы с пипетками удобно размещать в пустых коробках из-под диагностических препаратов. Желательно, чтобы комплексные сыворотки, которые чаще всего употребляют, находились рядом. Удобно также, чтобы каждой комплексной сыворотке соответствовал свой отдельный ряд типовых сывороток. Это дает возможность при определении типа кишечной палочки на стекле воспользоваться только одним рядом типовых сывороток. Бактериологический метод является основным методом лабораторной диагностики энтероколитов О-145. Для бактериологической диагностики этих заболеваний не требуется введения дополнительных питательных сред и методических приемов. Возбудитель энтероколита О-145 выделяется из кала в первые дни заболевания и, как правило, однократно. Кишечные палочки О-145 выделялись как у детей, так и у взрослых с различными кишечными расстройствами.

3.2. Выделение серогрупп энтеропатогенных эшерихий у детей с острой диареей

Изучение эшерихий, являющихся возбудителями диареи и колиэнтеритов, их видового распределения в различных регионах, а также динамики изменения среди этих видов, имеет чрезвычайно важное значение для медицинской микробиологии. Это необходимо для изучения пато- и серологических типов этих заболеваний, циркулирующих в природе.

Escherichia coli (*E. coli*) - это облигатные синантропные микроорганизмы, являющиеся постоянными обитателями кишечника человека и животных.

Высокая пластичность генома *E. coli* обуславливает возможность появления штаммов, способных вызывать различные заболевания, как кишечной, так и внекишечной локализации.

Диарея, вызываемая *E. coli* (DEC), как возбудитель острых кишечных инфекций, делится на шесть патогрупп в зависимости от наличия генов вирулентности, кодирующих специфические патогенные факторы: EPEC - энтеропатогенные, ETEC - энтеротоксигенные, EHEC - энтерогеморрагические, EIEC - энтероинвазивные, EAaggEC - энтероагрегативные и DAEC - диффузно-адгезивные.

Выявление этих факторов необходимо для определения клинического течения эшерихиоза, динамики заболевания, а также для определения пато- и серогрупп, являющихся причиной усиления эпидемического процесса.

Цель исследования было определить частоту встречаемости патогенных штаммов *Escherichia coli* и провести сравнительный анализ их распространенности у детей с диареей в период с 2014 по 2023 годы в близлежащих районах области и города Самарканда.

В период с 2014 по 2023 год были проанализированы результаты исследований штаммов *Escherichia coli*, выделенных от больных в различных районах области, включая город Самарканд и районы Самарканд, Пастдаргом, Джамбай, Тайляк, Акдаря. Группа патогенности эшерихий была

определена с помощью комплексного бактериологического и серологического исследования образцов фекалий, в соответствии с «Руководством по микробиологической диагностике заболеваний, вызванных энтеробактериями». За указанный период было выделено 488 штамма *Escherichia coli*, полученных от больных в рамках ретроспективного микробиологического анализа.

Наибольшее количество случаев эшерихиоза зарегистрировано в Акдаринском районе, г. Самарканде, Самаркандском районе и Пастдаргомском районе. В этих регионах процент случаев колеблется от 21,7% до 26,7%.

Наименьшее количество эшерихий (9,1%) выделено от пациентов в Тайлякском районе.

Пик заболеваемости пришелся на 2019 год (106 случая) и 2021 год (88 случая).

В 2019 году в г. Самарканда и Самаркандском районе, а в 2021 году в больницах Акдаринского района зафиксирован обмен штаммами *E. coli* между внутрибольничными и внеклиническими штаммами.

Анализ регистрации эшерихий, выделенных от пациентов за 10 лет, показал, что, несмотря на рост общего числа эшерихий, разнообразие патогенных групп и серотипов этих бактерий из года в год уменьшается. В нашем исследовании, проведенном в 2014-2023 годах, у пациентов из различных районов области было выделено 488 штамма *Escherichia coli*, которые были распределены по группам: ЕРЕС, ЕНЕС, ЕІЕС, а также редко встречаемые ЕТЕС, ЕАggЕС и DАЕС. Было обнаружено, что у пациентов встречались штаммы *Escherichia coli* 42 различных серологических групп.

В течение исследуемого периода выделенные штаммы *Escherichia coli* из пациентов были разделены на патологические группы. В 2014 году распределение было следующим: ЕТЕС - 33,6%, ЕРЕС - 50,6%, ЕНЕС - 11,6%, ЕІЕС - 0,4%, ЕАggЕС - 3,7%.

В течение исследуемого периода наиболее часто встречались ЕТЕС, ЕРЕС и ЕНЕС, тогда как варианты ЕИЕС, ЕАggЕС и DAЕС регистрировались значительно реже.

В ходе анализа эшерихий, выделенных от пациентов с диареей, обратившихся за медицинской помощью в г. Самарканде и его близлежащих территориях в период с 2019 по 2023 год, было установлено, что по группам патогенности ЕРЕС составляли в среднем 46,3%, ЕТЕС - 39,1%, а ЕНЕС - 13,2%, что в сумме составляет 98,6% от общего числа зарегистрированных случаев.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что: Наблюдается увеличение общего числа эшерихий с типичными характеристиками, выделенных от пациентов.

Отмечается повышение доли патогенов, таких как ЕРЕС, ЕТЕС и ЕНЕС. Выявление большего количества ранее встречавшихся штаммов эшерихий играет важную роль в бактериологической диагностике заболевания и в правильном и качественном лечении.

В период с 2019 по 2023 год проведено бактериологическое исследование микрофлоры фекалий 411 детей с диареей в возрасте от 6 месяцев до 3 лет. В результате исследования было установлено, что наиболее часто в эти годы регистрировались серогруппы *Escherichia coli*: O26 (21,5%), O111 (16,0%), O155 (14,3%) и O114 (11,0%). Серогруппы *Escherichia coli* O20, O91 и O158 встречались наиболее редко (0,5%).

Энтеропатогенные эшерихии коли (ЕРЕС) - это штаммы бактерий *Escherichia coli*, которые могут вызывать диарейные заболевания, особенно у детей. Различные серогруппы ЕРЕС обладают различной частотой встречаемости в разных регионах и популяциях. Точные данные о процентной встречаемости конкретных серогруппаов ЕРЕС (таких как O18, O20, O25, O26, O44, O55, O86, O91, O111, O114, O119, O125ac, O126, O127, O128, O142 и O158) могут варьироваться в зависимости от исследований и источников данных. На основе результатов исследований, полученных в

последние годы, данные о вероятности встречи с энтеропатогенными *Escherichia coli* (EPEC) серогрупп, необходимы для разработки мер профилактики, диагностики и лечения этого заболевания.

Из них 182 детей (44,4%) были в возрасте до 1 года, а 229 детей (55,6%) - в возрасте от 1 до 3 лет. В ходе исследования было выделено 1063 штамма EPEC.

Диагностика и идентификация серогрупп патогенных эшерихий осуществлялись с помощью бактериологического исследования и серологических реакций образцов фекалий, в соответствии с «Руководством по микробиологической диагностике заболеваний, вызванных энтеробактериями».

В период с 2019 по 2023 год было проведено исследование, в ходе которого от пациентов с диареей было выделено 133 штамма энтеропатогенной кишечной палочки (EPEC). Количество выделенных штаммов по годам распределялось следующим образом: 2019 г. - 35, 2020 г. - 31, 2021 г. - 26, 2022 г. - 20, 2023 г. - 19. У всех выделенных штаммов была определена серогруппа. Наименьшее количество штаммов EPEC было выделено в 2022 и 2023 годах.

Анализ показал, что среди исследованных 133 штаммов EPEC были представлены 17 различных серогрупп эшерихий: O18, O20, O25, O26, O44, O55, O86, O91, O111, O114, O119, O125ac, O126, O127, O128, O142 и O158. Анализ регистрации штаммов *Escherichia coli*, выделенных от пациентов за последние пять лет, продемонстрировал, что, несмотря на рост общего числа этих бактерий, с каждым годом наблюдается сокращение разнообразия их серогрупп.

В 2019 и 2020 годах наблюдался пик разнообразия серогрупп - 17.

В 2021 году количество серогрупп снизилось до 16, а с 2022 года тенденция к сокращению продолжилась: 13 серогрупп в 2022 году и 7 - в 2023.

Анализ доли серогрупп *Escherichia coli* выявил устойчивый рост серогруппы O26: 12% в 2019 году, 16,8% в 2020 году, 23,4% в 2021 году, 28,7% в 2022 году и 36,3% в 2023 году. Средний показатель за изученный период составил 21,5%

Также наблюдается тенденция к увеличению доли серогруппы O111: 12% в 2019 году, 14,4% в 2020 году, 16,7% в 2021 году, 20,7% в 2022 году и 19,7% в 2023 году. Среднее значение за изученные годы составило 16,0%. На следующих местах по частоте встречаемости находятся серогруппы *Escherichia coli* O155 и O114, с показателями 14,3% и 11,0% соответственно.

За период с 2019 по 2023 годы было выявлено от 7 до 17 различных серологических групп ЕРЕС. Наиболее часто в эти годы регистрировались серогруппы *Escherichia coli* O26 (21,5%), O111 (16,0%), O155 (14,3%) и O114 (11,0%). Установлено, что серогруппы *Escherichia coli* O20, O91 и O158 встречались наиболее редко (0,5%).

ГЛАВА-IV. ПАТОГЕННЫЕ СВОЙСТВА КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИИ

4.1. Бактериоциногенные свойства стафилококков

Явление бактериоциногении многие исследователи связывают со свойствами патогенности и с резистентностью к антибиотикам у бактерий. Так Петлеван Я. (2022), Паранько С. И. и др. (2006), Г. М. Одилова, М. И. Юсупов и др. (2020) отмечают, что бактероциногенные штаммы чаще выявляются среди антибиотикорезистентных вариантов. В то же время Н.И. Мамарасулова (2022) указывает, что пенициллин чаще подавляет рост стрептоциногенных культур, чем инертных.

Цель исследования - изучить бактериоциногенные свойства стафилококков после приобретения ими устойчивости к антибиотикам и определить частоту выявления бактериоциногенных культур у антибиотикоустойчивых и чувствительных стафилококков, выделенных в городе Самарканде.

В работе использован 21 штамм бактериоциногенных стафилококков, выявленных ранее. Чувствительность исходных штаммов к пенициллину и стрептомицину определена методом серийных разведений. Для получения антибиотикорезистентных вариантов был применен метод серийных пассажей стафилококков на питательном бульоне с возрастающими концентрациями антибиотика.

Из 21 исходного штамма стафилококков высоко чувствительны к пенициллину были 12 культур и 9 - чувствительны, к стрептомицину высокочувствительны - 18 штаммов и чувствительны - 3. Получено 19 субкультур устойчивых к пенициллину и 17 устойчивых к стрептомицину. По морфологическим, тинкториальным и культуральным свойствам антибиотикорезистентные варианты не отличались от исходных, штаммов. Было отмечено снижение ферментативной активности у некоторых антибиотикорезистентных штаммов, 7 субкультур устойчивых к пенициллину и 4 штамма резистентных к стрептомицину утратили гемолитическую активность. Лецито-вителлазные свойства утратили 4 стрептомицинорезистентных и один пенициллинорезистентный варианты. Незначительные изменения произошли в способности культур агглютинироваться в кроличьей плазме (лишь 2 штамма утратили это свойство). Ни одна из культур не перестала коагулировать плазму, только у 4 штаммов несколько удлинился срок коагуляции.

При определении бактериоциногенных свойств было установлено, что с приобретением резистентности к пенициллину и стрептомицину бактериоциногенная активность сохранилась. Полученные субкультуры ингибировали те же индикаторные штаммы, что и исходные. Однако размеры зон задержки роста в некоторых случаях оказались различными у исходных штаммов и их устойчивых к антибиотикам вариантов.

Три субкультуры, устойчивые к пенициллину, и две - к стрептомицину давали зоны ингибиции больших размеров, чем исходные штаммы, а одна

устойчивая к пенициллину культура, напротив, образовывала зону ингибиции меньших размеров.

У других штаммов зоны задержки роста индикаторного штамма не изменялись.

При выявлении бактериоциногенных штаммов стафилококков, выделенных, от больных с гнойничковыми поражениями кожи (45 культур из очага поражения и 31 штамм со слизистой носа и зева), не была отмечена зависимость бактериоциногенных свойств от резистентности к антибиотикам. Из 76 бактериоциногенных культур 41 была устойчива к антибиотикам (пенициллину, стрептомицину, антибиотикам тетрациклинового ряда).

1. Бактериоциногенные свойства стафилококков не изменяются с приобретением устойчивости к антибиотикам.

2. Морфологические, тинкториальные и культуральные свойства устойчивых к пенициллину и стрептомицину субкультур не отличаются от исходных, частично утрачивается способность гемолизировать бараньи эритроциты и теряется лецито-вителлазная активность.

3. Бактериоциногенная активность стафилококков не зависит от чувствительности и резистентности культур к антибиотикам.

Распространение стафилококковых инфекций и тяжесть течения их зависит от нарастания устойчивости возбудителя к антибиотикам, часто необоснованно применяющимся в клинике. Выявление чувствительности микробов к антибиотикам необходимо врачу при выборе нужного препарата для лечения. Между тем метод определения с помощью бумажных дисков, широко применяемый в лабораториях, не точен и ограничен недостаточным количеством имеющихся в распоряжении бактериолога стандартных дисков.

В связи с этим, мы воспользовались методом определения чувствительности по отношению к 10 широко применяющимся в клинике антибиотикам (левомицетин, синтомицин, биомицин, пенициллин,

террамицин, мицерин, стрептомицин, тетрациклин, эритромицин, колимицин).

Бактериологическому обследованию подвергнуто 114 больных детей в возрасте до 3 лет с острыми желудочно-кишечными инфекциями. Из кала 28 % больных высеяны шигеллы, 8 % - энтеропатогенные кишечные палочки и у 35 % детей найдены патогенные стафилококки.

Среди 68 здоровых детей до 3 лет патогенные стафилококки были высеяны из кала у 5 %.

Из 12 штаммов лишь 4 дизентерийных, 1 колипатогенный и 4 стафилококка оказались устойчивыми ко всем 10 антибиотикам. Шигеллы и патогенные кишечные палочки, чувствительные к колимицину и левомицетину, были устойчивы и к биомицину.

На штаммы патогенных стафилококков наиболее сильное действие оказали левомицетин (95 %), колимицин (82 %), а также эритромицин и мицерин (71 и 66 %).

Из детей, больных острыми желудочно-кишечными инфекциями стафилококковой этиологии, у 19 было проведено комплексное лечение несколькими антибиотиками, к которым возбудители *in vitro* оказались чувствительными.

У большинства детей токсические явления исчезли, и нормализация стула наступила в 1-ю неделю болезни. Все больные были выписаны из стационара в течение 15 дней после поступления. Анализы кала на стафилококки были отрицательными.

У 6 детей, которым лечение проводили 1 антибиотиком, нормализация стула наступила на 10-й день и позже; в кале содержались патогенные стафилококки. Детей задерживали в стационаре более 2-3 недель в связи с диспепсическими явлениями.

У 10 больных выделены, помимо патогенных стафилококков, патогенные кишечные палочки; у них заболевание протекало тяжело. Вовремя начатое лечение в соответствии с чувствительностью обеих культур

к антибиотикам на фоне общеукрепляющей терапии привело к успешным результатам. Возбудитель больше не обнаруживался в кале, в 6 случаях стул нормализовался до 5-го дня болезни.

Общеукрепляющая терапия (аэро-, дието- и витаминотерапия, борьба с токсикозом, применение биогенных стимуляторов и все мероприятия по выхаживанию больных) привела к излечению 9 детей из 14 без назначения антибиотикотерапии. В кале 5 больных при выписке были обнаружены патогенные стафилококки.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что, по-видимому, антибиотикотерапия не всегда является решающей у детей при острых желудочно-кишечных заболеваниях стафилококковой этиологии. Общеукрепляющее лечение - основное и предпочтительное и во всех случаях служит благоприятным фоном для максимальной эффективности антибиотиков, к которым чувствителен выделенный возбудитель.

4.2. Токсикоинфекции стафилококковой этиологии

Выяснение структуры токсина стафилококков, вызывающих желудочно-кишечные заболевания у детей, имеет важное теоретическое и практическое значение. Типы гемолизина у стафилококков, выделяемых при кишечных заболеваниях у детей, изучались немногими авторами и на небольшом числе штаммов. Между тем исследование токсина стафилококков при кишечных заболеваниях необходимо для разработки методов специфической терапии.

Способность вырабатывать энтеротоксин изучалась главным образом у стафилококков, вызывающих пищевые отравления, причем доказано, что в патогенезе последних энтеротоксин играет ведущую роль.

Образованию энтеротоксина стафилококками, выделяющимися при стафилококковых колитах и энтероколитах, посвящены лишь единичные работы, проводившиеся на небольшом материале; в работах сообщается

только количество штаммов стафилококков, образывавших энтеротоксин, но не указывается, могут ли стафилококковые колиты и энтероколиты у детей вызываться стафилококком, не продуцирующим энтеротоксина Саросассиа, основываясь на клинических наблюдениях над взрослыми людьми, допускал такую возможность.

Мы определяли тип гемолизинов и изучали способность стафилококков вызывать гемолиз на агаре с кроличьей и бараньей кровью. Проводили нейтрализацию гемолизинов α -антитоксической сывороткой. Посевы испытуемых культур производили на чашки с кровавым агаром, приготовленным на основе перевара Хоттингера, с дефибрированной кровью - кроличьей или бараньей.

Культуры засеивали сплошным штрихом из расчета 4 культуры на 1 чашку. После посева по диаметру чашки перпендикулярно к штрихам на поверхность среды помещали полоску фильтровальной бумаги, пропитанную противостафилококковой антитоксической сывороткой.

Мы пользовались α -антитоксической сывороткой, содержащей 110 и 85 АЕ в 1 мл. Посевы выдерживали при 37° в течение суток и затем в холодильнике при 4-8° в течение суток, после чего учитывали результаты. О наличии гемолизина типа α судили по гемолизу кроличьих и бараньих эритроцитов (или только кроличьих) в течение суток при 37° и по нейтрализации гемолиза антитоксической сывороткой.

Гемолизин типа β определяли по «тепло-холодовому» гемолизу бараньих эритроцитов, не нейтрализуемому α -антитоксической сывороткой, по характерному послойному гемолизу на агаре с бараньей кровью и по отсутствию гемолиза кроличьих эритроцитов. Гемолизин типа Δ определяли по узкой полоске гемолиза бараньих и кроличьих эритроцитов, не нейтрализуемого α -антитоксической сывороткой.

Энтеротоксин стафилококков получали путем выращивания испытуемой культуры на полужидком мартеновском агаре в атмосфере

углекислоты. Наличие энтеротоксина определяли посредством внутрисердечного введения котятм надосадочного слоя культуры.

Типы гемолиза были изучены у 42 штаммов коагулазоположительных стафилококков. Из них 26 штаммов были выделены из фекалий детей с различными формами стафилококковых поражений кишечника, 9 - из промывных вод, рвотных масс и пищевых продуктов при пищевом отравлении и 7 штаммов - из фекалий здоровых детей.

В группе стафилококков, выделенных при стафилококковых диареях, преобладает $\alpha \beta$ -гемолиз, реже встречается $\alpha \Delta$ -гемолиз и α -гемолиз. Среди стафилококков, изолированных при пищевом отравлении, преобладает $\alpha \beta$ -гемолиз. В группе стафилококков, выделенных от здоровых детей, преобладает $\alpha \Delta$ -гемолиз.

Проба на энтеротоксин была поставлена с 7 штаммами коагулазоположительных стафилококков, из них 6 штамма были выделены у детей со стафилококковыми колитами и энтероколитами, остальные 2 штаммов - при пищевых отравлениях.

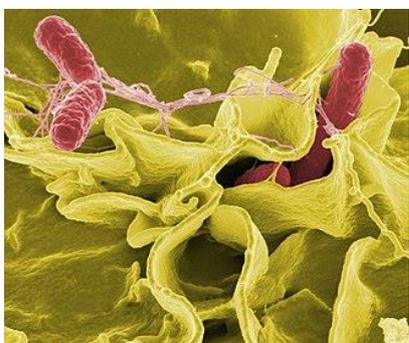
Из 6 штаммов, полученных при стафилококковых кишечных заболеваниях, 3 продуцировали энтеротоксин: у остальных 3 этот токсин не обнаружен. Для проверки на энтеротоксин мы выбирали культуры патогенных стафилококков, выделенные от детей с ясно выраженной картиной стафилококкового заболевания кишечника, и все же в половине случаев нам не удалось выявить способности продуцировать этот токсин. По-видимому, стафилококки, не образующие энтеротоксин, также могут вызывать у детей заболевания кишечника. Все 2 штаммов стафилококков, выделенные при пищевых отравлениях, вырабатывали энтеротоксин.

Выводы. Стафилококки, вызывающие желудочно-кишечные заболевания у детей, продуцировали $\alpha \beta$ -, $\alpha \Delta$ - или - α -гемолизин. Патогенные стафилококки, не продуцирующие энтеротоксина, могут вызывать заболевания кишечника у детей.

4.3. особенности изменения биоценоза кишечника при сальмонеллезной инфекции

Проблема лечения острых кишечных инфекций у детей, является одной из актуальных для современного здравоохранения. Социально-экономическая значимость этих инфекций определяется не только высокой заболеваемостью, но и тяжестью течения с летальностью до 4,3%, формированием бактерионосительства.

Несмотря на успехи, достигнутые в области изучения этиологии и эпидемиологии бактериальных кишечных инфекций, в том числе сальмонеллеза, проблема, связанная с распространением этих заболеваний, остается значимой до сих пор, как в нашей стране, так и во всем мире. Актуальность проблемы сальмонеллеза определяется тем, что в современных условиях существенно изменились характер развития эпидемического процесса, биологические свойства возбудителей, формы проявления инфекционного процесса.



Как источник сальмонеллезной инфекции в настоящее время, наряду с животными, выявлена значительная роль людей - носители бактерий сальмонелл. Обширными исследованиями, особенно российских авторов, установлена возможность весьма длительных сроков выделения бактерий сальмонелл у людей. Выделение сальмонелл могут происходить месяцами и даже годами, при этом с испражнениями животных выделяются *Salmonella*, обладающие ферментативными и вирулентными свойствами. При сальмонеллезных заболеваниях среди людей существенным путем заражения является алиментарный, связанный с употреблением в пищу обсемененных продуктов сальмонеллами. О случаях заболеваний людей сальмонеллезами в результате прямого контакта с инфицированными животными и птицами, в

частности с собаками, кошками, утками, гусями, индейками, курами и даже голубями в литературе имеются подтверждения ряда исследователей.

Вода также часто служит важной ролью в качестве прямого или опосредованного фактора передачи инфекции. Помимо алиментарного пути заражения, являющегося основным, существуют воздушно-капельный и контактный путь заражения. В детских коллективах описаны случаи воздушно-капельного инфицирования. Большое значение с санитарно-эпидемиологической точки зрения имеет вопрос о том, все ли бактерии рода сальмонелла могут быть патогенны для человека и животных, или же часть их облигатно-патогенно, а часть бипатогенно. Накопленное большое количество данных из медицинской и ветеринарной практики свидетельствует о том, что разделение сальмонелл для человека и животных на моно- и бипатогенные не имеет оснований.

В настоящее время описаны многочисленные заболевания людей, обусловленные такими сальмонеллами, которые долго считались патогенными только для животных или птиц (*S. pullorum*, *S. enteritidis*). С другой стороны, все чаще и чаще описываются случаи выделения у животных чисто «человеческих» штаммов, особенно *S. paratyphi*. Однако необходимо отметить, что к тому или иному организму определенная адаптивность отдельных типов сальмонелл, несомненно имеется, но абсолютной монопатогенности данного возбудителя эта избирательность не определяет.

До настоящего времени еще недостаточно изучены клинические признаки сальмонеллезных заболеваний людей, что нередко приводит к ошибке в постановке диагноза, в частности при токсикоинфекциях сальмонеллезного происхождения. На современном этапе одной из эпидемиологических особенностей сальмонеллеза является выраженная тенденция к росту заболеваемости во многих, в первую очередь в экономически развитых странах мира. На промышленной основе это связано с интенсификацией животноводства, с изменением характера и масштабов

реализации продуктов питания, большим увеличением экспортно-импортных связей между странами, а также с интенсификацией миграционных процессов. Из токсикоинфекций сальмонеллезной этиологии у людей наибольшую опасность представляют сальмонеллезные (паратифозные) заболевания взрослого крупного рогатого скота - паратифозные энтериты, а также вторичные сальмонеллезные заболевания и бактериовыделение при убое животных, по причине затруднительной диагностики этих заболеваний.

Учеными при многочисленных наблюдениях обнаружено, что большая роль в сальмонеллезных токсикоинфекциях принадлежит водоплавающим птицам, особенно уткам, зараженным различными сальмонеллами, чаще всего *S. typhimurium* и *S. enteritidis*, реже *S. anatum*. В мясе и органах сальмонеллезных птиц обнаруживается возбудитель инфекции, главным образом *S. typhimurium*, а также в их яйцах и на яичной скорлупе. Крайне важно отметить, что пищевые продукты мясо, молоко, яйца, рыба и другие, обсемененные бактериями сальмонеллами, как правило, не имеют внешних изменений и их органолептические данные, внешний вид, вкус и запах обычно не внушают никаких особых подозрений. Заболевание сальмонеллезом может встречаться как в виде отдельных спорадических случаев, так и в виде вспышек. Заболеваемость сальмонеллезом в настоящее время остается относительно высокой в течение всего года, некоторые подъемы отмечают в теплое время года. Наблюдается устойчивая тенденция к росту заболеваемости сальмонеллезами во всем мире. Удельный вес сальмонеллезов в структуре регистрируемых кишечных инфекций, таких как шигеллезы, эшерихиозы, кампилобактериозы, иерсиниозы и др., в Англии, США, Германии, Швейцарии и других странах достигает 35-90%. Многие факторы способствуют широкому повсеместному распространению сальмонеллезов и в частности, обилие источников возбудителей: крупный и мелкий рогатый скот, лошади, собаки, кошки, дикие животные (волки, лисы, бобры, медведи), грызуны, домашние и многие дикие птицы (утки, гуси, куры, индейки, куропатки, голуби, воробьи, ласточки, чайки и другие).

Зараженность групп этих животных колеблется от 6 до 80%. Главной причиной перенесенных пищевых отравлений и инфекций во многих странах мира являются бактерии рода *Salmonella*. Ежегодно серотипы *Salmonella spp.* в Соединенных Штатах затрагивают приблизительно от 2 миллионов до 3 миллионов человек, заболевание которых заканчивается летальным исходом от 500 до 2000 случаев. Два самых общих серотипа, изолированные у человека в 2000 году были *S. enterica* серотип *Typhimurium* и *S. enterica* серотип *Enteritidis*. Сальмонеллезы, будучи зоонозной инфекцией, приносят животноводству большой экономический ущерб из-за уменьшения продуктивности животных, гибели молодняка, из-за расходов на диагностику, на ветеринарную обработку зараженных помещений, на проведение выбраковки животных при убое и т.д. В США годовой убыток, наносимый заболеваниями сальмонеллезами, оценивается в 1,2 млрд. долларов. В Великобритании, где каждый день потребляется около 30 млн. яиц, - заражение *S. enteritidis* наносит экономический ущерб в размере 31,45 млн. долларов, который образовался вследствие уничтожения 396 млн. яиц и около 4 млн. кур-несушек. Для изучения изменяющихся случаев пищевой токсикоинфекции имеют важное значение исходные данные наблюдений. Однако, хотя страна и имеет эффективные системы надзора, но все-таки трудно оценить реальное количество случаев возникновения сальмонеллезной инфекции. Нарушения эпизоотической ситуации птицеводческих хозяйств наиболее часто влияет на ухудшение благополучия эпидемической обстановки, связывают это с использованием в пищу зараженной продукции мяса птицы, яйца и др. Инфицированность различных видов птиц в неблагополучных по сальмонеллезу хозяйствах различная: утки - 19,5%, индейки - 3,8%, куры - 4,7%. Однако, *Salmonella* обнаруживают у клинически здоровых птиц и в благополучных птицеводческих хозяйствах. Высокий уровень загрязнения сальмонеллами мяса птицы во многом этим определяется. О заражении людей после употребления яиц и различных яйцепродуктов, обсемененных сальмонеллами, существует значительный

информационный материал. В США проявление сальмонеллезов в 46-69% у людей в значительной степени связывается с сельскохозяйственными животными и пищевыми продуктами, изготовленными из их мяса. При этом заражение антибиотикочувствительными зоонозными штаммами сальмонелл смертность была значительно выше, чем больных зараженных антибиотикорезистентными антропонозными сальмонеллами в 21 раз. Значение уровней обсеменения продуктов питания сальмонеллами и способов подготовительной обработки мяса и мясных продуктов играют важную роль в возникновении случаев сальмонеллезных токсикоинфекций. Тем более это, что *Salmonella* выделяют при исследовании, как мяса, так и мясных продуктов в значительном количестве случаев от 6,1 до 11,3%. Более высокая инфицированность на примере крупного рогатого скота установлена у молодых животных, если у коров от 0,4 до 1%, то у телок от 0,9 до 7,14%, а у телят от 1,7 до 17%. У людей случаи вспышек пищевой токсикоинфекции часто выявляются при употреблении мяса свиней. Также часто выявляются у свиней вторичные сальмонеллезы при вспышке чумы, болезни Ауески, при вспышке лептоспироза, септикопиемии, при гепатитах и истощениях. В качестве причины пищевых токсикоинфекций тем не менее, отмечено редкое выявление возбудителей сальмонеллезов ягнят и жеребят. Наиболее частой причиной пищевых токсикоинфекций у людей являются вторичные случаи сальмонеллезов животных. Их регистрируют у крупного рогатого скота при воспалительных патологиях желудочно-кишечного тракта, легких, вымени, матки, конечностей и резких изменениях физиологического статуса. Обсемененность сальмонеллами отмечена в продуктах убоя северных оленей при некробактериозе. О корреляции интенсивности поражения животных гельминтами и вторичными сальмонеллезами представлены сведения многих ученых. Однако, в технологии убоя, санитарное состояние окружающей среды перерабатывающих цехов и предприятий, имеют второстепенное значение. На эпидемиологическую и эпизоотическую обстановку усиленное влияние в последние время оказывает завоз импортной пищевой продукции

животного происхождения и кормов. Характеристика санитарного состояния в некоторых случаях вызывает сомнение и, это подтверждают следующие данные. Отсутствуют сведения о влиянии низких температур на выживаемость и сохранение патогенности сальмонелл в мясе птиц. Настойчивыми изысканиями эффективных способов снижения микробной инфицированности сальмонеллами тушек птиц занимаются многие ученые. С целью повышения гарантии качества выпускаемого мяса и мясопродуктов и улучшения сложной эпидемиологической обстановки существует необходимость повсеместного усиления ветеринарного контроля за убоем животных. Особое значение в связи с этим приобретает усовершенствование существующих и разработка новых методов обнаружения бактерий *Salmonella* в продукции животноводства и птицеводства. Все случаи вынужденного убоя сельскохозяйственных животных и переработки мяса, обсемененного сальмонеллами, вызывают особо пристальное внимание. Распространение сальмонелл происходит через сырое молоко и готовые переработанные молочные продукты. Сальмонеллы могут выдерживать процесс спонтанной ферментации молока, а их выживаемость зависит от типа сальмонелл, а также от периода ферментации и pH. Нагревание кислого молока до температуры от +35⁰ С до +60⁰ С в течение 2 часов полностью не убивает сальмонелл. Однако в инфицировании мяса животных и птиц играет немаловажную роль зараженность обслуживающего персонала на предприятиях по переработке продуктов животного происхождения. Нарушения санитарно-гигиенических правил при хранении и реализации готовых пищевых продуктов на предприятиях торговли вызывают распространение сальмонелл. Проявления эпидемического процесса сальмонеллезом, в настоящее время приобрели определенные узнаваемые черты - преобладание спорадических случаев, наличие вспышек, неравномерное территориальное распределение, заболеваемость преимущественно населения детского возраста.

Одним из путей возможного улучшения качества продукции животноводства и птицеводства, реализуемых на рынках является применение высокоэффективных методов микробиологического контроля. Существующие стандартные методы качественного и количественного анализа микроорганизмов – использование посевов на специальные дифференциально-диагностические среды, инкубация при различных температурах в зависимости от рода имеют низкую производительность, дороги и не позволяют оперативно оценивать количество бактерий в изучаемых объектах. В связи с тем, что в смывах с поверхностей оборудования одновременно содержатся различные микроорганизмы, способные затруднять выделение и идентификацию посторонней микрофлоры и от других видов бактерий. Оптимальным путем управления микробиологическими рисками является внедрение оперативного контроля. А это обеспечивается применением подходящих и быстрых инструментов анализа. Для ускоренного контроля санитарно-показательных, условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, а также микроорганизмов порчи предлагаются подложки Rida-Count - удобный готовый формат питательных сред для рутинного микробиологического контроля на убойных пунктах, предприятиях и рынках. Подложки Rida-Count представляют собой полимерную гибкую основу с нанесенной на нее пластифицированной хромогенной питательной средой, селективной к определяемому виду микроорганизмов. С помощью подложек легко можно выполнить количественный учет микроорганизмов в пробах сырья, на поверхности рук, тары, упаковки, технологического оборудования и в пробах воды. В комплект Rida-Count входят материалы в количестве, достаточном для 100 определений. Каждый комплект Rida-Count содержит 100 подложек (10x10), покрытых готовыми к использованию питательными средами. Преимуществом данных подложек является их гибкость и простота в использовании, широкий спектр применения, сокращенное время исследования при стоимости, сопоставимой с традиционными методами

микробиологического анализа. В настоящее время серийно выпускается восемь типов подложек Rida-Count, среди которых подложки для определения энтеробактерий, колиформ, сальмонелл, *E.coli*, дрожжей и плесеней и *Staphylococcus aureus*. Отдельно следует отметить подложки Rida-Count *Sal/Entero*, которые позволяют проводить дифференцированное определение сальмонелл и суммы энтеробактерий на одной подложке. Для скрининга сальмонелл в настоящее время также можно использовать иммуноферментные тест-системы Rida-Screen. Эти тест-системы характеризуются высокой избирательностью, что обусловлено принципом действия тест-системы. Например, чувствительность тест-системы *Rida-Screen Salmonella* составляет 1 сальмонелла на 25 или 50 г пробы. Анализ на содержание сальмонелл в пробе занимает 22,5–27 ч, включая стадию обогачения. Обычно стадию обогачения проводят в течение ночи, то есть, поставив пробу на обогачение в конце рабочего дня, к обеду следующего дня уже получают результат. С помощью тест-системы *Rida-Screen Salmonella* исследуется, как единичная проба, так и в серии проб (до 94 проб одновременно). Результат может быть оценен либо визуально, либо инструментальным методом при помощи любого ридера, подходящего для работы с планшетами для ИФА и возможностью работы при длине волны 450 нм (А.Галкин, А.Елагина-2013г.). В настоящее время широкую популярность среди практикующих специалистов получили тест-подложки Rida-Count с пластифицированной хромогенной питательной средой для определения ряда микроорганизмов (бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, БГКП, *E.coli*, золотистого стафилококка, сальмонеллы, дрожжей и плесневых грибов). Работа с ними проста, не требует использования специального дорогостоящего оборудования и может легко осуществляться ветеринарными специалистами хозяйства. Стерильные пластиковые пробирки, автоматическая пипетка-дозатор, стерильные наконечники к ней и термостат - практически и все, что нужно для проведения бактериологического анализа проб в хозяйстве. В наших исследованиях на ряду с использованием

традиционных методов (посев на мясопептонный агар, среды Эндо, Плоскирева, висмут-сульфит агар), также нами были использованы современные тест-подложки Rida-Count *enterobacteriaceae* и тест системы Rida - Screen для определения сальмонелл.

Последствия значительного роста сальмонеллезной инфекции в настоящее время не получило своего развития в изучение особенностей эпидемического процесса сальмонеллезом в зависимости от экологической обстановки. В единичных работах выявлено более тяжелое течение сальмонеллезом у больных, проживающих в неблагоприятных условиях, развитие болезни на фоне нарушения функции иммунитета.

В последние годы возрастает актуальность проблемы персистенции микроорганизмов в связи с увеличением частоты хронических и маломанифестных форм заболеваний, а также сложностей диагностики и лечения персистирующих инфекций.

В ряде научных работ показана возможность использования оценки персистентных свойств бактерий (антикомплементарной, антилизосимной активности) для прогнозирования течения инфекционного процесса сальмонеллеза. Вместе с тем значение антилактоферриновой активности в персистенции патогенов и в формировании реконвалесцентного бактерионосительства исследовано не в полной мере.

Характер взаимосвязанных нарушений в системе защиты хозяина при сальмонеллезной инфекции, определяемый этиологическим фактором с его биологической спецификой, накладывает отпечаток на формирование отношений в системе паразит-хозяин и свидетельствует о патогенетическом участии естественной резистентности и иммунитета организма в инфекционном процессе. Особый интерес вызывает вопрос о комплексном исследовании системного и местного иммунитета при сальмонеллезной инфекции, а также о влиянии техногенного загрязнения на некоторые показатели иммунного статуса при данном заболевании.

В основе патогенеза сальмонеллеза и шигеллеза, как острых кишечных инфекций с инвазивным характером взаимодействия возбудителя и макроорганизма, определены серьезные нарушения на уровне иммунной системы и гемостаза вплоть до развития диссеминированного микротромбообразования в зависимости от тяжести инфекционного процесса.

Именно изменения структуры инфекционной патологии, происходящие в настоящее время, определяют актуальность применения инфектологического подхода, предусматривающего изучение динамического взаимодействия хозяина и паразита на основе интегративной оценки биологических свойств возбудителя, состояния конститутивного (врожденного) и адаптивного (приобретенного) иммунитета организма человека для изучения особенностей течения инфекционного процесса и прогнозирования его исхода. Основой бактерионосительство одного из распространенных исходов инфекции, включая и сальмонеллез, является способность возбудителя персистировать в организме хозяина, рассматриваемая как следствие эволюционно закрепившихся взаимоотношений симбионтов в системе паразит-хозяин. Характер нарушений в системе защиты хозяина при сальмонеллезной инфекции определяется биологической спецификой сальмонелл, связанной со способностью к факультативному внутриклеточному паразитизму в организме хозяина, способностью инактивировать факторы естественной резистентности

Сложность решения ряда задач по снижению заболеваемости сальмонеллезом и шигеллезом связана с одной стороны с отсутствием средств специфической профилактики, а с другой - постоянным изменением спектра патогенности возбудителей, с возможностью смены их пейзажа за счет завоза новых сероваров, выработкой множественной лекарственной устойчивости данных бактерий к средствам этиотропной терапии, которая

приводит к неэффективности ранее широко применяемых в клинической практике антибактериальных препаратов.

Наиболее уязвимым контингентом кишечных инфекций являются дети раннего возраста. В структуре острых кишечных инфекций одно из первых мест занимает сальмонеллез. Особенно высока заболеваемость этой инфекцией у детей первого года жизни. Удельный вес его в структуре острых кишечных инфекций у детей в возрасте до одного года составляет от 17 до 75 % в разные годы.

Проблема сальмонеллеза приобретает особую остроту в связи с учащением случаев внутрибольничных вспышек, вызванных антибиотикорезистентным штаммом *S. typhimurium*, высокой частотой осложнений и неблагоприятных исходов. Сальмонеллез остается одной из причин летальных исходов и занимает ведущее место в структуре детской смертности. У детей первого года жизни заболевание протекает наиболее тяжело, нередко принимая затяжное течение. Сохраняется достаточно высоким процент хронических форм (11,2-26,3%), рецидивов (8%) и повторного бактериовыделения (42%). Высокую заболеваемость и летальность детей этой возрастной группы обуславливает ряд факторов, среди которых следует выделить незрелость гуморального иммунитета и факторов неспецифической защиты организма. В защите от сальмонеллезной инфекции играют роль не только циркулирующие в крови, но и секреторные антитела (SIgA), продуцируемые слизистыми оболочками пищеварительного канала. Они создают местный иммунитет входных ворот инфекции. Определение содержания SIgA может стать объективным критерием, дающим возможность прогнозировать тяжесть течения сальмонеллезной инфекции.

Среди факторов неспецифической защиты следует выделить нормальную микрофлору кишечника. Выращивание животных в стерильных условиях позволило показать, что общий пул иммуноглобулинов в организме создается под влиянием антигенной стимуляции иммунологической системы

со стороны аутохтонной флоры. При заболевании детей острых кишечных инфекций состав нормальной микрофлоры кишечника изменяется под влиянием токсинов патогенной флоры на фоне измененной реактивности организма.

Изучение особенностей клинического течения, изменения микрофлоры кишечника и показателей местного иммунитета при сальмонеллезной инфекции у детей в возрасте до одного года, а также поиск путей оптимизации дисбиотических и иммунологических нарушений остается актуальным. Работ по изучению изменения микрофлоры и показателей секреторного иммуноглобулина А при сальмонеллезе у детей в возрасте до одного года в доступной литературе не встретилось.

Цель исследования - изучить особенности клинического течения, изменения биоценоза кишечника и показателей секреторного иммуноглобулина А в сыворотке крови и в копрофильtrate у детей с сальмонеллезом в возрасте до одного года.

На основе большого клинического материала представлены сведения о факторах риска, особенностях формирования, динамике в остром периоде и периоде реконвалесценции клинических проявлений, микробиологических и иммунологических нарушений при сальмонеллезе у детей первого года жизни.

Изучены особенности изменения биоценоза кишечника в различные периоды болезни и динамика ее восстановления при сальмонеллезной инфекции у детей данной возрастной группы в зависимости от формы и тяжести течения заболевания.

Дана динамическая характеристика изменения показателей секреторного иммуноглобулина А в крови и копрофильtrate при сальмонеллезе у этих детей в зависимости от клинической формы и тяжести течения заболевания.

Описаны особенности клинического течения, изменения микрофлоры кишечника и показателей местного иммунитета при сальмонеллезной

инфекции, вызванной «госпитальным» штаммом *S. typhimurium* у детей в возрасте до 1 года, что важно для определения лечебно-диагностической тактики.

Для выяснения характера заболевания, степени и глубины процесса использованы следующие методы: общеклиническое обследование, эпидемиологический анализ, лабораторные методы (бактериологическое исследование кала, анализ кала на дисбактериоз, определение секреторного иммуноглобулина А в сыворотки крови и в копрофильtrate).

В общеклиническое обследование входил тщательный сбор анамнеза, характеристика общего состояния, данные физикальных и лабораторных исследований. За время пребывания в стационаре проводился ежедневный осмотр больных, данные осмотра и жалобы фиксировались в специально разработанных картах.

Анализ кала на дисбактериоз проводился при поступлении и через 7-10 дней, на патогенную кишечную группу минимум два раза (при поступлении и перед выпиской). Секреторный иммуноглобулин А в крови и в копрофильtrate определялся при поступлении и в динамике через 7-10 дней. При выписке больные ставились на учет в кабинет катамнеза для дальнейшего наблюдения и обследования. Наблюдение детей проводилось через 20-30 и через 40-90 дней после выписки из стационара.

Микробиологические исследования включали качественное и количественное определение состава микрофлоры толстого кишечника. Исследуемый материал засеивали на дифференциально - диагностические среды для определения бифидобактерий, лактобактерий, кишечных палочек, молочно - кислых стрептококков, энтерококков, стафилококков, дрожжеподобных грибов рода Кандида и других условно - патогенных микроорганизмов. Исследование содержимого толстого кишечника проводилось по методической разработке А.П. Андрейченко (1996 г.).

Все полученные данные при клинических и лабораторных исследованиях обработаны статистически. Разность показателей оценивалась

по методу Стьюдента. С этой целью использовался метод вариационной статистики с вычислением средних арифметических величин (M), средней ошибки средней величины (m) и коэффициента t для определения степени достоверности различий (P) между показателями. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Исследование в копрофильtrate указало на достоверное увеличение его количества и частоты встречаемости по сравнению с 1-3 днем болезни. Такая же тенденция отмечалась и у показателей в сыворотке крови. По сравнению с 1-3 днем болезни отмечалось достоверное ($p < 0,001$) увеличение частоты встречаемости и количества SIgA в сыворотке крови. Рассматривая изменение в зависимости от возраста детей мы определили, что максимальное его увеличение в этот период в копрофильtrate наблюдалось у детей первого полугодия, в сыворотке крови у детей в возрасте 3-6 месяцев жизни. Рассматривая изменение в зависимости от формы тяжести заболевания на 8-10 день болезни в подгруппе 1А его среднее количество в копрофильtrate и в сыворотке крови было больше (различия достоверны).

Среди заболеваний сальмонеллезной этиологии наряду с наиболее часто встречающимися гастроэнтеритами, тифоподобными, дизентериеподобными формами наблюдается септическое и гриппоподобное течение, при котором нарушение функций желудочно-кишечного тракта выражено. В этих случаях для уточнения диагноза большое значение приобретают лабораторные методы исследования, особенно исследования крови на выделение гемокультуры.

В связи с расщфрованием показаний к исследованию крови у лихорадящих больных на выделение гемокультуры в нашей лаборатории удалось установить этиологическую роль сальмонелл при гриппоподобных заболеваниях у 4 больных. Заболевание протекало со сходной клинической картиной, характерной для гриппа. Кишечные дисфункции отсутствовали у всех 4 больных. Кровь на выделение гемокультуры взяли на 2-й день заболевания у 2 больных, на 6-й день - у 1 и на 11-й день - также у 1 больного.

У первых 2 больных выделены *S. typhimurium* и *aureus*, у 3-го - также *S. typhimurium*, а у 4-го больного 1 - *S. saprophyticus*.

Таким образом, во всех приведенных случаях гриппоподобные заболевания вызваны сальмонеллами группы В. Результаты контрольных трехкратных исследований фекалий у всех 4 больных были отрицательными. При бактериологическом обследовании лиц, бывших в общении с этими больными, сальмонеллы и другие патогенные энтеробактерии не обнаружены.

Приведенные примеры убедительно доказывают эффективность исследования крови лихорадящих больных для выяснения истинной этиологии гриппоподобных заболеваний.

Проводя анализ полученных данных, можно отметить, что в динамике заболевания происходит нарушение равновесия микробных ассоциаций. Из обследования при поступлении в стационар мы выявили предшествующие сальмонеллезу дисбиотические нарушения. Дальнейшее наблюдение позволяет сделать вывод, что по мере развития патологического процесса в микробиоценозе кишечника происходят более выраженные изменения. Клиническое выздоровление опережает сроки бактериального очищения организма от патогенной флоры и восстановления нормальной микрофлоры. Это определяет необходимость диспансерного наблюдения переболевших сальмонеллезом детей.

Сальмонеллез у детей в возрасте до одного года проявлялся главным образом в виде манифестных форм с преобладанием желудочно-кишечной, которая чаще протекала по типу гастроэнтероколитического и энтероколитического варианта.

У всех детей, поступающих в стационар с сальмонеллезом, дисбактериоз кишечника был уже сформирован. Нарушения микробных ассоциаций были выражены в большей степени у детей первых 6 месяцев жизни.

Идентифицирован комплекс значимых факторов, определяющих исход сальмонеллезной инфекции у людей. Три фактора («клеточный иммунитет», «местный иммунитет», «взаимосвязь иммунитета и персистентных свойств сальмонелл») определяют трансформацию заболевания без носительства. Четвертый фактор «клеточные механизмы антимикробной защиты», не связанный с без носительства, определяет выздоровление без носительства.

Полученные нормативные значения комплекса показателей местного иммунитета, определяемые в копрофильтратах и слюне, могут быть использованы в качестве референсных при клинических лабораторных исследованиях.

Предложен алгоритм прогнозирования сальмонеллезного без носительства с использованием диагностических коэффициентов по комплексу показателей, характеризующих персистентные свойства сальмонелл, системный, местный иммунитет и микробиоценоз кишечника.

Установлена взаимосвязь между изменением количества индигенной микрофлоры и степенью выраженности патологического процесса.

Взаимосвязь преморбидного фона детей раннего возраста с тяжестью течения сальмонеллезной инфекции определяет мероприятия по санации детей и коррекции микрофлоры кишечника как основного этапа профилактики сальмонеллеза.

ГЛАВА-V. О ЦЕННОСТИ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ В ДИАГНОСТИКЕ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ

5.1. Реакция нейтрализация при кишечных инфекций

Реакция нейтрализации (РН) - это универсальная реакция, которая служит эталоном при оценке других серологических реакций. Принцип ее состоит в том, что при взаимодействии антигена (вируса) с гомологичными антителами образуется комплекс антиген +антитело, в результате нейтрализуется инфекционность вируса. Антитела иммунной сыворотки

способны нейтрализовать повреждающее действие микробов или их токсинов на чувствительные клетки и ткани, что связано с блокадой микробных антигенов антителами, т.е. их нейтрализацией. Однако реакции нейтрализации применяют и с диагностическими целями. Особенно широкое применение они получили в микробиологической практике для серологической диагностики инфекционных заболеваний.

Реакция нейтрализации колигемолизина сыворотками больных и реконвалесцентов применяется отдельными авторами для доказательства этиологической роли кишечной палочки при циститах, пиелитах, холециститах, аппендицитах, кишечной колиинфекции и некоторых гинекологических и острых респираторных заболеваниях.

Иммунологические сдвиги у детей при инфекциях, вызванных кишечной палочкой, обычно изучают в отношении антиколигемолизина или агглютининов. Диагностическую ценность обеих реакций можно установить при одновременной их постановке и сопоставлении полученных данных, что и было задачей нашей работы.

Титр антиколигемолизина в крови взрослых людей колеблется от 1:50 до 1:1600. У новорожденных антиколигемолизин практически не содержится в крови, так как он не переходит от матери через плаценту. Антиколигемолизин в молоке матери определяется в количествах, близких к его содержанию в крови.

Относительная невосприимчивость детей старшего возраста и взрослых, а также детей раннего возраста, перенесших колиинфекцию, к заражению патогенными типами кишечной палочки обусловлена антитоксическим иммунитетом, проявляющимся высокими показателями содержания антиколигемолизина в крови что подтверждено нами в эксперименте.

Обследовано 110 детей в возрасте от 2 месяцев до 2 лет, из них 90 госпитализированных по поводу кишечных расстройств и 20 страдающих соматическими некишечными заболеваниями. Среди 90 детей, лечившихся

по поводу острых кишечных расстройств (колит, диспепсия и т. п.), патогенные кишечные палочки выделены у 9 и им поставлен диагноз кишечной колиинфекции.

У всех детей при поступлении брали кровь и определяли содержание антиколигемолизина путем постановки реакции нейтрализации гемолизина.

В качестве продуцентов гемолизина мы использовали штамм, кишечной палочки, условно обозначенный 2 ч. и выделенный от больного циститом, и штамм 2/7, выделенный у морской свинки, погибшей от кишечной колиинфекции. Для получения колигемолизина кишечную палочку засеивали в 1 % пептонную воду с 0,5 % глюкозы (рН 7,4). После 4-часовой инкубации при 37° С культуру центрифугировали и надосадочную жидкость использовали в качестве гемолизина в ряде разведений (от 1:2 до 1:128).

Для определения гемолитической активности в каждую пробирку с разведенной надосадочной жидкостью добавляли по мл 2 % взвеси эритроцитов кролика. Пробирки помещали сначала на 1 час в термостат при 37° С, а затем еще час выдерживали при комнатной температуре, после чего учитывали гемолиз. За 1 минимальную гемолитическую дозу принимали наименьшее количество надосадочной жидкости, способное вызвать полный лизис 0,5 мл 2 % взвеси эритроцитов кролика. Для штаммов кишечной палочки 2 ч. и 2/7 минимальная гемолитическая доза равнялась 0,032 мл надосадочной жидкости (разведение 1:32).

Для определения антиколигемолизина испытуемую сыворотку разводили физиологическим раствором от 1:25 до 1:3200. В пробирки вносили по 1 мл каждого разведения сыворотки и добавляли по 10 (МГД) в объеме 0,5 мл (например, 64 мл гемолизина и 36 мл физиологического раствора). Затем пробирки встряхивали и помещали на 15 минут при 37° С. По истечении этого времени во все пробирки со смесью сыворотки и гемолизина добавляли 0,5 мл 2 % взвеси эритроцитов кролика. Пробирки выдерживали 45 минут в термостате и 1 час при комнатной температуре,

после чего учитывали результат реакции. Титром антиколигемолизина считали разведение сыворотки, которое полностью нейтрализовало гемолиз, осуществляемый 10 (МГД).

В качестве контроля в одной пробирке к 1 мл физиологического раствора и 0,5 мл гемолизина добавляли 0,5 мл 2 % взвеси эритроцитов, в другой ставили опыт с сывороткой, обладающей известным антиколигемолитическим титром. Антиколигемолитическую активность сыворотки определяли параллельно в отношении гемолизина штаммов 2 ч. и 2/7.

Уровень титров антиколигемолизина у детей, страдавших острыми кишечными расстройствами и соматическими заболеваниями, определяли при поступлении этих больных в стационар. Результаты исследований представлены в табл. 1.

Таблица 1.

Содержание антиколигемолизина в крови детей при поступлении в стационар

Заболевания	Число детей с титром антиколигемолизина					Всего детей
	0	1:25	1:50	1:1000	1:2000	
Острые кишечные расстройства	23	50	13	3	1	90
Некишечные соматические заболевания	12	7	1	-	-	20
Итого	35	57	14	3	1	110

Содержание антиколигемолизина в крови при соматических некишечных заболеваниях было ниже, чем при острых кишечных расстройствах. Сопоставление показателей содержания антиколигемолизина у детей и взрослых позволяет расценивать титры 1:50-1:200 у детей в возрасте до 2 лет как повышенные.

У 65 детей, страдавших острыми кишечными расстройствами, одновременно с определением антиколигемолитической активности в сыворотках определяли О-агглютинины к аутоштаммам кишечной палочки. Антиколигемолизин в титре 1:50 и более и агглютинины найдены у 19 (27,05 %) детей. Антиколигемолизин и О-агглютинины обнаружены одновременно у 12 из 19 человек, а у 7 выявлен только антиколигемолизин в титре 1:50 и более. Для выявления динамики накопления антиколигемолизина и О-агглютининов у 37 детей, страдавших острыми кишечными расстройствами, удалось изучить парные сыворотки. Интервал между 2 взятиями крови составляет 15 дней.

Таблица 2

**Титры антигемолизина и О-агглютининов у детей с острыми
кишечными расстройствами**

Возраст	Сыворотка I		Сыворотка II		Серотип	АГЛ к типам
	О-АГЛ	АГ	О-АГЛ	АГ	E.coli	E.coli
2 месяца	0	0	1:50	1:25	-	-
2 »	0	0	1:200	1:50	-	-
3 »	0	1:25	1:50	1:50	-	-
5 месяцев	0	0	0	1:50	-	-
8 »	0	1:25	0	1:50	-	-
9 »	0	1:25	1:100	1:100	O55	O55
9 »	0	1:50	0	1:100	-	-

10	»	0	1:25	1:25	1:25	O22	O22
11	»	1:200	1:25	1:400	1:50	-	-
1	год	0	1:25	1:50	1:100	-	-
1	»	0	1:25	1:50	1:50	-	-
Старше	1	0	1:25	1:50	1:50	O55	O55
года		1:25	1:25	1:25	1:100	-	-
1	»	0	1:25	0	1:100	-	-
1	»	1:50	1:50	1:200	1:100	-	-
1	»	1:25	1:25	1:600	1:200	O19	O19
1	»	1:25	1:25	1:400	1:200	-	-
1	»	0	1:25	1:400	1:100	O26	O26

Обозначения: АГЛ-агглютинины, АГ-антиколигемолизин.

Динамика накопления антиколигемолизина и О-агглютининов в зависимости от возраста у 18 детей с иммунологическими сдвигами представлена в таблице 2.

Как демонстрируют данные таблицы 2, повышение титра антиколигемолизина наблюдали у 17 детей, агглютининов - у 13, а одновременное нарастание антиколигемолизина и О-агглютининов при исследовании парных сывороток - у 12 детей.

Титр антиколигемолизина колебался от 1:25 до 1:200. У 4 детей отмечали нарастание антиколигемолизина в динамике при отсутствии агглютининов к аутоштаммам кишечной палочки. Обычно титры антиколигемолизина были ниже титров О-агглютининов. Наиболее высокие титры антиколигемолизина и О-агглютининов отмечались у детей 9 месяцев и старше.

Из 13 аутокультур кишечной палочки, к которым отмечено нарастание титра агглютининов, при определении принадлежности к 250-группам (О1-

O25) и серотипам O26, O44, O55, O86, O111, O112, O119, O125, O126, O128 удалось идентифицировать только 5 культур.

Остальные оказались серологически различными и, по-видимому, принадлежат к другим из 150 известных в настоящее время O - групп кишечной палочки.

Повышение титра антиколигемолизина и агглютининов в крови выздоравливающих детей, страдавших острыми кишечными расстройствами, свидетельствует о том, что кишечные палочки любого серологического типа способны стимулировать выработку антигемолизина как к патогенным, так и к нормальным кишечным палочкам.

Агглютинины же образуются к серологическому типу собственного возбудителя.

Из полученных данных видно, что иммунологические сдвиги у детей обнаруживались в виде образования антиколигемолизина и реже агглютининов. Часто наблюдались совпадения обоих показателей (у 12 из 18 детей с иммунологическими реакциями в отношении кишечной палочки).

При нарастании антиколигемолизина в крови обычно увеличивался титр агглютининов, но иногда увеличение титра антиколигемолизина наблюдали при отсутствии агглютининов.

Изложенное выше позволяет считать реакцию нейтрализации гемолизина достаточно специфичной для выявления иммунологических ответов организма ребенка в отношении кишечной палочки.

В связи с видоспецифичностью колигемолизина эта реакция практически более удобна и характеризуется более широким охватом, чем определение агглютининов, обладающих типоспецифичностью.

Таким образом, реакцию нейтрализации гемолизина следует рекомендовать для внедрения в практику в целях доказательства этиологической роли кишечной палочки.

Еще более убедительные результаты могут быть получены при изучении иммунных сдвигов в отношении обоих антигенов путем

одновременной постановки реакции нейтрализации гемолизина и реакции агглютинации.

5.2. О диагностическом значении пробы на С-реактивный белок при стафилококковом сепсисе

Стафилококковая инфекция – это совокупность ряда заболеваний, активизирующихся за счет инфицирования бактериями *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* и тому подобными бактериальными структурами одного рода. Данные микроорганизмы представляют собой грамположительные кокки, которые чаще всего располагаются в виде виноградных гроздей.

Стафилококки широко распространены в окружающей среде и оказывают влияние на организм человека посредством продукции стафилококкового токсина.

Золотистый стафилококк на коже, во рту и слизистых оболочках человека (в горле и в носу) – это серьезная проблема, так как он может находиться в организме человека, не вызывая при этом патологий, но при снижении иммунитета или нарушении барьерных функций он становится причиной различных заболеваний.

Факторы, способствующие развитию инфекции: травмы кожи, хирургические вмешательства, иммунодефицитные состояния и наличие хронических заболеваний. Учитывая широкий спектр заболеваний, вызываемых *staphylococcus*, необходимо своевременно сдавать анализы на стафилококк, проводить диагностику и начинать лечение для предотвращения серьезных осложнений.

Различные виды стафилококков отличаются по своей вирулентности, что обуславливает разный уровень угрозы для здоровья. Например, *S. aureus* может вызывать как локальные инфекции, так и системные осложнения, включая сепсис, в то время как *S. epidermidis* в основном ассоциируется с устройствами, установленными в организме человека (имплантатами и т.п.), и

инфекциями, связанными с ними. Понимание этих особенностей помогает разрабатывать эффективные стратегии профилактики и лечения.

Из стафилококковых заболеваний новорожденных наибольшую опасность представляет стафилококковый сепсис. Несмотря на внедрение новых методов лечения, прежде всего антибиотикотерапии, летальность при сепсисе продолжает оставаться значительной. В то же время увеличилось число форм средней тяжести и легких форм этого заболевания. Дифференциальный диагноз сепсиса в ряде случаев представляет значительные трудности, так как даже при тяжелом сепсисе выделить возбудителя из крови не всегда удается вследствие кратковременного характера бактериемии, затруднителен забор достаточного количества крови у новорожденных и, наконец, под влиянием энергично проводимого лечения антибиотиками изменяется клиническая картина заболевания. Все это указывает на необходимость применения новых критериев для усовершенствования диагностики и объективной оценки течения и прогноза заболевания.

Основные методы диагностики стафилококков следующие:

- Бактериологический посев на стафилококк – биоматериал (кровь, моча, мазок со слизистой и т. д.) засевают на питательные среды, что позволяет выделить возбудителя, оценить его количество и определить его антибиотикочувствительность.

- Микроскопия – стафилококк в мазке. Его выявление с окраской по Граму.

- Серологические методы – определение антител к стафилококковым антигенам. Используются тест на антистрептолизин-О (АСЛ-О) и анализ на антигиалуронидазу.

- Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – выявление ДНК стафилококка в биоматериале с высокой точностью.

- Общий анализ крови – лейкоцитоз, ускоренная СОЭ, нейтрофилёз, лимфопения могут указывать на активный воспалительный процесс.

Биохимический анализ крови – для оценки состояния внутренних органов, особенно при системных инфекциях (сепсис), а также СРБ (анализ на С-реактивный белок) и другие маркеры острого воспаления.

В настоящее время наряду с другими лабораторными методами исследования больных значительное внимание уделяется определению С-реактивного белка, появление которого в крови свидетельствует о наличии острофазового процесса. Многие авторы определяли С-реактивный белок при ревматизме, гепатите, туберкулезе легких и пневмонии.

Многие авторы применяли в педиатрической практике пробы на С-реактивный белок и получали положительные результаты у детей, больных ревматизмом, пневмонией, гепатитом и сепсисом.

Целью настоящего исследования явилось выяснение возможности применения реакции на С-реактивный белок с целью лабораторно-клинической характеристики стафилококкового сепсиса у детей раннего возраста.

Существует ряд методик постановки пробы на С-реактивный белок.

Мы использовали реакцию преципитации в капиллярах. Эта методика основана, как известно, на принципе осаждения С-реактивного белка из сыворотки больных под воздействием специфической иммунной сыворотки.

Определение С-реактивного белка проведено нами в динамике у 47 больных, находившихся в септическом отделении детской больницы. Всего поставлено 130 реакций. Из числа обследованных детей диагноз сепсиса был установлен у 36, пограничные формы заболевания наблюдались у 11 детей. Среди больных сепсисом 9 были в возрасте до 15 дней, 13 - в возрасте 8-30 дней, 11 ребенка - 1-3 месяцев и 2 ребенка - 3-7 месяцев. Среди 11 обследованных детей с пограничными формами заболеваний 2 были в возрасте до 15 дней, 4 детей - от 16 до 30 дней и 4 детей старше месяца. При поступлении состояние средней тяжести отмечалось лишь у 1 детей, у остальных заболевание расценивалось как тяжелое и крайне тяжелое.

Пробы на С-реактивный белок ставили систематически в сочетании с одновременно проводимым клиническим и бактериологическим исследованием.

На основании клинических данных и динамики септического процесса больных условно разделили на несколько групп: с крайне тяжелым течением было 6 больных, с тяжелым - 9, течением средней тяжести - 13 и легким - 7 больных. В клинической картине сепсиса у детей 1-го месяца жизни были отчетливо выражены явления интоксикации, отмечалась серая или желтушная окраска кожных покровов, вялость, раздражительность. У всех детей отмечались срыгивания и рвота, учащенный жидкий стул. Степень интоксикации зависела от величины и количества гнойных очагов и была особенно выражена при обширных некротических флегмонах, остеомиелитах и осложнениях со стороны внутренних органов. Диагноз сепсиса устанавливали на основании тщательного анализа анамнестических данных, характера и динамики клинических симптомов и лабораторных исследований.

Бактериологический диагноз подтвержден лишь у 6 больных - при посеве крови удалось выделить патогенный стафилококк. У остальных больных патогенный стафилококк выделяли при посевах материала из гнойных очагов. Детальному изучению подвергли 17 штаммов стафилококков. Из них 16 штамма оказались коагулазоположительными, 16 сбрасывали маннит. Токсигенных штаммов было 16 (93 %). 15 штамма образовывали золотистый пигмент, остальные 2 штаммов, относившихся к коагулазоположительным, - белый пигмент.

Сравнительные данные о характере реакции на С-реактивный белок и тяжести течения заболевания представлены в табл. 1. Оказалось, что при тяжелом и крайне тяжелом течении сепсиса у большинства больных реакция была резко положительной (++++ и выше), отрицательных реакций не было.

Наиболее интенсивная реакция наблюдалась у больных с крайне тяжелым течением сепсиса. В группе с течением средней тяжести реакция

была менее интенсивной: резко выраженных реакций (++++ и более) не наблюдалось; у 30 % больных реакция была слабо положительной и у 1 - отрицательной. В группе больных с легким течением отмечалось дальнейшее снижение интенсивности реакции. При местных процессах лишь у 1 больного из 11 реакция оказалась резко положительной, у 4 она была слабо положительной и у 3 - отрицательной.

Интенсивность реакции коррелировала также с особенностями гнойных очагов. Переход положительной реакции в отрицательную наблюдался у 31 больных, на них у 25 этот переход совпадал с ликвидацией гнойных очагов, у 5 - со значительным регрессивным развитием процесса и лишь у 2 больных заметных изменений в динамике очагов не обнаруживалось. Приведенные данные свидетельствуют о прямой зависимости между снижением интенсивности реакции на С-реактивный белок и обратным развитием гнойных очагов.

Представляло интерес выяснить, как отражались изменения в состоянии больного на характере реакции. Снижение интенсивности реакции наблюдалось у 46 больных, из них до улучшения состояния у 9 (20%) и одновременно с улучшением состояния - у 37 (80%).

Мы проследили также зависимость между динамикой исчезновения С-реактивного белка и отдельными клиническими показателями. Под клиническим выздоровлением мы понимали ликвидацию гнойных процессов, удовлетворительное общее состояние и самочувствие ребенка, отчетливое нарастание кривой веса, исчезновение всех симптомов интоксикации. Исчезновение С-реактивного белка установлено у 31 больных, из них до клинического выздоровления у 14 (44%) и параллельно с клиническим выздоровлением у 17 (56%). У ряда больных, у которых началось клиническое выздоровление, а проба на С-реактивный белок оставалась еще положительной, вновь наступало ухудшение, появлялись новые гнойные очаги.

У больного ребенка с диагнозом кожного сепсиса реакция на С-реактивный белок была четкая (+++). Через месяц после лечения состояние было удовлетворительное. Кожа чистая, в весе прибавляет, гемограмма в пределах нормы, реакция на С-реактивный белок слабая (+). Через месяц началось обострение процесса, состояние ухудшилось, появились новые элементы везикуло-пустулеза, молочницы. После комплексной терапии через 2 недели состояние у этого больного ребенка удовлетворительное, течение заболевания без обострений. Проба на С-реактивный белок отрицательна.

Приведенные данные свидетельствуют о возможности использования пробы на С-реактивный белок с прогностической целью и для более точной оценки динамики процесса.

При постановке пробы в динамике в подавляющем большинстве случаев отмечалось последовательное и неуклонное снижение интенсивности реакции, наступавшее параллельно улучшению состояния больного. Однако в 4 из 34 случаев после снижения интенсивности реакции на С-реактивный белок или даже полного его исчезновения последний вновь появлялся или количественно возрастал. Во всех подобных случаях нарастание С-реактивного белка сопровождалось ухудшением состояния, формированием новых гнойных очагов, присоединением пневмонии или пиурии. По мере улучшения состояния и обратного развития очагов количество С-реактивного белка вновь снижалось вплоть до полного исчезновения.

При изучении гемограмм в динамике септического процесса получены нечеткие и разноречивые результаты как в остром периоде, так и в периоде улучшения и при выздоровлении. Поэтому мы сопоставили данные гемограмм (содержание лейкоцитов, нейтрофилов и РОЭ) с уровнем С-реактивного белка в различные периоды болезни. Содержание С-реактивного белка в различные периоды заболевания более объективно отражало динамику процесса. Так, в остром периоде реакция на С-реактивный белок была положительной в 97 %, в период улучшения - лишь в 55 %. При этом в динамике заболевания закономерно отмечалось снижение

интенсивности реакции на С-реактивный белок, а при выздоровлении реакция во всех случаях была отрицательной.

Как указывалась выше, в связи с изменением течения стафилококкового сепсиса у детей раннего возраста возникли значительные трудности при его дифференциальной диагностике. Клинический синдром сепсиса и данные гемограмм далеко не всегда позволяют установить диагноз и разграничить септический и локальные процессы. Бактериологическое исследование лишь в небольшом проценте случаев позволяет подтвердить клинический диагноз.

Реакция на С-реактивный белок не может быть положена в основу дифференциальной диагностики сепсиса, так как при местных процессах у детей раннего возраста она в некоторых случаях также бывает положительной. Однако она может применяться как вспомогательная наряду с другими методами. Определение С-реактивного белка в динамике способствует объективной оценке течения процесса и выявлению скрытых очагов инфекции. Реакция эта может иметь также прогностическое значение, так как снижение уровня С-реактивного белка нередко отмечается еще до улучшения состояния больного и, наоборот, если при клиническом выздоровлении С-реактивный белок продолжает определяться, следует ожидать обострения процесса.

В случаях с летальным исходом содержание С-реактивного белка сохраняется на высоком уровне как при поступлении больных, так и непосредственно перед их смертью. Нам удалось установить, что С-реактивный белок образуется при септических заболеваниях у детей первых дней жизни. При этом интенсивность реакции зависит от характера гнойных очагов и тяжести процесса. При обширных гнойных очагах реакция может достигать высокой интенсивности, хотя, как правило, у маленьких детей она выражена слабее, чем у больных более старшего возраста с аналогичным процессом.

Выводы: Определение С-реактивного белка в динамике заболевания способствует объективной оценке течения процесса и выявлению скрытых очагов инфекции.

Интенсивность реакции зависит от характера гнойных очагов и тяжести заболевания. Проба на С-реактивный белок при стафилококковом сепсисе у детей имеет также прогностическое значение.

ГЛАВА-VI. АНТИТОКСИЧЕСКИЙ И ФАГОЦИТАРНЫЙ ИММУНИТЕТ ПРИ СТАФИЛОКОККОВЫХ ИНФЕКЦИЙ

6.1. Применение реакции непрямой гемагглютинации для определения антител к стафилококковому токсину

В последние годы в теоретической и прикладной иммунологии все большее применение находит реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации, которая по чувствительности значительно превосходит другие серологические методы выявления антител и все шире применяется при изучении различных инфекций.

Мы попытались использовать реакцию непрямой гемагглютинации для обнаружения антител к стафилококковому токсину. Применяемый в настоящее время гемолитический метод позволяет выявлять антитела (антитоксины) лишь к токсическому компоненту стафилококкового токсина - в основном к α -токсину.

В основу реакции положен метод непрямой гемагглютинации. В то же время разнообразие физико-химических свойств различных антигенов обуславливает значительную сложность сенсibilизации эритроцитов антигенами и это приводит к отсутствию единой стандартной методики. Поэтому для каждого антигена экспериментальным путем приходится устанавливать оптимальные условия для адсорбции. Изложенное и побудило

нас более подробно остановиться на методических вопросах применения указанной реакции для определения антител к стафилококковому токсину.

Первоначально мы попытались применить в реакции непрямой гемагглютинации нативные эритроциты барана, которые, однако, лизировались при сенсibilизации их различными разведениями нативного стафилококкового токсина. Поэтому нативные бараньи эритроциты оказались непригодными для работы с нативным токсином. Изложенное побудило нас попытаться применить формализированные бараньи эритроциты. Согласно данным литературы, применение формализированных эритроцитов позволяет избежать лизиса как в процессе танирования, так и при дальнейшем хранении, предотвращает их спонтанную агглютинацию, позволяет получать стойкий препарат сенсibilизированных антигеном эритроцитов.

Формализированные бараньи эритроциты хранили в виде 50 % взвеси в физиологическом растворе, а перед постановкой опыта 3-кратно отмывали нейтральным физиологическим раствором и готовили 2,5 % взвесь на буферном солевом растворе pH 7,2. Равные количества полученной взвеси формализированных эритроцитов и таниновой кислоты в разведении 1:20000 смешивали и инкубировали при 37⁰ в течение 20 мин. После 3-кратного отмывания буферным солевым раствором с pH 7,2 эритроциты ресуспендировали до первоначального объема.

Для выбора оптимальной дозы нативного токсина, которая обеспечивала бы хорошую сенсibilизацию эритроцитов, провели титрование токсина со стандартной противостафилококковой сывороткой. Оптимальными разведениями токсина оказались 1:40-1:160 (активность токсина Lh 0,15 мл). Учитывая возможность групповых реакций, из всех оптимальных концентраций антигена в реакции непрямой гемагглютинации предпочтительно пользоваться наименьшей. Поэтому в основной части работы для сенсibilизации эритроцитов нативный стафилококковый токсин

применяли в разведении 1:160, что соответствовало концентрации 70 мкг на 1 мл белка.

Как показали проведенные испытания, наилучшие условия для сенсibilизации эритроцитов создаются при следующем режиме: равные объемы танализованных эритроцитов и нативного токсина в разведении 1:160 (токсин разводили на буферном солевом растворе с рН 6,4) смешивали и выдерживали при 37⁰ в течение 2-3 часов и затем в рефрижераторе при 4⁰ в течение 18-20 часов. За 2-3 часа до окончания сенсibilизации для предотвращения элюции антигена с эритроцитов добавляли формалин из расчета 1-2 % общего объема. После окончания сенсibilизации эритроциты 3-кратно отмывали буферным солевым раствором с рН 7,2 с 1 % раствором формалина, ресуспендировали в таком же растворе в первоначальном объеме.

Проведенные испытания полученных сенсibilизированных эритроцитов показали, что при хранении в течение 3 месяцев и более в рефрижераторе при 4⁰ С диагностикумы почти не утрачивали активности. Так, если после приготовления сенсibilизированные токсином эритроциты реагировали с антитоксической сывороткой активностью 80 АЕ до титра 1: 819 200, то через 3 месяца хранения они реагировали с той же сывороткой, разведенной до 1:409 600. Эти материалы свидетельствовали, что нам удалось добиться прочной сорбции компонентов стафилакоккового токсина на танализованных эритроцитах и оптимальных условий для их сохранения.

Реакцию ставили в полистироловых пластинках. К 0,5 мл соответствовавшего разведения сыворотки (предварительно прогретой при 56⁰ С в течение 30 минут и адсорбированной бараньими эритроцитами) добавляли каплю 2,5 % взвеси сенсibilизированных токсином эритроцитов. Содержимое пластинок тщательно перемешивали и оставляли при комнатной температуре. Реакцию учитывали через 3-4 и окончательно через 18-20 часов по четырехбалльной системе. За титр исследуемой сыворотки принимали

наивысшее разведение, обеспечивавшее четкую положительную реакцию (++) при отрицательной реакции в контрольных лунках.

В каждом опыте контролировали испытуемые сыворотки в низшем разведении с контрольными эритроцитами (без антигена) на отсутствие антител к бараньим эритроцитам.

Опытный и контрольный диагностикумы проверяли на отсутствие спонтанной агглютинации в растворителе, применявшемся в данной реакции. Изложенная методика позволила получить стойкий эритроцитарный диагностикум для определения антител к стафилококковому токсину.

Далее мы попытались выяснить ряд методических вопросов, связанных с применением реакции непрямой гемагглютинации при изучении стафилококковых инфекций, на модели стафилококковый токсин (анатоксин) - антитоксин.

Представлялось важным выяснить, насколько пригодны различные серии стафилококкового токсина для сенсibilизации эритроцитов. Проведенные испытания 5 серий, показали, что все препараты обладали хорошей сенсibilизирующей активностью, а полученные диагностикумы - высокой активностью при стандартизации с противостафилококковой сывороткой активностью 80 АЕ (табл. 1).

Полученные материалы свидетельствовали о высокой чувствительности реакции непрямой гемагглютинации для обнаружения антител к компонентам стафилококкового токсина.

Таблица 3.

**Сравнительное изучение сенсibilизирующей активности
различных серий стафилококковых токсинов
и анатоксинов**

№ серии препарата	Максимальные титры противостафилококковой сыворотки
-------------------	---

Токсины	462	1:320 000-1:640 000
	487	1:160 000-1:320 000
	427	1:160 000-1:320 000
	505	1:640 000-1:1 280 000
	507	1:320 000-1:1 280 000
Анатоксины	64-1	1:3 200
	65-2	1:6 400
	61-1	1:800
	62-1	1:200
	63-2	1:100

Далее мы попытались применить для сенсibilизации эритроцитов препараты стафилококкового анатоксина (разные серии) и сравнить сенсibilизирующую активность токсина. Полученные материалы свидетельствовали, что препараты стафилококкового анатоксина оказывали неодинаковое и значительно более слабое сенсibilизирующее действие при взаимодействии с танализованными эритроцитами, чем препараты токсина. В то время как одни серии (65-2, 64-1) оказывали определенное сенсibilизирующее действие на танализованные эритроциты и такие диагностикумы реагировали с противостафилококковой сывороткой в разведениях 1:3200 и 1:6400, другие серии анатоксина (62-1, 63-2) практически вообще были неспособны сенсibilизировать танализованные эритроциты.

С целью подтверждения высокой специфичности и чувствительности реакции непрямой гемагглютинации мы применили реакцию ее торможения. Проведенные исследования показали, что предварительное добавление к разведениям противостафилококковой сыворотки нативного токсина приводило к нейтрализации соответствующих антител и значительному снижению титра антисыворотки в реакции непрямой гемагглютинации.

Таким образом, результаты реакции торможения непрямой гемагглютинации подтвердили специфичность результатов, полученных в реакции непрямой гемагглютинации.

Особого внимания, как нам кажется, заслуживал вопрос о том, какими именно антигенными компонентами стафилококкового токсина обусловлена положительная реакция, зависит ли она от термолабильных (являющихся в основном собственно экзотоксинами) компонентов токсина или термостабильных, накопление которых происходит за счет лизиса бактериальных клеток и обусловлено в основном содержащимися в токсине растворимыми антигенами микробной клетки.

Для ответа на эти вопросы мы получили препараты стафилококкового токсина, прогретые при 56 и 60⁰ С в течение 30 минут и при 100⁰ С в течение 20 мин. Этими прогретыми токсинами сенсibilизировали эритроциты и сравнивали активность полученных диагностикумов с активностью эритроцитов, сенсibilизированных нативным токсином.

Результаты проведенных испытаний (табл. 2) показали, что прогревание токсинов практически не влияло на их сенсibilизирующую активность по отношению к эритроцитам: танализированные эритроциты, сенсibilизированные токсинами прогретыми 56, 60 и 100⁰ С, проявляли примерно одинаковую активность и реагировали с противостафилококковой сывороткой почти в таких же разведениях, как и танализированные эритроциты, сенсibilизированные нативным стафилококковым токсином.

Изложенное позволило высказать предположение, что в реакции непрямой гемагглютинации выявляются не токсические (возможно, не столько токсические) компоненты стафилококкового токсина, которые очень чувствительны к нагреванию, а какие-то антигенные компоненты токсина, устойчивые к действию температурного фактора.

Реакция непрямой гемагглютинации с нативным и гретыми стафилококковыми токсинами

Токсин, использованный для сенсibilизации	Максимальный титр противостафилококковой сыворотки
Нативный.....	1:640 000
Прогретый при 60 ⁰ С 30 мин.....	1:640 000
Прогретый при 60 ⁰ С 30 мин.....	1:320 000
Кипяченый при 100 ⁰ С 20 мин...	1:320 000

По-видимому, в серологических реакциях, в частности в реакции гемагглютинации, выявляются антигенные свойства токсина и микробной клетки, а не токсические компоненты стафилококкового токсина.

С целью подтверждения высказанного предположения и доказательства специфичности полученных данных мы применили реакцию торможения непряой гемагглютинации. К последовательным разведениям противостафилококковой сыворотки (0,25 мл) добавляли в первом случае равные количества различных разведений нативного токсина, во втором - равные количества токсина, прогретого при 60⁰ С в течение 30 мин. После соответствующей экспозиции (час при 37⁰ и час при комнатной температуре) в качестве тест-системы применяли эритроциты, сенсibilизированные как нативным, так и прогретым при 60⁰ С токсинами. Результаты перекрестных контрольных опытов показали, что добавление для нейтрализации антител противостафилококковой сыротки токсинов как нативного, так и гретого оказывало вообще одинаковый эффект торможения независимо от того, каким токсином сенсibilизированы эритроциты тест-системы.

Полученные материалы свидетельствовали об однозначных результатах реакции с эритроцитами, сенсibilизированными как нативным токсином, так и гретым, подтверждали ранее полученные данные о том, что в реакции непрямо́й гемагглютинации проявляются в основном термостабильные антигенные компоненты стафилококкового токсина и выявляются соответствующие им антитела в антисыворотках.

В то же время проведенное изучение гемолитических свойств нативного и гретых токсинов (гемолитическим методом) показало, что прогревание токсинов приводило почти к полной потере гемолитических свойств токсинов.

Эти материалы подтверждали данные литературы, согласно которым при нагревании происходит практически почти полное разрушение наиболее устойчивой гемолитической функции стафилококкового токсина и полное разрушение его дермонекротической и летальной функции.

Следовательно, прогревание токсинов приводит к потере токсических свойств, но почти не влияет на антигенные компоненты стафилококкового токсина, которые проявляются в реакции непрямо́й гемагглютинации. Вероятно, при сенсibilизации танализированных эритроцитов как нативным, так и гретыми токсинами эритроцитами сорбируются только эти термостабильные компоненты, держащиеся в токсине, и выявляются в противостафилококковой сыворотке соответствующие антитела. Именно этим, по-видимому, и выясняется примерно одинаковая активность при тестировании с противостафилококковой сывороткой эритроцитов, сенсibilизированных как нативным, так и гретыми токсинами.

В результате исследований определены оптимальные условия сенсibilизации формализированных бараньих эритроцитов нативным стафилококковым токсином и получен стойкий эритроцитарный стафилококковый диагностикум.

Различные серии стафилококкового токсина обладали высокой и примерно одинаковой сенсibilизирующей активностью, в то время как

различные серии анатоксина обладают неодинаковой и значительно более слабой сенсibiliзирующей активностью.

Прогревание токсинов не снижало их сенсibiliзирующей активности. При помощи реакции торможения установлено, что в реакции непрямой гемагглютинации выявляются в основном антитела к термостабильным антигенным компонентам стафилококкового токсина.

6.2. Защитное действие стафилококкового анатоксина при заражении животных разными штаммами стафилококка

В связи с несомненной иммунологической активностью стафилококкового анатоксина его стали применять на практике для профилактической вакцинации людей. Однако эффективность препарата подвержена колебаниям. Поскольку анатоксин создает не только антитоксический, но и антимикробный иммунитет, естественно предположить, что одной из причин различий в иммунологическом эффекте могут быть разные свойства стафилококковых штаммов, являющихся возбудителями инфекции. В ряде экспериментальных работ показано, что уровень иммунитета в отношении разных штаммов различен, однако данные эти получены на небольшом материале и не позволяют установить какие-либо закономерности.

Мы поставили задачей изучить уровень противостафилококкового иммунитета в отношении большого числа штаммов и сопоставить полученные результаты с некоторыми свойствами исследованных культур. Работа с одними и теми же штаммами проводилась параллельно на 2 экспериментальных моделях: мышах и кроликах (шиншиллы). В опыте на мышах мы изучили 31 штаммов, на кроликах - 26 штамма.

Иммунизировали животных очищенным сорбированным на $Al(OH)_3$ стафилококковым анатоксином двукратно: мышей с 14-дневным интервалом, кроликов - с месячным. Мышам вводили в 1 прием по I ЕС, кроликам - по 10

ЕС анатоксина. Животных заражали через 8 дней после второй иммунизации. К моменту заражения вес мышей достигал 18-22 г, кроликов - 3-4 кг. Параллельно с иммунными микробную культуру вводили контрольным животным того же веса.

Мышам инъецировали внутривенно 0,2 мл отмытой суточной агаровой культуры испытуемых штаммов в дозе $10^{9,5}$ живых микробных клеток. Каждым штаммом заражали 8 иммунизированных и 8 контрольных животных. Уровень анитоксина перед заражением у иммунных мышей колебался от 1,5 до 5 АЕ/мл, у контрольных животных анитоксин в крови не было. Опыт ставили более чем на 100 мышах. Определяли время гибели животных и градируемый показатель эффекта ($1/T$). Для получения статистически значимых данных результаты опытов подвергли дисперсионному анализу. Анализ показал (табл. 1) что достоверные различия в эффекте имелись у иммунизированных и контрольных мышей (F_A) и у мышей, зараженных разными штаммами (F_B). Высокая статистическая значимость величины (F_{AB}) с достоверностью указывала на то, что эффективность иммунизации в отношении разных штаммов стафилококка была различной. Для выявления уровня иммунитета мышей против каждого штамма предварительно определяем индексы вирулентности этого штамма для контрольных (V_C) и иммунных (V_I) животных. Индекс вирулентности штамма равнялся произведению среднего градируемого показателя эффекта в группе зараженных мышей (M) на пробит их летальности ($Pч$). Чтобы с достаточной достоверностью говорить о наличии или отсутствии защитного эффекта в отношении определенного стафилококкового штамма, мы исключили из дальнейших расчетов невирулентные и маловирулентные культуры и определяли уровень иммунитета только против штаммов, индекс вирулентности которых для контрольных мышей был выше 2,275. Таких штаммов насчитывалось 21.

Уровень иммунитета у мышей против того или иного штамма стафилококка мы характеризовали иммунологическим индексом (I). Для

вычисления I и его стандартной ошибки (m_I) мы предложили формулы, являющиеся модификацией формул Finney применяемых для определения относительной эффективности биологически активных препаратов.

Из 21 штаммов иммунитет отсутствовал только в отношении 8, а в отношении 17 штаммов обнаружен высокий и очень высокий уровень иммунитета.

Таким образом, несмотря на довольно однородные величины антитоксических титров у иммунизированных мышей, их устойчивость к разным штаммам стафилококка резко различалась.

Иммунных (26) и контрольных (26) кроликов заражали внутрикожно 6 последовательными дозами (с интервалом 0,5 в логарифмических единицах) каждого штамма в объеме 0,1 мл. В подавляющем большинстве случаев кроликам вводили $10^{6,5}$ - 10^9 или 10^7 - $10^{9,5}$ живых микробных клеток. На каждом кролике испытывали 2 штамма. Перед заражением у иммунных животных количество антитоксина в крови колебалось от 2 до 35 АЕ/мл (у большинства от 5 до 15 АЕ/мл), у контрольных оно равнялось 0,125 АЕ/мл и менее. Наблюдение над зараженными кроликами продолжалось 4 дня, при этом мы регистрировали минимальную дермонекротическую дозу (Dnm) культуры и общую площадь некрозов (S). Для определения иммунологического индекса в отношении того или иного штамма мы предложили следующую формулу, в которой были учтены различия в названных показателях у иммунного (Dnm_I , S_I) и контрольного (Dnm_c , S_c) кролика:

$$I = \frac{\lg Dnm_I - \lg Dnm_c + (\lg S_c - S_I)}{2}$$

Стандартное отклонение I , которое мы определили в специальном опыте, равнялось 0,48.

Учитывая тот факт, что I для каждого штамма мы определяли только на 2 кроликах (иммунный и контрольный), статистически значимыми можно было считать значения I , равные или большие $0,48 \times 12,7 = 6,1$ (12,7-

величина t для уровня значимости 0,05 и 1-й степени свободы). Однако такие значения I вообще невозможно было получить в наших опытах (максимальное I равнялось 2,38). Отсюда следует, что при строгом подходе все наши данные, полученные в опыте на кроликах, нельзя было признать статистически значимыми. Однако, исходя из практических соображений, мы подвергли их дальнейшему анализу.

Иммунологические индексы были вычислены для 22 штаммов. В отношении 13 штаммов индексы оказались отрицательными, что свидетельствовало не только об отсутствии иммунитета, но даже, возможно, о более высокой восприимчивости к этим штаммам иммунных кроликов по сравнению с контрольными. Следует отметить, что мыши оказались значительно более удобной моделью для изучения затронутого вопроса, чем кролики.

Мы сопоставили иммунологические индексы в отношении изученных штаммов с такими их признаками, как принадлежность к той или иной фагогруппе или фаготипу, вирулентность для контрольных животных, авидность продуцируемого ими a -токсина по отношению к антитоксической сыворотке. Изучить авидность a -токсина нас побудило то обстоятельство, что нередко токсины, продуцируемые разными штаммами, но имеющие одинаковый гемолитический титр (Dhm), заметно различались по антитоксинсвязывающей способности (Lh). В качестве показателя авидности (A) мы использовали произведение (Lh), подтитрованной к 0,1 АЕ, и Dhm :

$$A=Lh \times Dhm$$

Можно было предположить, что чем выше авидность токсина, тем ниже будет иммунологический индекс в отношении соответствующего штамма. С целью проверки этого предположения и были поставлены названные показатели. Кроме того, мы сравнивали иммунологические индексы, полученные для одних и тех же штаммов на мышах и кроликах, а последние сопоставляли с титром антитоксина у кроликов перед заражением.

Таблица 5.

Дисперсионный анализ результатов заражения стафилококковой культурой иммунных и контрольных мышей

Фактор	Дисперсия или сумма квадратов (C)	Число степеней свободы (n)	Девиата или варианса (Q ²)	Отношение девиат (F)	Уровень значимости (P)
Иммунизация (А)	101,25	1	101,25	427,64	0,001
Штаммы (Б)	135,32	126	1,074	4,53	0,001
Сочетания (АБ)	134,85	126	1,070	4,51	0,001
Суммарно-организованные факторы (х)	371,42	253	1,468	6,19	<0,001
Неорганизованные факторы (ошибка); (z)	421,39	1778	0,237	-	-
В целом (у)	792,81	2031	-	-	-

Распределение штаммов по иммунологическим индексам в зависимости от их принадлежности к той или иной фагогруппе или фаготипу мы изучали с помощью критерия χ^2 . Результаты, полученные в опыте на мышах, показали, что среди штаммов фаготипа 20/21 преобладали культуры с высокими ($\chi^2 = 9,97$; $P < 0,01$), а среди штаммов фагогруппы III и I+III - культуры с низкими иммунологическими индексами, ($\chi^2 = 11,3$; $P < 0,01$).

Так из 17 вирулентных штаммов фаготипа 20/21 культур с высокими иммунологическими индексами было 10, а с низкими индексами - 3; из 13 вирулентных культур группы III и I+III штаммов с высокими индексами было только 3, а с низкими индексами 5.

В опытах на кроликах также обнаружено, что среди культур фаготипа 20/21 преобладали штаммы с высокими иммунологическими индексами ($\chi^2 = 8,71$; $P < 0,05$).

Таким образом, нам удалось экспериментально показать, что активная иммунизация стафилококковым анатоксином создает наиболее высокий

иммунитет в отношении штаммов фаготипа 20/21 и наиболее низкий в отношении штаммов группы III и I+III. Можно предположить, что этим объясняется эффективность профилактической иммунизации стафилококковым анатоксином беременных женщин, поскольку известно, что вспышки стафилококковой инфекции в родовспомогательных учреждениях чаще всего вызывают штаммы фаготипа 20/21.

Сопоставляя остальные признаки штаммов, мы пытались выявить наличие корреляции между ними. С этой целью составляли корреляционные таблицы по парным признакам и для обнаружения связи вычисляли полихорический показатель связи p (коэффициент корреляции для сгруппированных данных). Характер связи устанавливали, определяя корреляционное отношение U (криволинейная связь) и критерий криволинейности t_k (прямолинейная связь). Результаты приведены в таб. 6.

Таблица 6.

Определение зависимости между некоторыми стафилококковыми штаммами

	Полихорический показатель связи			Корреляционное отношение			Критерий криволинейности		Наличие связи	
	p	χ^2	P	$n \pm m$	t	P	$K \pm m_k$	t_k	Криволинейной	Правильной
Иммунологические индексы на мышцах-на кроликах	0,08	21,4	>0,05	-	-	-	-	-	нет	нет
Вирулентность для мышечных-иммунологические индексы на мышцах	0,29	97,7	<0,001	0,78±0,07	11,1	0,001	0,526±0,084	6,3	есть	нет
Вирулентность для кроликов-иммунологические индексы на	0,2	70,3	<0,001	0,66±0,08	8,25	0,001	0,401±0,084	4,8	есть	нет

кроликах										
Авидность токсина-иммунологические индексы на мышах	0,06	17,0	>0,05	-	-	-	-	-	нет	нет
Авидность токсина-иммунологические индексы на кроликах	0,04	11,5	>0,05	-	-	-	-	-	нет	нет
Титр антитокси на у кроликов-иммунологические индексы на кроликах	0,06	20,4	>0,05	-	-	-	-	-	нет	нет

Между иммунологическими индексами, полученными в опытах на мышах и кроликах, связи установить не удалось. На основании графического изображения взаимоотношений между ними отсутствие связи можно объяснить главным образом расхождением результатов у штаммов с высокими иммунологическими индексами: в опыте на мышах они продолжали нарастать, а в опыте на кроликах их увеличение прекратилось.

Между вирулентностью штаммов для мышей и кроликов и иммунологическими индексами обнаружена четкая криволинейная связь (отклонение от прямолинейной зависимости происходило за счет штаммов со средней вирулентностью).

Таким образом, обнаружено, что чем больше вирулентность штаммов для мышей и кроликов, тем выше иммунологические индексы у иммунных животных. По-видимому, это в значительной степени связано с наличием у иммунных животных антитоксина, так как вирулентность стафилококковых штаммов для животных в значительной степени определяется продукцией ими *a*-токсина.

Однако помимо взаимоотношений токсин-антитоксин, *in vivo* в иммунитете несомненную роль играют и другие факторы, что подтверждается резкими различиями в иммунологических индексах при сравнительно однородных титрах антитоксина в крови привитых мышей. Об этом же свидетельствует и отсутствие связи между avidностью токсинов и иммунологическими индексами соответствующих штаммов, также между уровнем антитоксина в крови у кроликов и иммунологическими индексами культур, введенных этим животным.

Иммунитет против различных штаммов патогенного кокка целесообразнее изучать на мышах, чем на кроликах, так как использование первых позволяет получать более четкие и достоверные результаты.

Обнаружена существенная зависимость между уровнем иммунитета и фаготипом штаммов: наиболее высоким был уровень иммунитета в отношении штаммов фаготипа 20/21, наиболее низким - в отношении культур фагогрупп III и I+III. Выявлена четкая криволинейная связь, приближающаяся по характеру к прямолинейной, между вирулентностью штаммов и уровнем иммунитета: чем вирулентнее штаммы, тем выше резистентность иммунных животных.

ГЛАВА-VII. СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ПРОФИЛАКТИКА СТАФИЛОКОККОВЫХ ИНФЕКЦИЙ

7.1. Специфическая профилактика стафилококковым анатоксином животных и людей

Экспериментальный материал последних лет свидетельствует о возможности иммунизации перорально живыми вакцинами против различных инфекций - дизентерии, сальмонеллеза, чумы, Ку-лихорадки, оспы, и др. Эффективной оказалась реиммунизация перорально

дифтерийным анатоксином. Однако попытка использовать для пероральной вакцинации гретую стафилококковую вакцину оказалась неудачной.

В настоящее время для профилактики и лечения стафилококковых инфекций успешно применяют стафилококковый анатоксин. В связи с этим мы поставили перед собой задачу изучить возможность использования стафилококкового анатоксина для пероральной иммунизации. В работе представлены результаты экспериментов на животных, а также данные, полученные при исследовании на добровольцах.

В опытах использовали кроликов весом 2,5-3,5 кг. Животные были разделены на 3 группы: кроликов 1-й группы иммунизировали только перорально, 2-й - комбинированным методом (первую иммунизацию проводили подкожно, вторую и третью - перорально), кролики 3-й группы служили контролем, их иммунизировали подкожно. Животным вводили анатоксин троекратно, с 7-дневными интервалами. Иммунизацию перорально проводили шприцем через тонкий резиновый катетер непосредственно в пищевод или распылением анатоксина во рту также из шприца с обрезанной и затупленной иглой.

Для иммунизации использовали стафилококковый нативный (5 ЕС/мл) или адсорбированный (10 ЕС/мл) анатоксин и стафилококковый очищенный концентрированный анатоксин, содержащий 40-50 ЕС/мл. Эффективность иммунизации изучали по накоплению в крови анти- α -токсина, титр которого определяли до и после иммунизации, а также по развитию внутрикожных очагов инфекции у животных после заражения различными штаммами стафилококка. Внутрикожное заражение кроликов проводили 2, 4 и 10 минимальными некротическими дозами (Dnm). Для этого суточную агаровую культуру стафилококка смывали физиологическим раствором и полученную взвесь доводили до необходимой концентрации по бактериальному стандарту.

Через 2, 4 и 6 месяцев животных ревакцинировали перорально или подкожно (контрольная группа) и проводили те же исследования.

В опыт брали животных, у которых до иммунизации в сыворотках не обнаруживали анти- α -токсин, ($<0,125$ АЕ/мл). При титровании сывороток и определении Dnm руководствовались существующими методическими указаниями.

Таблица 7.

Динамика титров анти- α -токсина в крови кроликов после иммунизации

Способ иммунизации	Иммунизирующий препарат	Общая доза препарата	Число кроликов	Средние титры антитоксина (в АЕ/мл) в разные сроки (по неделям)							
				1-я	2-я	3-я	4-я	5-я	6-я	7-я	8-я
Перорально в пищевод (трижды)	Очищенный концентрированный анатоксин	4,5	5	1,05	0,75	0,4	0,3	0,12	0,16	0,16	0,16
	Очищенный концентрированный анатоксин	13	5	3,13	3,12	1,28	1,31	-	-	-	0,45
	Адсорбированный анатоксин	4,5	5	0,65	0,35	0,3	0,3	-	-	-	0,18
Подкожно + перорально (дважды)	Адсорбированный анатоксин	4,5	5	1,5	0,88	0,75	0,65	-	-	-	0,31
	Очищенный концентрированный анатоксин	12	5	2,66	2,66	0,58	0,58	-	-	-	0,25
Подкожно (трижды)	Очищенный концентрированный анатоксин	4,5	5	8,66	2,75	1,5	0,75	0,44	0,5	0,37	0,37

	Очищенный концентрированный анатоксин	9	5	15,6	6,8	4,0	1,7	-	1,75	-	0,95
Перорально орошением полости рта (трижды)	Очищенный концентрированный анатоксин	9	5	0,3	0,35	0,37	0,3	-	0,2	-	0,3

В результате установлено, что стафилококковый анатоксин при введении перорально (в пищевод или орошением полости рта) проникал через слизистые оболочки и вызывал в организме соответствующую иммунологическую перестройку.

Определение среднеарифметических титров анти- α -токсина от 4-5 кроликов после иммунизации в динамике показало (табл. 7), что их повышение после пероральной иммунизации зависело от введенной дозы анатоксина. Так, при иммунизации перорально 4,5 мл (1+1,5+2) и 13 мл (3+5+5) очищенного концентрированного стафилококкового анатоксина титры после 3-й вакцинации у животных 2-й группы были примерно в 3 раза выше, чем у животных 1-й на протяжении всего срока наблюдения.

При сравнении средних титров анти- α -токсина в крови у животных после введения концентрированного очищенного анатоксина только перорально и комбинированным методом последний не имел преимущества, так как при иммунизации одними и теми же дозами анатоксина титры у животных были одного порядка. Комбинированная иммунизация кроликов адсорбированным анатоксином оказалась более эффективной, чем иммунизация только перорально: титры анти- α -токсина в сыворотках животных 1-й группы были почти в 2,5 раза выше, чем животных 2-й группы.

При введении концентрированного стафилококкового анатоксина путем орошения полости рта и носоглотки анатоксин также проникал в гемалимфатический ток, в результате чего наступала определенная иммунологическая перестройка. Правда, после троекратной иммунизации анатоксином (1+3+5 мл) у всех 5 кроликов наблюдалось незначительное увеличение титров - в среднем они составляли 0,3-0,35 АЕ/мл на протяжении 2 месяца наблюдения. Это, вероятно, связано с тем, что контакт введенного анатоксина со слизистыми оболочками полости рта и носоглотки был кратковременным, поэтому антиген всасывался в небольшом количестве.

Ревакцинацию животных проводили через 2, 4 и 6 месяцев после окончания цикла иммунизации. Для ревакцинации брали животных, ранее иммунизированных подкожно и перорально. При этом выявлено, что у одних и тех же животных наблюдались стабильно низкие титры после иммунизации или реиммунизации как перорально, так и подкожно, т. е. иммунизаторный ответ зависел не только от способа введения препарата и его дозы, но и от иммунологической реактивности организма. Ревакцинация животных стафилококковым анатоксином перорально и подкожно вызывала значительное повышение титра анти- α -токсина в сыворотках. Так, через 2 недели после ревакцинации 3 мл концентрированного стафилококкового анатоксина перорально титры антител повышались в 7-25 раз, а после подкожного введения - в 16-35. Более высокая концентрация антител в крови наблюдалась после ревакцинации в сентябре - октябре по сравнению с ревакцинацией в мае-июле. После ревакцинации 2 мл коммерческого нативного стафилококкового анатоксина перорально и подкожно титры анти- α -токсина в крови повысились в 1,1 и в 1,9 раза соответственно.

Как уже указывалось, некоторых животных через 2 недели после иммунизации или реиммунизации заражали внутрикожно в заранее выстриженный бок кроликов различными штаммами стафилококка. Для заражения были взяты 3 штамма *Staphylococcus aureus*.

Вид *S. aureus* включает 6 эковаров: А, В, С, D, Е и F. Основными хозяевами этих эковаров являются человек, свинья, домашняя птица, крупный рогатый скот, овцы, зайцы, собаки и голуби. При одинаково широком спектре энзимогенеза и токсиногенеза штамм стафилококка 0-15 был активным продуцентом альфа-токсина, V6 - лейкоцидина и штамм Л-17- бета токсина. Dnm штаммов составляла 200 млн. микробных клеток. Животным вводили внутрикожно 2, 4 и 10 Dnm.

Результаты опытов показали (табл. 8), что при заражении стафилококками у неиммунизированного здорового кролика образовывались обширные некрозы кожи, в последующие дни процесс некротизации тканей прогрессировал, и к 4-му дню образовывались глубокие сливные некрозы.

Результаты внутрикожного заражения штаммами стафилококка иммунных неиммунных кроликов

При внутрикожном введении этих штаммов иммунным кроликам наблюдался определенный защитный эффект у животных всех групп, причем защитная реакция не зависела от высоты титров анти- α -токсина в крови (табл. 2). У кроликов, иммунизированных перорально и заражённых затем штаммами стафилококка 0-15 и Л-17, на местах введения 2 и 4 Dnm появлялась лишь краснота или инфильтраты, которые к 4-м суткам, как правило, рассасывались. Только у 1 кролика, зараженного штаммом Л-17, наблюдался некроз, также ликвидировавшийся к 4-м суткам. Размеры этого некроза на коже составляли $\frac{1}{36}$ часть некроза в контроле.

Таблица 8.

Способ иммунизации	Анти-токсин в крови АЕ/мл	Штаммы	Развитие поражений после введения культуры в разных дозах (в Dnm)					
			2	Число животных	4	Число животных	10	Число животных
Неиммунные (контроль)	<0,125	О-15	прогрессирующий некроз	5	прогрессирующий некроз	5	прогрессирующий некроз	5
		Л-17	прогрессирующий некроз	5	прогрессирующий некроз	5	прогрессирующий некроз	5
		V6	прогрессирующий некроз	5	прогрессирующий некроз	5	прогрессирующий некроз	5
Подкожно + Перорально	2; 4; 2; 2	О-15	краснота	3	краснота	1	инфильтрат	1
			инфильтрат		2	некроз	2	
		Л-17	краснота	3	инфильтрат	3	инфильтрат	2
			некроз		1	некроз	1	
		V6	инфильтрат	3	инфильтрат	1	некроз	1
некроз		2	некроз	3				
Перорально	1; 1; 1; 6	О-15	краснота	2	краснота	1	инфильтрат	1
			инфильтрат	2	инфильтрат	3	некроз	3
		Л-17	краснота	1 83	инфильтрат	3	инфильтрат	1
			инфильтрат	3	некроз	1	некроз	3

но в пищевод			трат					
		V6	красно- та	1	инфиль- трат	2	прогрес- сирующий некроз	4
			инфиль- трат	2	некроз	2		
			некроз	1				
Перораль- но орошени- ем рта + Носоглот- ки	0,5; 0,25; 1; 1	O-15	красно- та	2	инфиль- трат	1	некроз	4
			инфиль- трат	1	некроз	3		
			некроз	1				
		Л-17	красно- та	3	инфиль- трат	2	инфиль- трат	1
			некроз	1	некроз	1	некроз	3
		V6	красно- та	2	инфиль- трат	1	некроз	4
			инфиль- трат	1	некроз	3		
			некроз	1				

При введении 10 Dnm (2 млрд. кокков) некрозы образовывались, но в отличие от контроля поражения подсыхали, рубцевались и переходили в инфильтраты; кроме того, первоначальная величина некрозов, как правило, была значительно меньше, чем, в контроле (см. табл. 8, 9).

Введение животным, иммунизированным а-анатоксином, лейкоцидин активного штамма V6 вызывало образование некрозов в ответ на введение всех доз, хотя некрозы в 175, 112, 58 раз были меньше, чем в контроле (см. табл. 9), и в противоположность последним не увеличивались, рубцевались, хотя осумкованные, флюктуирующие инфильтраты на 10 Dnm обнаруживались еще через 30 дней наблюдения. Таким образом, течение

очага инфекции, вызванного у иммунизированных α -анатоксином кроликов, было менее благоприятно при введении лейкоцидин-активного штамма.

Кролики, иммунизированные орошением полости рта и носоглотки, несмотря на очень низкое содержание анти- α -токсина в крови, также проявляли определенную устойчивость к внутрикожному заражению стафилококком. Инфильтраты и небольшие некрозы образовывались в ответ на введение 2, 4 и 10 Dnm всех штаммов, но исход очагов поражения был благоприятным: репаративный процесс на введение 2 Dnm заканчивался к 4-5-му, на 4 Dnm - к 14-му дню. При заражении 10 Dnm через 14 дней оставались инфильтраты у всех животных после введения штаммов 0-15 и V6 и у 1 кролика - после введения штамма Л-17.

Таблица 9.

Проявление внутрикожных очагов инфекции у кроликов после иммунизации

Способ иммунизации	Штамм стафилококка	Антитоксин в крови (в АЕ/мл)	Развитие поражений после введения культуры в разных дозах (в Dnm)		
			2	4	10
Неиммунные (контроль)	О-15	<0,125	225	300	450
	Л-17		110	216	450
	V6		175	225	500
Подкожно (контроль)	О-15	2; 4; 2; 2	0, 0, 0	0, 0, 0	1/75, 1/78, 1/38
	Л-17		0, 0, 0	0, 0, 0	0,0; 1/108
	V6		0, 0, 0	0; 1/56, 1/56	1/125, 1/125, 1/225
Перорально (в пищевод)	О-15	1; 1; 1; 6	0, 0, 0, 0	0, 0, 0, 0	0; 1/11, 1/18, 1/10
	Л-17		0, 0, 0, 0	0, 0, 0; 1/36	0; 1/225, 1/112, 1/10

	V6		0, 0, 0; 1/75	0, 0; 1/56, 1/112	1/25, 1/63, 1/25, 1/25
Перорально (орошением рта и носоглотки)	O-15	0,5; 1; 0,25; 1	0, 0, 0; 1/225	0; 1/85, 1/50, 1/85	1/55, 1/18, 1/25, 1/25
	L-17		0, 0, 0; 1/55	0, 0; 1/54	0; 1/10, 1/12, 1/18
	V6		0, 0, 0; 1/75	0; 1/500, 1/83, 1/100	1/12, 1/62, 1/83, 1/32

Примечание: нули и дроби - площадь некроза у иммунного кролика по отношению к контролю при одной дозе заражения.

После подкожной иммунизации кролики были устойчивы к внутрикожному заражению и особых преимуществ в невосприимчивости к заражению стафилококком в этой группе животных по сравнению с привитыми перорально не наблюдалось.

После получения обнадеживающих результатов иммунизации животных стафилококковым анатоксином перорально была проведена пероральная иммунизация 12 добровольцев в возрасте от 20 до 60 лет нативным или очищенным концентрированным стафилококковым анатоксином трехкратно с 7-дневными интервалами. Перед иммунизацией и через 2 недели после нее определяли титр анти-а-токсина в крови. Кроме того, до и после иммунизации у них измеряли температуру, учитывали общее самочувствие и состояние желудочно-кишечного тракта.

Мы попытались использовать реакцию непрямой гемагглютинации для обнаружения антител к стафилококковому токсину. Применяемый в настоящее время гемолитический метод позволяет выявлять антитела (антитоксины) лишь к токсическому компоненту стафилококкового токсина - в основном к α -токсину.

В основу реакции положен метод непрямой гемагглютинации. В то же время разнообразие физико-химических свойств различных антигенов

обуславливает значительную сложность сенсibilизации эритроцитов антигенами и это приводит к отсутствию единой стандартной методики. Поэтому для каждого антигена экспериментальным путем приходится устанавливать оптимальные условия для адсорбции. Изложенное и побудило нас более подробно остановиться на методических вопросах применения указанной реакции для определения антител к стафилококковому токсину.

Первоначально мы попытались применить в реакции непрямой гемагглютинации нативные эритроциты барана, которые, однако, лизировались при сенсibilизации их различными разведениями нативного стафилококкового токсина. Поэтому нативные бараньи эритроциты оказались непригодными для работы с нативным токсином. Изложенное побудило нас попытаться применить формализированные бараньи эритроциты. Согласно данным литературы, применение формализированных эритроцитов позволяет избежать лизиса как в процессе танирования, так и при дальнейшем хранении, предотвращает их спонтанную агглютинацию, позволяет получать стойкий препарат сенсibilизированных антигеном эритроцитов.

Формализированные бараньи эритроциты хранили в виде 50 % взвеси в физиологическом растворе, а перед постановкой опыта 3-кратно отмывали нейтральным физиологическим раствором и готовили 2,5 % взвесь на буферном солевом растворе pH 7,2. Равные количества полученной взвеси формализированных эритроцитов и таниновой кислоты в разведении 1:20000 смешивали и инкубировали при 37⁰ С в течение 20 мин. После 3-кратного отмывания буферным солевым раствором с pH 7,2 эритроциты ресуспендировали до первоначального объема.

Для выбора оптимальной дозы нативного токсина, которая обеспечивала бы хорошую сенсibilизацию эритроцитов, провели титрование токсина со стандартной противостафилококковой сывороткой. Оптимальными разведениями токсина оказались 1:40-1:160 (активность токсина Lh 0,15 мл). Учитывая возможность групповых реакций, из всех

оптимальных концентраций антигена в реакции непрямой гемагглютинации предпочтительно пользоваться наименьшей. Поэтому в основной части работы для сенсibilизации эритроцитов нативный стафилакокковый токсин применяли в разведении 1:160, что соответствовало концентрации 70 мкг на 1 мл белка.

Как показали проведенные испытания, наилучшие условия для сенсibilизации эритроцитов создаются при следующем режиме: равные объемы танализованных эритроцитов и нативного токсина в разведении 1:160 (токсин разводили на буферном солевом растворе с рН 6,4) смешивали и выдерживали при 37⁰ С в течение 2-3 часов и затем в холодильнике при 4⁰ в течение 18-20 часов. За 2-3 часа до окончания сенсibilизации для предотвращения элюции антигена с эритроцитов добавляли формалин из расчета 1-2 % общего объема. После окончания сенсibilизации эритроциты 3-кратно отмывали буферным солевым раствором с рН 7,2 с 1 % раствором формалина, ресуспендировали в таком же растворе в первоначальном объеме.

Проведенные испытания полученных сенсibilизированных эритроцитов показали, что при хранении в течение 3 месяцев и более в холодильнике при 4⁰ С диагностикумы почти не утрачивали активности. Так, если после приготовления сенсibilизированные токсином эритроциты реагировали с антитоксической сывороткой активностью 80 АЕ до титра 1: 819 200, то через 3 месяца хранения они реагировали с той же сывороткой, разведенной до 1:409 600. Эти материалы свидетельствовали, что нам удалось добиться прочной сорбции компонентов стафилакоккового токсина на танализованных эритроцитах и оптимальных условий для их сохранения.

Как оказалось, реактогенность анатоксина при введении перорально была невысокой: у 2 человек после приема препарата (концентрированного) температура повышалась на несколько часов до 37,2-37,4⁰ С и у 1 - после 3-й иммунизации нативным анатоксином наблюдалась однодневная легкая

диарея. В результате иммунизации у 7 человек титры увеличились (0,5-2; 2-4; 3-6; 1-3; 1-3, 1-3; 1:3), у остальных 5 остались на исходном уровне.

Таблица 10.

Активность стафилококкового анатоксина при воздействии на него соляной кислоты и желудочного сока

Соляная кислота/ желудочный сок	р/Н	№ серии анатоксина	Активность анатоксина (в ЕС/мл)				Примечание
			Исходная	После контакта			
				15 мин ут	30 мин ут	60 мин ут	
Соляная кислота	7,0	53-3	50	50	50	50	
	4,0		50	50	50	50	
	3,0		50	50	50	50	
Соляная кислота	7,0	53-2	50	50	50	50	
	3,0		50	50	50	50	
	4,0		50	50	50	50	
Искусственный желудочный сок	0	53-2	50	40	0	0	Анатоксин в осадке
Надосадочная жидкость желудочного сока	0	53-2	0	0	0	0	Анатоксин в осадке
Желудочный сок с	5,0	53-2	50	50	50	50	Анатоксин в

нормальной кислотностью							осадке
1-я порция							
2-я порция	0	53-2	50	0	0	0	
Желудочный сок больного ахилией	6,6	53-2	50	50	50	50	

Полученные результаты зависели, по-видимому, от воздействия на стафилококковый антитоксин желудочного сока. Анатоксин вполне удовлетворительно сохранял активность на протяжении 1 ч (срок наблюдения) контакта с соляной кислотой при рН 3,0-4,0 (табл. 4), активность анатоксина сохранялась также при добавлении его к 1-й порции желудочного сока нормальной кислотностью (рН 5,0) и к желудочному соку от больного с ахилией (рН 6,6). При контакте с искусственным желудочным соком (продуктом автолиза слизистой оболочки свиных желудков) и со 2-й порцией нормоцидного желудочного сока человека анатоксин выпадал в осадок и в надосадочной жидкости не определялся. Вероятно, в связи с неустойчивостью сохранения активности анатоксина в желудочном соке у добровольцев не всегда наблюдалось повышение титров антитоксина. Таким образом, при введении перорально следует предохранять стафилококковый анатоксин от воздействия желудочного сока.

1. В опытах на кроликах и при исследованиях на добровольцах показана принципиальная возможность иммунизации и реиммунизации стафилококковым анатоксином перорально (при непосредственном введении препарата в желудочно-кишечный тракт и путем орошения полости рта).

2. В результате пероральной иммунизации стафилококковым анатоксином наступала иммунологическая перестройка организма, о которой свидетельствовали появление анти- α -токсина в крови и усиление

репаративных процессов при внутрикожном заражении массивными дозами токсигенных штаммов стафилококка.

3. Результаты иммунизации 12 добровольцев свидетельствовали о безвредности и слабой реактогенности стафилококкового анатоксина при пероральном применении.

4. При введении перорально стафилококковый анатоксин необходимо предохранить от воздействия желудочного сока.

7.2. Экспериментальное изучение зависимости «доза - эффект» при иммунизации стафилококковым анатоксином

Изучение зависимости иммунологического эффекта от дозы антигена, помимо определенного теоретического интереса, имеет и практическое значение. Последнее связано с подбором оптимальных доз антигенов при иммунизации животных разных видов, а также с определением наиболее эффективных схем прививок при контроле иммунологических препаратов. Применительно к разным анатоксинам эти вопросы разработаны далеко не одинаково. Хорошо они изучены в отношении столбнячного и дифтерийного анатоксинов и слабо - в отношении стафилококкового.

Многочисленными экспериментами показано, что при иммунизации животных дифтерийным и столбнячным анатоксинами зависимость между дозой антигена и иммунологическим эффектом в довольно широком интервале доз приближается к прямолинейной регрессии при соответствующей трансформации экспериментальных данных: дозы антигена - в логарифмы, показатели эффекта - в логарифмы антитоксических титров или пробиты летальности (выживаемости). Результаты обоих методов оценки иммунологического эффекта (уровень антитоксина в крови привитых животных и их устойчивость к соответствующему токсину) совпадали. Это понятно, если учесть, что экзотоксины играют основную роль в патогенезе дифтерии и столбняка.

Со стафилококковой инфекцией, в патогенезе которой большое значение имеет не только α -токсин, но и ряд других факторов токсической и ферментативной природы, дело обстоит значительно сложнее. Так как, устойчивость иммунизированных животных (мыши, кролики) к стафилококковому α -токсину соответствует уровню антитоксина в их крови, нам кажется более правильным, учитывая патогенеза этой инфекции, испытывать устойчивость привитых животных не только к токсину, но и к достаточно вирулентной микробной культуре.

В литературах сообщается, что уровень иммунитета к разным штаммам стафилококка может быть различным.

В связи с этим мы поставили перед собой задачу изучить зависимость «доза - эффект» при заражении иммунизированных стафилококковым анатоксином мышей разными штаммами стафилококка. Одновременно у привитых мышей исследовали уровень стафилококкового антитоксина в крови. Было поставлено 4 опыта примерно на 80 мышах. Животных иммунизировали подкожно двукратно с 14-дневным интервалом очищенными анатоксинами серии № 22 (с содержанием 20 ЕС/мл) и 29 (12 ЕС/мл) и высокоочищенным анатоксином серии № 41 (30 ЕС/мл). Все препараты были полностью сорбированы $Al(OH)_3$. Разные дозы анатоксинов вводили мышам в одном и том же объеме (0,5 мл) при постоянном содержании гидроокиси алюминия (3 мг Al_2O_3 в 1 мл). Внутривентральное заражение животных отмытой суточной агаровой культурой стафилококков и взятие крови для определения уровня антитоксина проводили на 8-й день после второй прививки. Для заражения животных мы взяли токсигенные штаммы О-15, Л-17, Б-42, Т-89, Л-23, слаботоксигенный штамм Б-28 и нетоксигенный штамм 20 Р. Учитывали сроки гибели животных и для каждой группы мышей, иммунизированных одной дозой антигена, определяли показатель вирулентности штамма V и иммунологический индекс I . Уровень антитоксина определяли в смеси сывороток, полученных от 4 мышей. Третий опыт был специально посвящен изучению титров

антитоксина. Каждой дозой антигена прививали группу из 24 мышей и определяли количество антитоксина для каждой из 6 подгрупп (по 4 мыши), после чего вычисляли средний геометрический титр антитоксина для данной группы животных.

В первую очередь следует отметить, что иммунологический эффект в значительной степени зависел от того, каким штаммом заражали иммунизированных мышей. Уровень иммунитета против штаммов Л-17 и Л-23 был высоким, против штаммов 0-15, Т-89 и Б-42 - средним и против штаммов Б-28 и 20 Р иммунитета практически не наблюдалось.

Чтобы установить наличие или отсутствие связи между дозой антигена и иммунологическим эффектом, мы вычисляли коэффициент корреляции r , где x - lg дозы антигена, y - иммунологический индекс I или lg титра антитоксина.

Коэффициент корреляции, полученный при обработке результатов третьего опыта, указывал на наличие тесной прямой связи между дозой стафилококкового анатоксина и титром антитоксина в крови привитых мышей, что подтверждалось также и графическим изображением этой связи.

Для установления характера связи данные третьего опыта были подвергнуты дисперсионному анализу, результаты которого показали, что зависимость титра антитоксина от дозы его в исследованном интервале доз антигена выражалась прямолинейной регрессией и подчинялась следующему уравнению:

$$y = 0,16 + 0,72(x - 1,94),$$

где x - lg дозы анатоксина в ЕС, а y - lg антитоксического титра в АЕ. Результаты титрования антитоксина в первом и четвертом опытах согласовывались с выявленной закономерностью. Следовательно, обнаруженная при иммунизации стафилококковым анатоксином зависимость между дозой антигена и эффектом, выраженным в титрах антитоксина, не отличалась от выявленной при вакцинации другими анатоксинами.

Совершенно другая картина наблюдалась, когда мы изучали иммунологические индексы, полученные при заражении иммунизированных животных разными штаммами стафилококка. В большинстве случаев вычисленные коэффициенты корреляции указывали либо на отсутствие связи между дозой и эффектом, либо на весьма слабую связь, причем иногда она носила обратный характер, т.е., при увеличении дозы анатоксина иммунологический эффект проявлял тенденцию к снижению (штаммы Л-17, Б-28, 20 Р, Л-23 - серия № 9).

Исключение составляли результаты, полученные при иммунизации мышей высокоочищенным анатоксином серии № 13 и последующем заражении их штаммом Л-23: высокий коэффициент корреляции (0,88) указывал на наличие тесной связи между дозой антигена и иммунологическим эффектом.

В целом, однако, приходится признать, что заметной зависимости между дозой стафилококкового анатоксина и устойчивостью мышей к заражению микробной культурой нам обнаружить не удалось. Учитывая наличие тесной связи между дозой анатоксина и титром его в крови привитых мышей, можно прийти к заключению об отсутствии четко выраженной зависимости между уровнем стафилококкового антитоксина у иммунизированных животных и их устойчивостью против микробной культуры стафилококка.

Причина этого явления не вполне ясна, однако есть основание думать, что при иммунизации стафилококковым анатоксином у мышей, помимо антитоксина, появляются антитела, не связанные с последним, которые тоже способствуют повышению устойчивости привитых животных против микробной культуры. Это может быть связано с наличием в препарате анатоксина дополнительных антигенов, отличных от α -анатоксина. Интересен тот факт, что наиболее четкое совпадение между титром антитоксина и устойчивостью животных против микробной культуры наблюдалось при иммунизации мышей анатоксином серии № 13,

максимально очищенным от других антигенов. Кроме того, иммунологический эффект в значительной мере связан со свойствами штаммов, применяемых для заражения мышей.

Соотношение разных факторов, определяющих вирулентность различных штаммов стафилококка для экспериментальных животных, широко варьирует, что не могло не сказаться на результатах заражения как неиммунных, так и иммунных мышей.

Оставалось сделать вывод о целесообразности применения той или иной дозы стафилококкового анатоксина в иммунологических экспериментах на мышах. Основываясь на величине антитоксических титров, можно было прийти к заключению, что оптимальный эффект обеспечивала доза, равная 10 ЕС. Однако эта доза слишком велика для того, чтобы использовать ее в повседневных экспериментах. Кроме того, нет оснований считать ее оптимальной в обычном понимании этого слова, поскольку характер зависимости «доза - эффект» указывает на возможность получения более высоких титров антитоксина при использовании больших доз анатоксина. Более целесообразно выявить оптимальную дозу антигена по результатам испытания устойчивости иммунизированных мышей к микробной культуре. Здесь, однако, мешают отмеченные выше трудности, связанные с отсутствием четкой зависимости между дозой анатоксина и иммунологическим индексом. Мы считаем, хотя и с известными оговорками, что при двукратной иммунизации мышей наиболее целесообразно на каждую при прививку использовать дозу стафилококкового анатоксина, равную 1 ЕС. Эта доза обусловила наилучший иммунологический эффект в отношении штамма Л-23 и достаточно хороший - в отношении штамма Л-17. Кроме того, согласно приведенной выше формуле, 1 ЕС анатоксина соответствовал антитоксический титр, равный 1,6 АЕ, т.е. вполне достаточный для защиты мышей от смертельной дозы α -токсина.

1. При иммунизации белых мышей разными дозами стафилококкового анатоксина обнаружена тесная прямолинейная связь между дозой антигена и уровнем стафилококкового анитоксина в крови привитых животных. .

2. Результаты испытания устойчивости иммунизированных мышей против микробной культуры различных штаммов стафилококка зависели в значительной степени от штамма, которым заражали животных, и лишь в небольшой степени - от дозы анатоксина.

3. Проведенные эксперименты позволяют считать, хотя и с известными оговорками, что при двукратной иммунизации белых мышей стафилококковым анатоксином на каждую прививку целесообразно брать дозу антигена, равную 1 ЕС.

7.3. Фагоцитарный и анитоксический иммунитет при стафилококковых инфекций

При изучении иммунитета в отношении стафилококков внимание исследователей наряду с гуморальными показателями привлекают показатели и клеточной реактивности.

В последние годы в теоретической и прикладной иммунологии все большее применение находит реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации, которая по чувствительности значительно превосходит другие серологические методы выявления антител и все шире применяется при изучении различных инфекций. Задачей настоящего исследования явилась оценка показателей анитоксического и фагоцитарного иммунитета при гнойных хирургических заболеваниях у детей различного возраста в динамике. Поскольку в литературе мы не нашли работ, посвященных характеристике заключительного этапа фагоцитарной реакции при стафилококковых процессах детей, нами наряду с обычными показателями фагоцитоза изучалась реакция завершеного фагоцитоза.

Всего обследовано 52 больных с гнойными хирургическими заболеваниями и 15 больных контрольной группы. Больных со стафилококковой деструкцией легких было 10, остеомиелитом - 27, - хронической пневмонией - 8. В сборную группу входило 14 больных перитонитом и с местными процессами - флегмоной, лимфаденитом, парапроктитом и др.

К контрольной группе отнесены дети, госпитализированные по поводу косолапости, кривошеи и других ортопедических заболеваний, а также больные грыжами.

Стафилококковая деструкция легких, означает гнойно-некротическое разрушение кортикального слоя легкого, сопровождающееся образованием множественных абсцессов в легких и прорывом их в плевральную полость.

В данную группу входили больные абсцедирующей пневмонией с пиопневмотораксом и бронхиальными свищами. У 8 больных заболевание протекало остро в течение 1-2 месяцев и закончилось выздоровлением. Среди больных остеомиелитом диагноз острого заболевания был установлен у 11, хронического - у 16; больные хроническим остеомиелитом поступали в период обострения.

Стафилококковая этиология заболевания была подтверждена на основании бактериологических и серологических исследований у 41 из 52 больных. Не удалось установить специфическую стафилококковую этиологию у больных хронической пневмонией в связи с непостоянными находками стафилококков при посевах слизи из бронхов и содержимого бронхоэктазов и отсутствием повышения титра антитоксина в динамике заболевания. Среди больных остеомиелитом стафилококковая этиология не была установлена лишь у 5 детей.

Несмотря на различия в диагнозе и течении заболевания, фагоцитарное число и фагоцитарный показатель характеризовались монотонностью. Так, фагоцитарное число варьировало в пределах 8,4-9,8. У больных контрольной группы показатели фагоцитоза существенно не отличались от таковых у

больных с гнойными хирургическими заболеваниями. Резкие различия выявлены в характеристике завершеного фагоцитоза при сопоставлении показателей у больных контрольной группы и больных с гнойными инфекциями. Так, средний титр завершеного фагоцитоза у больных контрольной группы составлял 24,8, у больных со стафилококковой деструкцией легких-63,4 т. е. в 2,6 раза выше, Высокий уровень его регистрировался также при остром и хроническом остеомиелите стафилококковой этиологии (соответственно 52,7 и 50,4). У больных хронической пневмонией с бронхоэктазами уровень завершеного фагоцитоза был более низким (40,3).

Полученные данные были подвергнуты статистической обработке. При этом установлена высокая достоверность результатов ($P < 0,001$). При сопоставлении показателя завершеного фагоцитоза у больных разных групп и определении достоверности различий показателя по таблицам сличения Стьюдента установлена достоверность разницы этих показателей у больных контрольной группы и у лиц с гнойными хирургическими заболеваниями ($t > 3$), Достоверной ($t = 3,16$, $P < 0,01$) была и разница исходных показателей завершеного фагоцитоза у больных со стафилококковой деструкцией легких и хронической пневмонией II-III степени с бронхоэктазией. Разница изучаемых показателей при стафилококковой деструкции легких и остеомиелите недостоверна ($t < 2$, $P > 0,05$).

При сопоставлении максимальных показателей завершеного фагоцитоза при различных формах заболевания наиболее высокие показатели установлены при стафилококковой деструкции легких (72). Высокие показатели отмечены при остром и хроническом остеомиелите в стадии обострения (60,7-62,7), более низкие -при хронической пневмонии (45,9).

При изучении показателей завершеного фагоцитоза в динамике заболевания выявлены две закономерности сдвигов -повышение исходного, относительно низкого уровня и снижение высоких показателей, достигнутых в разгар заболевания.

В период реконвалесценции при стафилококковой пневмонии происходило некоторое снижение показателей, при хронической пневмонии с бронхоэктазами - его повышение. Однако эти различия недостоверны ($t < 2$, $P > 0,05$).

Как уже отмечалось выше, наряду с фагоцитарными изучались также антитоксические показатели иммунитета. У больных контрольной группы содержание антитоксина сохранялось на невысоком уровне - средний титр составлял 0,75 АЕ. При хронической пневмонии он также не достигал высоких показателей (средний титр 1,5 АЕ). При остром остеомиелите в разгар заболевания уровень антитоксина был низким. Повышение содержания антитоксина отмечалось при стафилококковых процессах в легких (средний титр 1,5 АЕ). При остром остеомиелите в разгар заболевания уровень антитоксина был низким. Повышение содержания антитоксина отмечалось при стафилококковых процессах в легких (средний титр 2,4 АЕ). Необходимо, однако, отметить, что, несмотря на тяжесть заболевания и массивные очаги гнойной инфекции с деструкцией легочной ткани, у 15 из 20 больных этой группы количество антитоксина не превышало 2 АЕ. Наиболее высокие его титры определялись при хроническом остеомиелите - средний титр 5,2 АЕ.

Наиболее заметный сдвиг (в $1 \frac{1}{2}$ раза) произошел у больных острым остеомиелитом.

Представляет также интерес сопоставление изменений титра антитоксина и показателей завершенного фагоцитоза в динамике процесса.

Для оценки достоверности полученных данных был вычислен поликорреляционный показатель связи (r) - коэффициент корреляции для сгруппированных данных и оценена его значимость с использованием критерия согласия χ^2 . $r=0,045$, $\chi^2=7,38$. При 4 степенях свободы $P > 0,05$.

Таким образом, на основании проведенного анализа не удалось установить корреляции между содержанием антитоксина, динамикой его сдвигов в процессе заболевания и показателем завершенного фагоцитоза.

Были сопоставлены также особенности течения процесса в связи с исходным уровнем завершеного фагоцитоза. При этом оказалось, что как при остром, так и хроническом остеомиелите высокий исходный показатель завершеного фагоцитоза еще не свидетельствовал о благоприятном течении заболевания. Высокие показатели в разгар заболевания и при обострении хронического остеомиелита указывали лишь на активность процесса. И, напротив, при стафилококковой деструкции легких высокий исходный показатель в начальный период либо его повышение в разгар заболевания можно было расценивать как благоприятный прогностический признак. Полученные данные были обработаны статистически с исчислением критерия согласия χ^2 по четырехпольному методу; $\chi^2=4,8$, $P < 0,05$; это свидетельствует о достоверности различий.

Результаты исследований позволяют прийти к заключению об однотипном характере фагоцитарной реакции как при остром остеомиелите, так и при обострении хронического остеомиелита. В то же время уровень антитоксина при этих двух формах заболевания значительно различался. Высокое содержание антитоксина в сыворотке крови при хроническом остеомиелите не оказывало защитного влияния, а свидетельствовало о длительном рецидивирующем характере процесса. Несмотря на высокую, казалось бы, иммунологическую реактивность, заболевание затягивалось, так как в основе хронического остеомиелита в отличие от острого лежат деструктивные изменения в костях.

Высокие показатели завершеного фагоцитоза определялись в разгар заболевания, несмотря на то что титры антитоксина были на низком уровне и не наблюдалось выраженной динамики их сдвигов. Изложенное выше позволяет сделать заключение об отставании гуморальных механизмов иммунитета при некоторых острых формах гнойных заболеваний (стафилококковая деструкция легких, острый остеомиелит, флегмона, перитонит) и в то же время об активной клеточной реакции организма при гнойных хирургических инфекциях стафилококковой этиологии у детей.

Высокие показатели завершеного фагоцитоза могут иметь диагностическое значение, подтверждая стафилококковую этиологию заболевания; они определялись, по нашим данным, во многих случаях в ранний период заболевания, когда титр антитоксина был еще низким, бактериологическое исследование при закрытом гнойном очаге провести было невозможно.

Выводы. Выявлены высокие показатели завершеного фагоцитоза при стафилококковой пневмонии, остром и хроническом остеомиелите; при хронической пневмонии показатели завершеного фагоцитоза ниже.

Высокие показатели завершеного фагоцитоза определялись в основном уже в ранние периоды заболевания, тогда как повышение содержания антитоксина при острых стафилококковых процессах у детей обнаруживалось значительно позднее. Определение показателя завершеного фагоцитоза может быть использовано для оценки реактивности при гнойных хирургических заболеваниях стафилококковой этиологии.

Высокий исходный уровень либо повышение показателей завершеного фагоцитоза при стафилококковых пневмониях (деструкции легких) следует расценивать как благоприятный прогностический признак. Полученные данные, свидетельствующие о высокой активности фагоцитарного и определенном отставании формирования антитоксического иммунитета при острых стафилококковых заболеваниях, могут способствовать уточнению патогенеза различных форм гнойных хирургических инфекций у детей.

Использованные литературы:

1. Акатов А.К., Зуева В.С. Стафилококки // -М.: Медицина. -1983. -С. 256.
2. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. Справочник. М., С-52, 1973.
3. Большая Медицинская Энциклопедия (БМЭ)..М., 3-е издание.-1980.
4. Ванеева Н.П., Цветкова Н.В., Гудкова Р.Г. и др. Диагностика стафилококковых заболеваний с помощью иммуноферментной реакции / // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 1984. - №6. - С. 61-64.
5. Ган Ч.Э. Характеристика биологических свойств *Staphylococcus aureus*, выделенных от детей с различными формами стафилококковой инфекции // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2017. №3. С. 45-50.
6. Дмитриев А.В., Климова Е.А. Генетические детерминанты антибиотикорезистентности *Staphylococcus aureus* // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2018. №3. С. 33-38.
7. Жуйкова Г.В., Колесникова М.Б., Поздеева О.С. и др. Региональные особенности заболеваний органов пищеварения у детей 3-10 лет Удмуртской Республики // Ж.Педиатрия.- 2000, №4. - С. 64-67.
8. Иванов А.А., Петров Б.Б. Внутрибольничные стафилококковые инфекции и меры их профилактики // Казанский медицинский журнал. 2018. Т. 99, №2. С. 210-215.
9. Кадыров Ж.Ф., Маматова М.Н., Осланов А.А. Влияние пандемии Covid-19 на борьбу с туберкулезом // Биология ва тиббиёт муаммолари. Илмий журнал. -2023, №1 (142).
10. Кудратова, З.Э., Кулбоев Х., Орзикулов А. Клебсиллезная инфекция кишечника у детей раннего возраста. Журнал вестник врача. -2014. 1(01). Корниенко Е.А. Ранняя диагностика *H. Pylori* - важный шаг к лечению ЖКТ у детей // Медицинский вестник - 2007 №31 - С. 9-13
11. Кудратова, З.Э., Кулбоев Х., Тиркашев О. Клинические и эпидемиологические особенности условно патогенной флоры кишечника // Журнал вестник врача. -2013, 1(03).

12. Кудратова З.Э., Юсупова Н.А., Набиева Ф.С. Нозологическая структура острых кишечных инфекций, вызванных условно-патогенной микрофлорой в Самаркандской области // *Medicus*. - 2019, № 6.
13. Лобзин Ю.В. Клинические рекомендации (протокол лечения) оказания медицинской помощи детям, больным ротавирусной инфекцией. 2015.
14. Мавзютов, А.Р. Факторы патогенности оппортунистических энтеробактерий и их роль в развитии диареи // *Журн. микробиол.* - 2007. - № 1. С. 89-97.
15. Матвеев К.И. Руководство по микробиологической диагностике инфекционных болезней. М., с. 104, 1973.
16. Михайлова, Л.И. Биология условно-патогенных микроорганизмов, вызывающих кишечные инфекции: дис. ... канд. мед. наук: 03.02.03. - Волгоград, 2011. - 137 с.
17. Михайлов А.А., Соколова Е.А. Особенности течения стафилококковых инфекций у новорожденных // *Педиатрия*. 2017. Т. 96, №1. С. 112-118.
18. Медведев, А.П. Патогенность стрептококков / А.П. Медведев, А.М. Мисник, И.В. Соболева // *Учёные записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почёта» государственная академия ветеринарной медицины»*. - 2010. - Т. 46, №2. - С. 158-160. ISSN: 2078-0109
19. Ныркова О.И., Волохова О.А. и др. Роль смешанной инфекции в структуре инфекционных диарей // *Инфекционные болезни*. - 2013. - Т. 11. - приложение №1. - С. 293.
20. Николаева И.В., Анохин В.А. Стафилококковые инфекции в педиатрии // *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2010. Т. 55, №4. С. 45-50.
21. Петрова О.В., Смирнов А.В. Алгоритм расследования вспышек стафилококковой инфекции в медицинских учреждениях // *Имунопатология, аллергология, инфектология*. 2021. №2. С. 60-65.
22. Семенов С.В., Козлова Е.В. Стафилококковые инфекции: современные подходы к диагностике и лечению // *Инфекционные болезни*. 2020. Т. 18, №2. С. 75-82

23. Смирнова Т.А., Беляев А.А. Стафилококковые инфекции кожи и мягких тканей: диагностика и лечение // Российский журнал кожных и венерических болезней. 2021. Т. 24, №5. С. 45-52.
24. Учайкин А.А. «Клинические рекомендации по диагностике и лечению ОКИ у детей в зависимости от типа диареи». / 2013, № 4(8).
25. Федорова Н.Е., Григорьев А.В. Стафилококковые токсины: патогенез и клиническое значение // Журнал инфектологии. 2019. Т. 11, №1. С. 15-22.
26. Шайкулов Х.Ш., Исокулова М.М., Маматова М.Н. Степень бактериоциногенности антибиотикорезистентных штаммов стафилококков, выделенных в самарканде // Eurasian journal of medical and natural sciences. -2023, № 3(1).
27. Berne, C. Adhesius involvet in attachment to abiotic surfases by gram-negative bacteria/ C. Berne, A. Ducvet, G.G. Itarby, J.V. Brun // Microbiol. Streptococcus - 2015. - v. 3. №4., olio: 10.1128 / microbiolspec. MB - 0018 - 2015.
28. Baselga R. Staphylococcus aureus capsule and slime as virulence factors in ruminant mastitis // Vet. Microbiol. -1994.-V.39.-N.3-4.-P. 195-204.
29. Boirivant M. Intestinal microflora and immunoregulation // Mucosal Immunol. - 2008. - № 1. - P. 47-49.
30. Brandhof W.E., Bartelds A.I. General practitioner practices in requesting laboratory tests for patients with gastroenteritis in the Netherlands // BMC Fam. Pract. - 2006. - № 7. - P. 56.
31. Corbella X. Staphylococcus aureus nasal carriage as marker for subseguent staphylococcal infections in intensive care unit patients // Eur. J. Clin. Microbiol. Infekt. Dis.-1997. -Vol.16, №5.-P.351-357.
32. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition/European Society for Pediatric Infectious Diseases Evidence-Based Guidelines for the Management of Acute Gastroenteritis in Children in Europe: Update 2014.

33. McKenzie P.E., Hawke D., Woodroffe A.J. et al. Serum and tissue immune complexes in infective endocarditis. *J. Clin Lab Immunol* 1980; 4(3): 125.
34. Fox J.G, Beck P., Dangler C.A. Concurrent enteric helminth infection modulates inflammation and gastric immune responses and reduces helicobacter-induced gastric atrophy. *Nat Med* 2000;6:536-42153.
35. Welsch M. Le "lysozyme" des Staphylocoques. *Compt. Rend // Soc. Biol.*- 1959. -Vol. 153.-P.2080-2083.
36. WHO MANUAL, 2ND EDITION. Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* // WHO / IVB.11.09. - 2011.
37. <http://chistota05.ru/ridacount.shtml>.