

Винахід стосується мікробіології, зокрема мікроскопічних способів визначення життєздатних і нежиттєздатних мікроорганізмів у клінічному матеріалі, і може бути використаний для діагностики анаеробної інфекції у хворих з гнійними процесами.

Відомий бактеріологічний (культуральний) спосіб діагностики [1,2].

Цей спосіб передбачає використання складних, дорогих поживних середовищ та спеціальної апаратури для культивування анаеробних мікроорганізмів. Крім того через високу чутливість облігатних анаеробів до атмосферного кисню при використанні даного способу нерідко значна частина бактерій втрачається (забір, транспортування клінічного матеріалу, пересів та зберігання отриманих культур), наслідком чого є отримання псевдонегативного результату. Крім того, висівання та ідентифікація анаеробних мікроорганізмів потребує затрати значної кількості часу (до 5 діб) та коштів.

Відомий спосіб визначення кількості життєздатних клітин мікробів, який застосовується для дослідження молочнокислих бактерій у випорожненнях людей і передбачає використання модифікованого твердого поживного середовища з глибинним вирощуванням [3].

Спосіб застосовується без використання анаеробної апаратури, проте, вимагає значних затрат часу, використання спеціальних поживних середовищ і є орієнтованим на лише одну групу бактерій (роду *Lactobacillus*), які є мікроаерофілами.

Інший спосіб визначення вмісту живих мікробів в біопрепараті полягає у тому, що оптичний відгук живих мікробів реєструється у градієнті осмотичного тиску, створюваного гіпертонічним та ізотонічним по відношенню до цитоплазми мікробів середовищами, що мають однаковий показник заломлення світла і концентрацію водневих іонів [4]. Даний спосіб не може бути використаний для клінічного матеріалу (гній, ексудат тощо). Крім того, використання даного способу потребує спеціальної апаратури та практичних навичок персоналу лабораторії, що збільшує вартість дослідження. Крім того даний спосіб не диференціює бактерії за типом дихання.

Для дослідження анаеробної мікрофлори в клінічному матеріалі в практиці широко використовується спосіб газорідинної хроматографії [5]. Він відзначається високою чутливістю і відносно стислими термінами виконання. Проте, через високу вартість апаратури і її обслуговування встановлення хроматографів для мікробіологічної діагностики доцільне лише у великих медичних центрах. До інших недоліків цього метода слід віднести те, що точність його стає відносною, якщо дослідження проводять з первинним клінічним матеріалом, а не з культурою мікроорганізмів. Деякі мікроорганізми, наприклад, *Peptostreptococcus anaerobius* не утворюють типових летких продуктів. Крім того, вони можуть адсорбуватися елементами клінічного матеріалу, або утворюватися *in vivo* в дуже малій кількості.

Прототипом вибраний спосіб визначення життєздатних клітин [6], який ґрунтується на використанні вітальних барвників: еозин, сафранін, трипановий синій. Свіжа культура досліджуваних клітин вноситься у краплю барвника, нанесеного на предметне скло. Живі клітини, які мають непошкоджену мембрану, не адсорбують барвник, а у неживі клітини через припинення метаболізму барвник проникає. Після висушування препарат розглядається за допомогою світлового мікроскопа. Життєздатні клітини залишаються безбарвними, а мертві - зафарбовуються.

Проте, вказаний спосіб використовується лише для оцінки життєздатності еукаріотичних клітин - пухлинних клітин при тестуванні цитостатичних препаратів, сперматозоїдів тощо.

В основу винаходу поставлено завдання, шляхом зміни барвника, забезпечити можливість індикації чутливих до атмосферного повітря неспороутворюючих анаеробних бактерій.

Поставлене завдання досягається тим, що у способі виявлення життєздатності бактерій у клінічному матеріалі для індикації анаеробів, який полягає в тому, що до бактерій прижиттєве додають барвник, після чого готують мазок, який досліджують за допомогою світлового мікроскопа, згідно з винаходом, як барвник використовують метиленову синьку, а для візуалізації живих бактерій використовують негативний спосіб фарбування барвником конгорот.

Неспороутворюючі анаеробні бактерії швидко гинуть в присутності кисню через пригнічення киснем енергоутворюючих процесів, відсутність ферменту каталази, який спричинює накопичення перекису водню, що діє на них бактерицидно (вбиває). Барвник конгорот має властивість вкривати предметне скло тонким однорідним шаром і не зафарбовувати бактерії, які на ньому знаходяться, тобто не проникає крізь оболонку бактерії. Ця властивість барвника дозволяє "негативно" виявляти бактерії (прозорі на червоному фоні). Метиленова синька має властивість накопичуватись у протоплазмі фіксованих (вбитих) бактерій, тобто не проникає через неушкоджену оболонку живих бактерій, а зафарбовує вбиті бактерії (у синій колір). Отже, чутливі до атмосферного кисню бактерії в препараті будуть виглядати синіми - на червоному фоні (вказані кольори добре контрастують).

Дворазовим фарбуванням вдається виявити ті бактерії, які мають здатність швидко гинути в атмосферному повітрі, тобто Неспороутворюючі анаеробні бактерії (роди *Bacteriodes*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus* тощо). Дослідження триває недовго, і дозволяє швидко та достовірно оцінити наявність (чи відсутність) даних бактерій у досліджуваному клінічному матеріалі (гній, ексудат, слиз тощо) і продовжити специфічне дослідження (посів на поживні середовища, дослідження біохімічних властивостей тощо) при наявності бактерій. При відсутності анаеробних бактерій запропонований спосіб дозволяє не продовжувати подальші дослідження, тобто заощадити середовища для культивування, дослідження біохімічних властивостей та робочий час персоналу бактеріологічної лабораторії.

Спосіб здійснюють таким чином.

До 1мл досліджуваного матеріалу додають 0,1мл 1% р-ну метиленової синьки. Завісину інкубують в термостаті протягом 5хв. Бактеріологічному петлею матеріал тонким шаром наносять на знежирене предметне скло та висушують при кімнатній температурі або в термостаті. Краплю 1% р-ну конго рот наносять на край предметного скла та готують мазок по всій його поверхні іншим шліфованим предметним склом. Препарат висушують при кімнатній температурі та розглядають при імерсійній системі світлового мікроскопа. Бактерії, які на момент дослідження зберігають свою життєздатність на червоному фоні конгорот виглядають прозорими; бактерії, які не життєздатні — адсорбують метиленову синьку і виглядають синіми на червоному фоні. Підраховують кількість прозорих і забарвлених клітин. Дослід повторюють через 30 хвилин. Зростання кількості забарвлених клітин на 20% і більше свідчить про наявність

неклостридіальної анаеробної флори. При відсутності суттєвих змін у співвідношенні прозорих і забарвлених клітин при повторному дослідженні наявність неклостридіальної анаеробної флори виключається, що дозволяє не проводити подальші дослідження в даному напрямі.

Приклад: Досліджено ексудат, виділений з черевної порожнини хворого під час операції на розлитий гнійний перитоніт. Зроблено мазок згідно з запропонованим способом. 1мл матеріалу помістили в термостат при аеробних умовах на 30хв, решта матеріалу помістили в анаеростат (в анаеробні умови). Після експозиції в аеробних умовах було зроблено мазок повторно. Результат: в першому мазку близько 5% бактерій були зафарбовані у синій колір, в другому, зробленому через 60хв. — близько 80%. Для контролю використовували стафілокок (контроль 1) і кишкову паличку (контроль 2). Висновок: у матеріалі присутня неклостридіальна анаеробна інфекція, і є доцільним продовжувати бактеріологічне дослідження та призначати хворому відповідну антибактеріальну терапію. Бактеріологічне дослідження підтвердило попереднє припущення. Виділений мікроорганізм — *B.fragilis*.

Джерела інформації:

1. Holdeman L.V., Cato E.P., and Moore W.E.C (Eds): *Anaerobe laboratory manual*. 4.Ed. Virginia Polytechnic Institute and University, Blackburg 1977.

2. Лабораторна діагностика гнійно-запальних захворювань, обумовлених аспорогенними анаеробними мікроорганізмами: Методичні рекомендації. — Харків, 2000. — 35с.

3. Заявка Росії № 97119842, Кл. С12Q 1/06; С12N 1/20; С12N1/04, публ.1999р.

4. Патент Росії № 2 037 805, Кл. G01N15/06; С12Q 1/06, публ.1995 р.

5. Широкова Л.Н., Евдокимов С.Н. Газохроматографические методы исследований метаболизма микроорганизмов/Уметодические рекомендации для курсов повышения квалификации научных сотрудников по сельскохозяйственной микробиологии. — Л: [Б. и др.], 1981. — С.27-30

6. Противоопухолевые антибиотики (под редакцией член-кор. АМН СССР проф. М.М.Маевского). — М, 1962 — С. 21