

**МИНИСТЕРСТВО ВЫСШЕГО И СРЕДНЕГО СПЕЦИАЛЬНОГО  
ОБРАЗОВАНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН  
ТАШКЕНТСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ  
УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ АБУ РАЙХАНА БЕРУНИ**

На правах  
рукописи

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**  
на получение степени магистра

Павельев Владимир Валерьевич  
Ф.И.О.

Метод получения кристаллограмм микроорганизмов и аппаратура для их  
анализа и индентификации  
Название магистерской работы

по специальности: Приборостроение

5A523901

-----  
Название и шифр специальности

Руководитель: Баженов Леонид Григорьевич  
научное звание Ф.И.О.

Ташкент 2008г.

## Оглавление

<b>Введение</b>	<b>5</b>
<b>Глава I. АВТОМАТИЗАЦИЯ В МИКРОБИОЛОГИИ</b>	
1.1. Идентификация микроорганизмов различных групп . . . . .	8
1.2. Компьютерные программы идентификации патогенных грибов . . . . .	12
1.3. Решение практических и научно-практических задач в клинической микробиологии . . . . .	20
<hr/>	
<b>Выводы.</b> . . . . .	<b>26</b>
<b>Глава II. СОВРЕМЕННЫЕ КЛАССИФИКАЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА МИКОЗОВ</b>	
2.1. Характеристика дрожжевых грибов рода <i>Candida</i> . . . . .	27
2.2. Особенности эпидемиологии грибковых инфекций . . . . .	41
<hr/>	
2.3. Кристаллографический метод идентификации микроорганизмов . . . . .	44
<hr/>	
<b>Выводы.</b> . . . . .	<b>49</b>
<b>Глава III. ПРОГРАММНАЯ РЕАЛИЗАЦИЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ СРЕДСТВАМИ DELPHI</b>	
3.1. Описание среды Delphi. . . . .	50
3.2. Назначение программы. . . . .	55
3.3. Работа с программой. . . . .	55
<hr/>	
<b>Выводы.</b> . . . . .	<b>66</b>
<b>Заключение.</b> . . . . .	<b>67</b>
<b>Список литературы.</b> . . . . .	<b>68</b>
<b>Приложение: листинг программы.</b> . . . . .	<b>72</b>

## ВВЕДЕНИЕ

Выполнение бактериологических исследований в условиях современной лаборатории требует учитывать следующие условия:

- Ø увеличение объема анализов,
- Ø расширение спектра исследуемых возбудителей,
- Ø усиление роли условно-патогенных микроорганизмов,
- Ø увеличение частоты встречаемости резистентных штаммов.

Бактериологическая лаборатория выполняет ряд определенных функций: выполнение рутинных исследований, с соблюдением установленных требований, правил и норм.

формирование базы данных и ее ретроспективный анализ.

рекомендации по целенаправленной терапии возбудителей на основе анализа базы данных.

В свою очередь база данных решает следующие задачи:

1. рациональное назначение антибактериальных препаратов помогает избежать формирования лекарственной устойчивости микроорганизмов, что позволяет уменьшить длительность пребывания больного в стационаре и, тем самым, снизить затраты на лечение пациентов.

2. уменьшить или избежать распространения внутрибольничных инфекций.

Таким образом, главной целью клинических бактериологических исследований является выбор адекватной тактики антибиотикотерапии, при условии максимально быстрого ее назначения, при постоянно возрастающих требованиях к качеству лабораторных результатов. Однако, для решения этой задачи необходима стандартизация всех этапов микробиологического исследования для исключения лабораторных ошибок в процессе работы и оценки результата.

Рассмотрим основные современные требования к бактериологическому анализу:

снижение субъективного фактора,  
сокращение времени получения результата,  
снижение трудозатрат при выполнении возросшего объема анализов,  
объективизация чтения результата,  
возможность анализа ситуации,  
и что касается непосредственно клинической микробиологии – создание оптимальных схем химиотерапии.

Если суммировать все вышесказанное, то коротко ситуацию в микробиологии можно охарактеризовать следующим образом: объем и спектр анализов растет, требования к качеству растут, особое внимание уделяется эффективной антибиотикотерапии. В этих условиях оптимальным выходом является стандартизация и автоматизация всех этапов анализа.

Рациональным решением проблемы является использование в клинических бактериологических лабораториях автоматизированных анализаторов и коммерческих тест-систем, позволяющих соблюдать все перечисленные требования.

#### **Актуальность темы.**

В связи с вышесказанным актуальность диссертационной работы не вызывает сомнений.

Целью диссертационной работы является разработка метода получения кристаллограмм микроорганизмов и изучение аппаратуры для их анализа и идентификации.

**Задачи исследования:** В связи с целью исследования необходимо осуществить

1. Анализ существующих методов получения кристаллограмм микроорганизмов.
2. Ознакомление с методикой и аппаратурой для идентификации микроорганизмов.
3. Разработка программы идентификации микроорганизмов (бактерий).

**Степень разработанности проблемы** – при значительном развитии

компьютерных технологий в микробиологических исследованиях и аппаратных средств совершенной методики идентификации микроорганизмов в настоящее время не существует.

**Объектом исследования** в работе являются кристаллограммы микроорганизм рода *Candida*.

**Научная новизна** работы заключается в разработке:

алгоритма, реализующего цифровую идентификацию микроорганизмов

**Практическая значимость.**

Создана удобная и общедоступная программная среда для идентификации микроорганизмов с малыми затратами времени и необходимой точностью результатов.

**Объем и структура работы.** Магистерская диссертация состоит из введения, трех глав и заключения, изложена на 75 страницах машинописного текста, содержит 15 рисунков. Список литературы содержит 43 публикации.

**Публикации.** По материалам магистерской диссертации опубликована одна печатная работа.

## ГЛАВА I

### АВТОМАТИЗАЦИЯ В МИКРОБИОЛОГИИ

#### 1.1 Идентификация микроорганизмов различных групп

Опыт применения микротест-систем в практической работе показал, что заключительный этап исследований - проведение идентификации выделенных клинических культур, ее уровень и достоверность зависят от вида микроорганизмов, количества изученных признаков и используемых способов или методов обработки данных. Так, идентификационные таблицы и индексы профилей пригодны и достаточно достоверны для групп микроорганизмов с малым числом таксонов и ограниченным количеством биохимических тестов. При этом удовлетворительные результаты могут быть получены только для культур с типичными признаками, что не всегда характерно для клинической практики, а идентификация культур с атипичными свойствами часто занимает много времени и не всегда приводит к положительному результату, т. к. невозможно предусмотреть все варианты вариабельности ферментативной активности клинических штаммов микроорганизмов. Разработанные к некоторым тест-системам книги кодов (регистры) позволяют расширить количество идентифицируемых культур, проводить идентификацию и в случае 1-2 нетипичных для исследуемого вида тестов выполнить ряд требуемых дополнительных тестов для разделения возможных вариантов. Однако и при их использовании часто требуется много времени для подсчета числового кода, особенно при наличии сомнительных тестов. По нашему мнению, единственный путь для преодоления указанных трудностей - это использование компьютерных идентификационных программ[1,2,5].

Для идентификации микроорганизмов различных групп разработаны две программы: программа «Идентификация», встроенная в «Систему микробиологического мониторинга «Микроб», предусматривающая визуальное

считывание результатов биохимических тестов, выполненных с использованием коммерческих тест-систем, описанных в предыдущем разделе, и программа «Микроб-автомат», позволяющая с помощью ридеров типа «Multiscan», «iEMS-Reader» или «Multiscan-Accent» фирмы «TERMO-Labsystems» (Финляндия) производить автоматическое считывание коммерческих идентификационных тест-систем. Преимуществом программ является возможность расширения числа идентифицируемых видов микроорганизмов спектра изучаемых признаков (тестов), одномоментная и практически мгновенная обработка результатов широкого ряда биохимических и других тестов, получения стандартных, воспроизводимых и сопоставимых результатов, получение готового бланка анализа[3,4,5].

Идентификация микроорганизмов в данных программах основана на изучении морфологических, культуральных свойств и биохимической активности с использованием микротест-систем, позволяющих одновременно определить от 7 до 24 и более различных ферментативных реакций.

По результатам первичного посева и данных микроскопии проводится дифференциация бактериальных культур на грамположительные и грамотрицательные кокки и палочки.

Для идентификации грамположительных кокков на основании характера роста на кровяном агаре, данных морфологии и наличия каталазой активности используются тест-системы СТАФИтест 16, СТРЕПТОтест 16 или ЭН-КОККУСтест (производство фирмы «ПЛИВА-Лахема», Чехия).

Для идентификации грамотрицательных оксидазоположительных дипло- и тетракокков или коккобацилл используется НЕЙССЕРИЯтест (производство фирмы «ПЛИВА-Лахема», Чехия).

Выбор тест-систем для идентификации грамотрицательных палочек производится по данным ферментации глюкозы (О/Ф-тест на среде Хью-Лейфсона) и/или наличию оксидазой активности (ОКСИтест).

Для идентификации оксидазоотрицательных микроорганизмов используются тест-системы ММТ-Е1 и ММТ-Е2 (производство

Ставропольской медицинской академии) или ЭНТЕРОтест 24, ЭНТЕРОтест 16 (производство фирмы «ПЛИВА-Лахема», Чехия).

Для оксидазоположительных культур используется НЕФЕРМ-тест24 (производство фирмы «ПЛИВА-Лахема», Чехия).

Одновременно ставится тест на среде Хью-Лейфсона для определения ферментации глюкозы и наличия газообразования. Для определения подвижности культуры делается посев в полужидкий агар[6].

При отсутствии теста на оксидазу выбор тест-системы производится в соответствии с результатом теста на среде Хью-Лейфсона. Для культур, ферментирующих глюкозу, используются тест-системы ММТ-Е1 и ММТ-Е2, ЭНТЕРОтест 24 или 16. Для культур, неферментирующих глюкозу, - НЕФЕРМтест 24.

Для ускоренной идентификации микроорганизмов из семейства энтеробактерий могут быть использованы тест-системы ЭНТЕРО-Скрин - для наиболее часто встречающихся возбудителей этой группы, в основном при уроинфекциях, и ЭНТЕРОРapid (производство фирмы «ПЛИВА-Лахема», Чехия) - для расширенного спектра.

При выделении грамположительных палочек, подозрительных на коринебактерии, используется тест-система ММТ-Д (производство Ставропольской медицинской академии), предназначенная для идентификации бактерий только этого рода.

Для компьютерной идентификации анаэробов с использованием микротест-систем АНАЭРОтест 23 (производство фирмы «ПЛИВА-Лахема», Чехия), помимо результатов тестов, получаемых на планшетных индикаторных средах, необходимо иметь данные о морфологии микроорганизмов, отношении к окраске по Граму, наличию или отсутствию спорообразования для разнесения микроорганизмов на подгруппы.

Идентификация грибов предусмотрена с использованием коммерческой тест-системы АУКСОКОЛОР 2 (производство фирмы «BioRad», Франция) только при визуальном чтении результатов биохимических тестов.

Идентификация микроорганизмов в программах основана на обработке результатов выполненных тестов.

Для этого на каждую группу микроорганизмов составлен банк данных, представляющий собой обобщенные сведения о частоте встречаемости того или иного теста у микроорганизмов различных видов. При составлении банков использованы литературные данные и наши собственные исследования, позволяющие учесть особенности клинических штаммов и тест-систем. Для всех групп микроорганизмов спектр тестов, приведенных в банках, достаточно широк, он не ограничивается только биохимическими тестами, а включает данные По Микроскопии (что особенно важно для анаэробов), характеру роста на дифференциально-диагностических средах, наличию гемолиз подвижности культур, наличию пигмента и т. д. [7,8,9].

Программы позволяют проводить идентификацию 359 видов бактерий, включающих в себя:

- 87 представителей из семейства энтеробактерий;
- 14 видов из семейства вибрионов;
- 40 видов стафилококков и родственных грамположительных кокков;
- 30 видов стрептококков;
- 17 видов энтерококков;
- 51 вид нефер-ментирующих грамотрицательных бактерий;
- 12 видов нейссерий;
- 13 видов коринебактерии;
- 95 видов анаэробов.

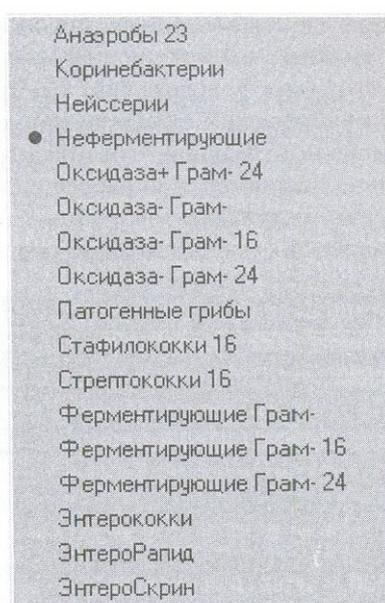
Программа «Идентификация» позволяет также проводить идентификацию 34 вида патогенных грибов[11].

## 1.2. Компьютерные программы идентификации патогенных грибов

В программе «Система микробиологического мониторинга «Микроб» [11] при входе в раздел «Идентификация» на экране появляется всплывающее меню с полным списком банков, соответствующих идентифицируемым группам микроорганизмов с учетом используемых тест-систем (рис. 1).

Выбор банка производится по результатам первичной дифференциации идентифицируемого микроорганизма. Например, для идентификации неферментирующих грамотрицательных палочек выбирается банк «Неферментирующие», после чего появляется экранная форма с перечнем всех тестов, заложенных в банк данных на эту группу микроорганизмов (рис. 2).

Как видно из рис.1, перечень тестов не ограничивается только планшетными, а включает ряд дополнительных биохимических и других тестов, которые используются для идентификаций грамотрицательных



неферментирующих глюкозу бактерий.

Рис. 1. Перечень компьютерных банков

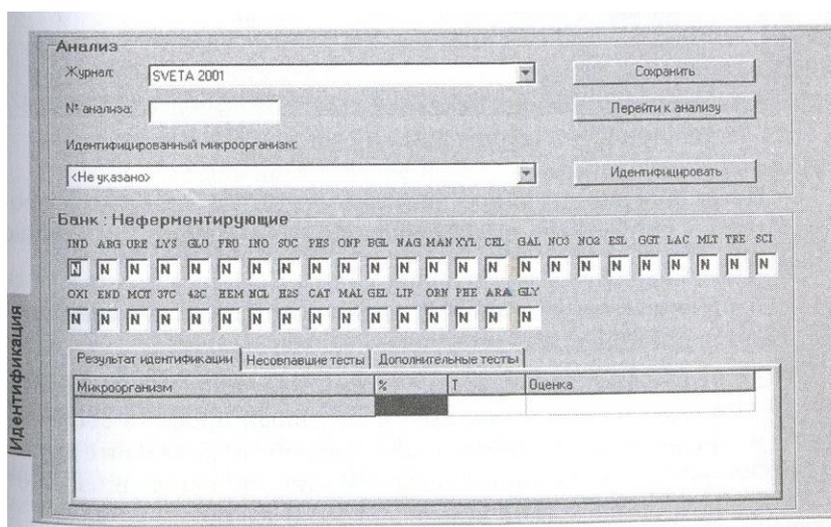


Рис. 2. Перечень тестов для идентификации грамотрицательных палочек, неферментирующих глюкозу.

При проведении идентификации визуально учитывают результаты выполненных планшетных тестов, диагностических полосок и дополнительных тестов (морфология, рост на Эндо, гемолиз, подвижность, ферментация глюкозы, оксидаза, пигмент и др.), отмечая их «+» при положительной реакции, «-» при отрицательной и «?» при нечеткой реакции. Например, при работе с банком «Неферментирующие» интерпретация результатов планшетных биохимических реакций может выглядеть в следующем виде (рис. 3).

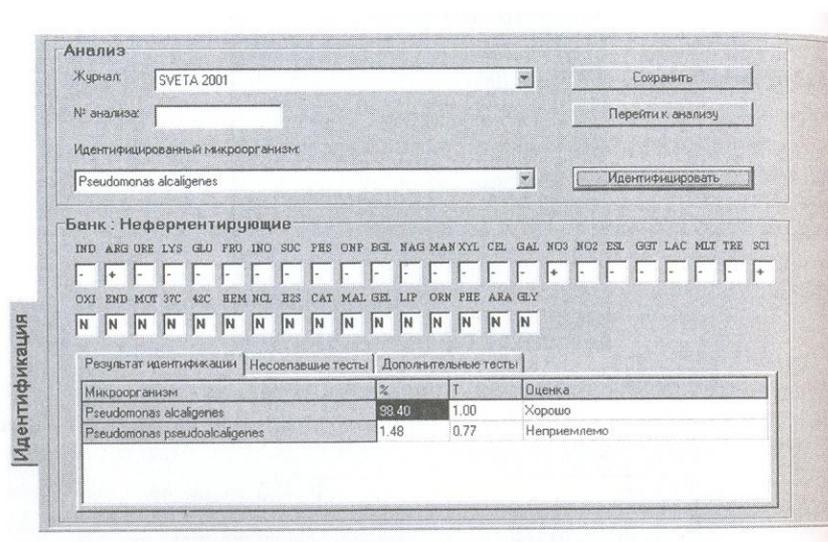


Рис. 3. Результаты идентификации.

После завершения ввода результатов тестов программа проводит расчет результатов идентификации, включающих следующие параметры:

1. Наименование наиболее вероятного или вероятных микроорганизмов из имеющихся в банке данных.

2. Подобие (вероятность), % идентификации - показатель, указывающий, насколько полученный профиль соответствует идентифицированному микробу в сравнении с другими таксонами, включенными в данный банк данных. Этот показатель может варьировать от 0 до 100%,

3. T-индекс - показывает, насколько идентифицированный микроб по своему профилю соответствует данному таксону. Этот показатель колеблется от 0 до 1 и обратно пропорционален количеству атипичных тестов.

4. Качественная оценка идентификации определяется соотношением % идентификации и T-индекса:

- «отличная» - % идентификации 99,9 и более, T-индекс 0,75 и более;

- «очень хорошая» - % идентификации 99,0 и более, T-индекс 0,50 и более;

- «хорошая» - % идентификации 90,0 и более, T-индекс 0,25 и более;

- «приемлемая» - % идентификации 85,0 и более, T-индекс 0,30 и более.

5. Данные о несовпадающих (атипичных) тестах в полученном профиле для каждого из вероятных таксонов с процентом положительных реакций, заложенных в банке.

6. Перечень дополнительных разделительных тестов в случае получения двух и более вероятных культур с указанием процента положительных реакций для каждого теста и таксона. После выполнения и внесения рекомендуемых дополнительных тестов программа позволяет переидентифицировать культуру.

7. Идентификация до рода или группы микроорганизмов одного рода - в случае неудовлетворительной идентификации для каждого из выбранных таксонов, но дающей в сумме для двух и более таксонов одного родового наименования удовлетворительные показатели (рис. 4).

В практической работе следует обращать особое внимание на те случаи, когда в таблице результатов идентификации появляются редко встречающиеся виды бактерий, причем для них нет ни одного несовпадающего с банком данных теста. В этих случаях для подтверждения результата рекомендуется исследование повторить с постановкой дополнительных тестов, приготовив суспензию из популяции, выращенной из отдельной колонии на неселективной среде, полностью исключив возможность присутствия примеси посторонних микроорганизмов, особенно медленно растущих [12,13].

Опыт работы с коммерческими тест-системами и компьютерной идентификацией микроорганизмов позволяет нам сделать

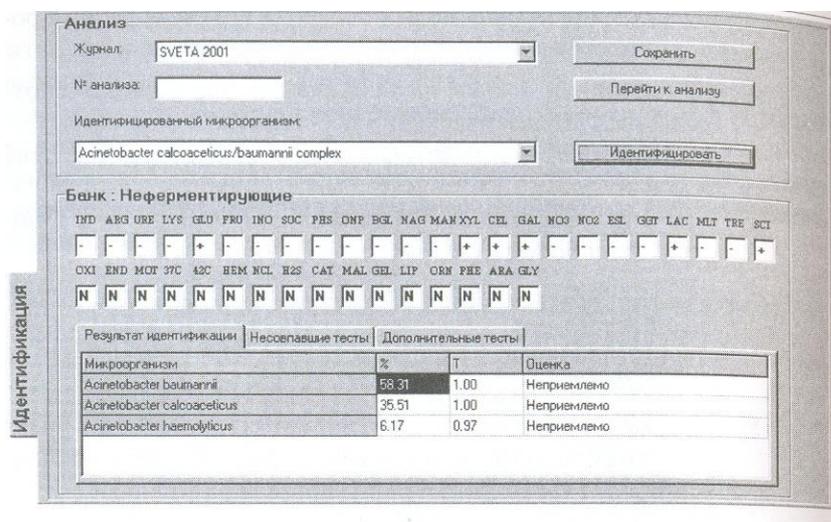


Рис. 4. Результат идентификации.

дополнительные рекомендации для получения более убедительного результата верификации. Так, при идентификации бактерий из семейств Enterobacteriaceae и Vibrionaceae (банк данных «Гра-мотрицательные ферментирующие бактерии»), а также бактерий семейства Enterobacteriaceae и некоторых оксидазоотрицательных пеперментирующих бактерий (банк данных «Оксидазоотрицательные грамотрицательные бактерии») при использовании

мультимикротестов ММТ-Е1 и ММТ-Е2, ЭНТЕРОтест 16 и ЭНТЕРОтест 24 целесообразно дополнительно к тестам, имеющимся в планшетах и на диагностических полосках, вносить результаты теста утилизации глюкозы на среде Хью-Лейфсона, газообразования из глюкозы, оксидазой активности, подвижности культуры, наличия пигмента.

Для компьютерной идентификации оксидазоположительных грамотрицательных микроорганизмов при использовании микротест-систем НЕФЕРМтест 24 (банк данных «Оксидазоположительные грамотрицательные бактерии») в качестве дополнительных к планшетным необходимо внести показатели следующих тестов: ОКСИ-тест, утилизация глюкозы на среде Хью-Лейфсона, рост на среде Эндо, подвижность, наличие пигмента, а при использовании среды Клиглера (Олькеницкого) - наличие сероводорода.

При компьютерной идентификации стафилококков с использованием микротест-систем СТАФИтест 16 рекомендуется дополнительно к планшетным тестам вносить результаты ВПтеста, наличие или отсутствие гемолиза, каратиноидного пигмента, в ряде случаев - и результат реакции плазмокоагуляции.

Для идентификации стрептококков при использовании микротест-систем СТРЕПТОтест 16 следует дополнительно к тестам планшетным внести данные о наличии бета-гемолиза, результаты ВП- и ПИРАтестов[14,15,16,17].

При идентификации энтерококков, кроме планшетных тестов ЭН-КОККУСтест и результата ПИР-теста, желательно внести наличие гемолиза, пигмента, подвижности.

Для компьютерной идентификации анаэробов с использованием микротест-систем АНАЭРОтест 23, помимо результатов тестов, получаемых на индикаторных средах, необходимо внести данные о морфологии микроорганизмов, отношении к окраске по Граму, наличии или отсутствию спорообразования для разделения микроорганизмов на подгруппы, наличии черного пигмента, газообразования[18].

При проведении идентификации грибов с использованием коммерческой тест-системы АУКСОКОЛОП после внесения результатов тестов, полученных в микроплашке, добавить наличие пигмента, артроспор, капсул, роста при 37 °С и др[19].

При всех достоинствах и преимуществах использования программы «Идентификация» при большом объеме выполняемых исследований визуальное считывание биохимических тестов и внесение их вручную в экранную форму для последующей компьютерной обработки желательно заменить на автоматическое с использованием приборов - ридеров[20].

#### Программа «Микроб-автомат»

Внедрение ридеров для выполнения ежедневных, самых трудоемких и дорогостоящих исследований по идентификации и определению антибиотикочувствительности в работу микробиологических лабораторий, несомненно, позволяет получать стандартные результаты, ускоряет выдачу анализов, заменяет ручной малопроизводительный труд.

Было отдано предпочтение ридерам фирмы «ТЕРМО-Labsystems» (Финляндия), т. к. они легко адаптируются как к отечественным, так и к импортным (например производства фирмы «ПЛИВА-Лахема», Чехия) тест-системам для проведения идентификации бактерий и определения антибиотикочувствительности с наборов антибиотиков по желанию заказчика. Возможность использования тест-систем не только фирм-производителей ридера не создает без выходных ситуаций, оставляет возможность выбора используемых тест-систем, исходя из их качества, цены, доступности для каждого пользователя[21,22,23].

На базе приборов: «iEMS-Reader», «Multiskan» и «Multiskan-Accent» создано «Автоматизированное рабочее место микробиолога, химиотерапевта «Микроб-автомат». Созданная для этих целей программа «Микроб-автомат» позволяет проводить автоматизированное считывание результатов биохимических тестов в вышеописанных микротест-системах (кроме тест-

систем для идентификации грибов). Все дополнительные тесты рекомендуется вносить вручную, как изложено в предыдущем разделе[25].

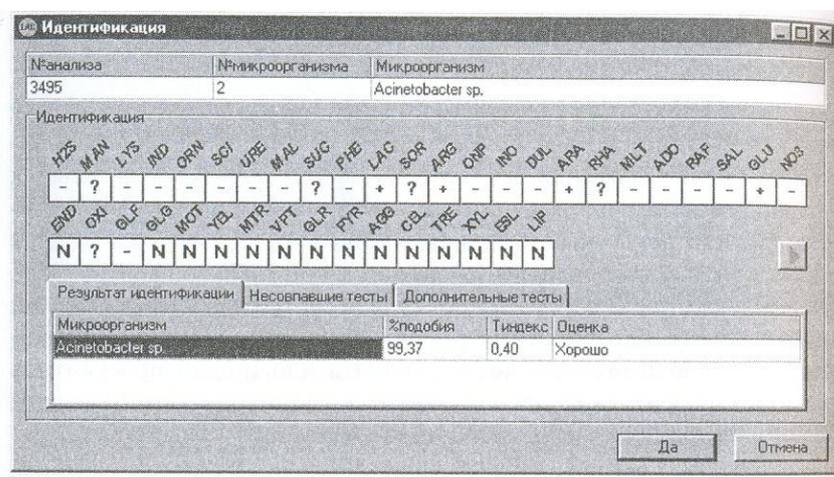


Рис. 5. Вариант проведения идентификации с введенным дополнительным тестом GLF

В нижеследующей таблице приведены обобщенные результаты идентификации 2860 клинических штаммов бактерий из различных групп, биохимическая активность которых исследована с использованием коммерческих тест-систем, а обработка проведена с помощью программы «Идентификация» при визуальном считывании и программы «Микроб-автомат» при автоматизированном считывании результатов биохимических реакций.

Из приведенных данных видно, что в зависимости от использованных тест-систем процент идентификации варьировал от 90,9 до 98,5%.

Оценка отдельных тест-систем показала, что при использовании СТАФИтест 16, предназначенного для рутинной идентификации стафилококков и дифференциации их от других родственных грамположительных кокков, идентифицировано 152 (97,4%) из 156 исследованных штаммов. В рамках данного исследования было идентифицировано 17 видов различных грамположительных кокков, из них 15 видов стафилококков: *S. epidennidis* (65 штаммов), *S. аигеш* (21), *S. haemolytkus*

(18), *S. warneri* (17), *S. hominis* (13), *S. saprophyticus* (2), *S. auricularis* (2), *S. cohnii/cochnii* и *S. cohnii/ureolyticus* (5), *S. capitis* и *S. capitis/ureolyticus* (4) и др.

Для идентификации каталазоотрицательных грамположительных кокков в настоящее время фирма «ПЛИВА-Лахема» (Чехия) выпускает отдельные тест-системы: СТРЕПТОтест 16 для идентификации наиболее часто вызывающих патологию у человека представителей микроорганизмов из группы пирогенных, оральных и других стрептококков и ЭН-КОККУСтест для идентификации энтерококков. В качестве разделительного теста при выборе тест-системы предложен полносочный ПИРАтест для быстрого (5-10 мин) выявления цветной реакции. Данный тест дает положительную реакцию для абсолютного большинства клинически значимых энтерококков. Из стрептококков данный тест положительный только у *S. Pyogenes*[28,29,30].

Оценка СТРЕПТОтест 16 проведена по результатам исследования 307 культур, выделенных из клинического материала, из которых идентифицировано 279 штаммов (90,9%), относящихся к 24 видам различных стрептококков: *S. pyogenes* (28 штаммов), *S. pneumoniae* (23), *S. oralis/mitis* 1 и *S. mitis* 2 (51), *S. agalactiae* (22), *S. anginosus* (11), *S. equi/equi* (15), *S. uberis* (5), *S. parauberis* (9), *S. salivarius* (25), *S. anguis* (1), *S. mutans* gr. (6), *S. dysgalactiae/equusimilis* и *S. dysgalactiae/desgalactiae* (21), *S. equinus* (9), *S. bovis* (7) и др. [31].

### 1.3. Решение практических и научно-практических задач в клинической микробиологии

Внедрение ридеров для выполнения ежедневных, самых трудоемких и дорогостоящих исследований по идентификации микроорганизмов и определению антибиотикочувствительности в работу микробиологических лабораторий, несомненно, позволяет получать стандартные результаты, ускоряет выдачу анализов, заменяет малопроизводительный ручной труд. Однако задачи микробиологической службы на современном этапе значительно шире. Клинические микробиологи в тесном сотрудничестве с клиническими фармакологами должны принимать более активное участие в лечении конкретного больного с гнойно-воспалительным заболеванием или осложнением. Эта задача в настоящее время становится очень актуальной в связи с дефицитом антибактериальных препаратов, их дороговизной и появлением в стационарах большого количества полирезистентных к антибактериальным препаратам штаммов микроорганизмов, в частности в результате неправильного их применения и нарушений санитарно-эпидемиологического режима.

В связи с изложенным микробиологические лаборатории следует оснащать не только ридерами, позволяющими проводить измерения только по конечной точке, что вполне достаточно для идентификации микроорганизмов и определения их антибиотикочувствительности, но и микробиологическими анализаторами со встроенными термостатами и встряхивателями, позволяющими получать кривые роста, свидетельствующие о кинетике размножения микроорганизмов, как интактных, так и под действием любых факторов[32,33].

Первые автоматизированные микробиологические анализаторы появились в 80-х годах. Разработке их предшествовали научные исследования по поиску физической величины, которая соответствовала бы количеству

микроорганизмов в жидкой питательной среде. В настоящее время известно, что характерное приращение оптической плотности в ячейке с инокулированной питательной средой свидетельствует о размножении в ней микроорганизмов. Высокий уровень корреляции оптической плотности с количеством микробных тел позволяет опосредованно «кривую роста оптической плотности» называть «кривой микробного роста», представленной в виде графиков приращения оптической плотности на каждом шаге измерения [10]. Все автоматизированные системы в основе своей содержат фотометр с горизонтальной или вертикальной фотометрией[34].

В последние годы появился микробиологический анализатор, регистрирующий кинетику размножения микроорганизмов на принципиально новой физической основе - «BACTRAC-4100» фирмы «Si-Lab» (Австрия). Принцип действия данного анализатора основан на регистрации относительного изменения электрического импеданса (сопротивление + емкость) питательной среды в пробе и относительного изменения электрического импеданса в районе двойного электрического слоя между электродами, происходящих под влиянием процессов роста и жизнедеятельности микроорганизмов. «BACTRAC-4100» рекомендуется к использованию в санитарной микробиологии для контроля общей обсемененности и загрязнения основными видами санитарно-показательных микроорганизмов (коли-формы, сальмонеллы, клостридии, плесени и дрожжи) продуктов питания, а также при контроле за стерильностью производстве медицинских препаратов и фармацевтической индукции, хирургических материалов в больницах. Следует отметить что система в настоящее время не позволяет провести выделен<sup>ь</sup> микроорганизма, его идентификацию и определение антибиотикочувствительности. Время проведения анализа для определено общего микробного числа путем анализа кривых роста одинаково при использовании анализатора «BACTRAC-4100» и планшетного фотометра «iEMS-Reader»[36].

Первыми автоматизированными микробиологическими анализаторами были системы фирмы «ABBOT» (США) -«MS-2» и «AVANTAGE». Кроме идентификации и определения антибиотикочувствительности, «AVANTAGE» позволял определять степень обсемененности мочи в варианте «отрицательно» при обсемененности менее  $4,5 \times 10^4$  и «положительно» при обсемененности более  $4,5 \times 10^4$  КОЕ/мл мочи. Это не совсем устраивало микробиологов, т. к. интерпретация микробного числа тесно связана с клиническим диагнозом. Данный метод, по-нашему мнению, мог использоваться только для скрининга мочи «здоровых» людей для выявления скрытой патологии. Через 3-4 года после начала эксплуатации анализаторов фирма перестала выпускать данные приборы и соответственно расходные материалы к ним. Уникальность тест-систем, отсутствие возможности адаптации к данному прибору как отечественных, так и импортных питательных сред, дисков для определения антибио-тикочувствительности сделали невозможным использование этих дорогостоящих приборов.

Все известные микробиологические анализаторы можно условно разделить на «закрытые» и «открытые» системы. «Закрытые» системы, на которых мы останавливались выше, представляют собой анализаторы, ориентированные только на питательные среды, реактивы, тест-системы, изготавливаемые фирмами-производителями анализатора, что ставит покупателя в полную зависимость от производителя. Это относится и к программному продукту, в котором ничего нельзя изменить или дополнить. «Открытость» системы предполагает возможность адаптации к ним отечественных и зарубежных тест-систем для проведения идентификации микроорганизмов и определения - антибиотикочувствительности, питательных сред, реактивов. КР этого, эти системы, благодаря адаптации к программным продуктам, могут постоянно развиваться, что способствует быстрому внедрению новых научных знаний в практическое здравоохранение.

Особо следует отметить перспективность использования приборов, позволяющих снимать кинетику размножения микроорганизмов. Наличие их в

лабораториях делает возможным решение широкого круга задач: определение степени обсемененности биоматериалов; проведение скрининга препаратов или их комбинаций для выявления антибактериальной активности; изучение влияния различных комбинаций антибактериальных препаратов на чистую или смешанную культуру микроорганизмов; изучение постантибиотического действия антибактериальных препаратов; оценка адекватности проводимой терапии и в случае необходимости ее корректировка; изучение бактерицидности сыворотки крови больного для выявления интенсивности подавления противoinфекционных механизмов защиты, что позволяет выделить больных в группы риска по возникновению гнойно-воспалительных осложнений и предпринять соответствующие меры по их профилактике; проведение фармакокинетических исследований по определению концентраций антибактериальных препаратов, витаминов, аминокислот и т. д. [6, 9, 11, 12].

В настоящее время единственными приборами, отвечающим всем требованиям для проведения кинетических измерений, являются планшетные фотометры фирмы «TERMO-Labsystems» (Финляндия) «iEMS-Reader» и «Multiscan-Accent» с вертикальной фотометрией. Они имеют преимущества перед фотометрами с горизонтальной фотометрией, т. к. позволяют работать с микрообъемами проб, улавливают рост как придонно, так и поверхностно растущих микроорганизмов. Приборы имеют встроенный термостат, обеспечивающий поддержание температуры с точностью до  $+0,5$  °C и с разбросом по планшете, инкубируемому в приборе  $+0,2$  °C, восемь светофильтров с длинами волн 340, 405, 414,450, 492, 540, **620** и 690 нм и встроенный встряхиватель.

Достоинством приборов, несомненно, является система охлаждения термостата, при которой не происходит инфицирование питательного бульона при кинетических измерениях открытого планшета.

Планшетные фотометры рассчитаны на стандартные как отечественные, так и импортные 96-луночные плоскодонные планшеты.

Приборы совместимы с компьютером и работают с помощью программы «Микроб-автомат». Для получения кривых микробного роста проводится динамическое измерение оптической плотности в ячейках планшета через равные промежутки времени при определенных длинах волн фотометрирования. При проведении динамических измерений на экран монитора высвечивается время вступления микроорганизмов (рис. 6,7).

Остановимся подробнее на некоторых задачах, которые можно решить, используя кинетические модели роста микроорганизмов

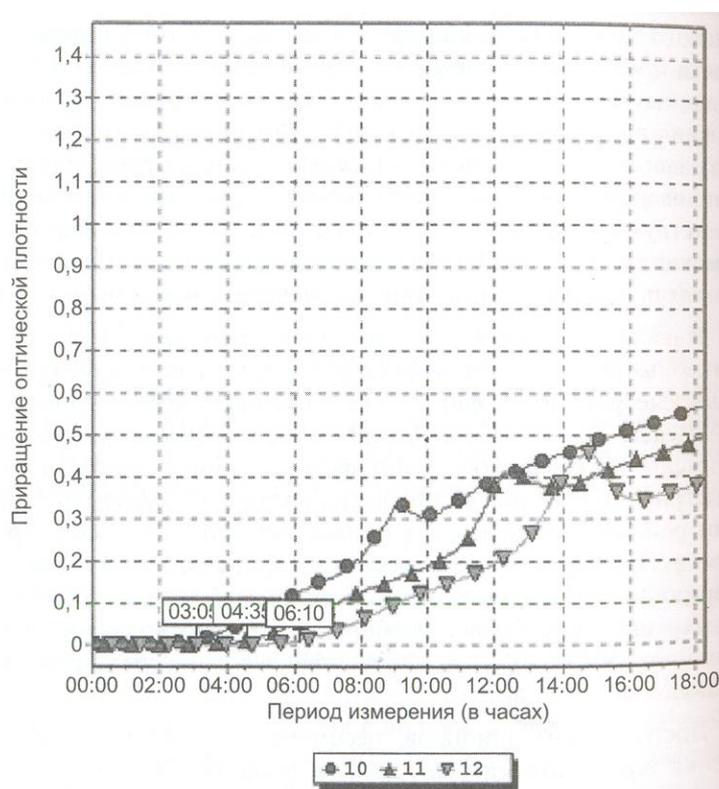


Рис. 6. Модели роста *S. aureus* с указанием времени вступления в фазу логарифмического роста, где: № 10 - 10<sup>6</sup>, № 11 - 10<sup>5</sup>, № 12 - 10<sup>4</sup> микробных тел / мл

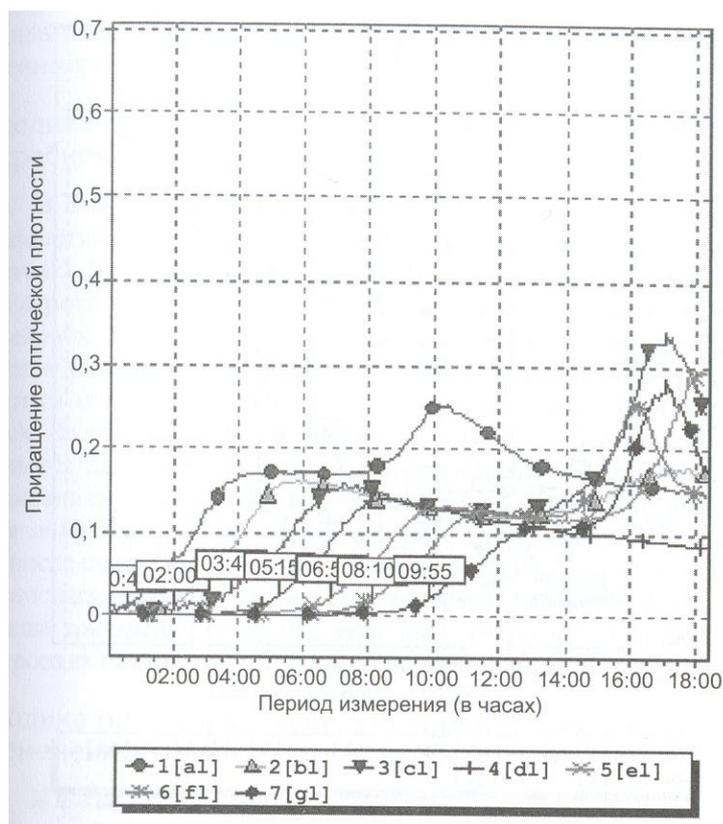


Рис. 7. Модели роста *E. faecalis* при 10-кратных разведениях суспензии

#### Оценка качества питательных сред

Для этих целей в лунки планшета закапывают 10-кратные -разведения (от  $10^8$  до  $10^1$ ) различных микроорганизмов и проводят динамическое измерение. Качество питательной среды определяется тем разведением культуры, в котором удастся проследить рост микроорганизмов, а также величиной приращения оптической плотности.

Питательную среду можно считать пригодной для проведения экспериментов в том случае, если регистрируется рост даже прихотливых микроорганизмов (например стрептококков) в разведении  $10^1$ - $10^5$  микроорганизмов в 1 мл[37].

## **ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ I**

Описано применение микротест-систем в микробиологии, показана необходимость их применения для идентификации микроорганизмов. Подробно рассмотрены и проанализированы компьютерные программы идентификации микроорганизмов: «Микроб-автомат», «Идентификация», а также микробиологические анализаторы, применяемые в настоящее время для исследований в клинической микробиологии.

## Глава II

### СОВРЕМЕННЫЕ КЛАССИФИКАЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА МИКОЗОВ

#### 2.1. Характеристика дрожжевых грибов рода *Candida*

В последние десятилетия оппортунистические инфекции, вызываемые условно–патогенными грибами, занимают особое место в практике клиницистов различных специальностей.

Как ни парадоксально, отчасти это связано с теми успехами, которых достигла современная медицина в лечении онкологических заболеваний и в борьбе с возбудителями серьезных инфекций. Кроме того, очевидно, что в последние десятилетия наблюдается увеличение интенсивности воздействия на организм человека внешних факторов, вызывающих развитие иммуносупрессивных состояний. Помимо этого, конец XX века ознаменовался значительным распространением фатального заболевания – ВИЧ–инфекции. Патологические состояния, вызванные воздействием грибов рода *Candida* на организм человека, также относятся к разряду оппортунистических микозов.

Характеристика возбудителя. Представители рода *Candida* представляют собой дрожжевые грибы, родственные *Ascomycetes*. Род *Candida* включает разнообразные виды (*Candida spp.*), среди которых основное значение, как возбудители кандидоза, имеют: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida dubliniensis*, *Candida lusitaniae*, *Candida krusei*. *Candida spp.* представляют собой компонент микрофлоры, симбионтной для человека. У 10–25% населения, не имеющих клинических признаков грибкового поражения, *Candida spp.* непостоянно выявляются в полости рта, у 65–80% – в содержимом кишечника. *Candida spp.* обнаруживаются в детрите гастродуоденальных язв примерно в 17% случаев.

По современным представлениям, в нормальных условиях основным «местом обитания» *Candida spp.* в организме человека является кишечник. В

микробной популяции кишечника доля этих грибов ничтожно мала. Рост колоний *Candida* spp. в организме человека отчасти регулируется благодаря работе звеньев иммунитета. Главное место в этом процессе занимают звенья неспецифического иммунитета – мононуклеарные фагоциты (моноциты/макрофаги) и полиморфноядерные лейкоциты [39].

Весьма важная роль в ограничении роста популяции *Candida* принадлежит также бактериям – кишечным симбионтам. Нормальная микрофлора, населяющая просвет желудочно–кишечного тракта, вырабатывает вещества с антибактериальной активностью (в частности, бактериокины и короткоцепочечные жирные кислоты), которые предотвращают внедрение патогенных микроорганизмов и избыточный рост, развитие условно–патогенной флоры. Кишечные палочки, энтерококки, бифидобактерии и лактобациллы обладают наиболее выраженными антагонистическими свойствами.

Термин «кандидоз» подразумевает патологический процесс, основу которого составляет избыточный рост *Candida* первично в желудочно–кишечном тракте и вторично – в других областях (на слизистой оболочке гениталий, бронхов, в паренхиматозных органах) [35,36,38].

Факторы вирулентности *Candida*. Грибы рода *Candida* обладают адгезивностью к эпителиальным клеткам. Прикрепление к слизистой оболочке является одним из условий для дальнейшей инвазии микроорганизма в подлежащие ткани. Способность к адгезии у представителей различных видов *Candida* значительно различается; наиболее высока эта способность у *C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.dublinskiensis*; наименьшая – у *Candida glabrata*, *Candida krusei*. В качестве защитного барьера, препятствующего прикреплению микроба к слизистой оболочке, важную роль играет муцин – гликопротеин клеточной стенки эпителиальных клеток. Факторы агрессии этих микроорганизмов включают протеазы и гликозидазы, способные интенсивно расщеплять муцин.

Как фактор вирулентности также рассматривают способность к быстрому образованию нитей псевдомицелия; эта особенность в наибольшей степени выражена у *C. albicans*.

Вирулентность микроорганизмов подвержена внутривидовой изменчивости, в зависимости от генотипа .

Факторы риска развития кандидоза. В качестве общих факторов, предрасполагающих к развитию кандидоза органов пищеварения и последующей лимфо–гематогенной диссеминацией грибков, как и в случаях других оппортунистических инфекций, выступают состояния, при которых наблюдается недостаточность иммунной защиты организма. Они включают:

1) Физиологические иммунодефициты (период новорожденности и ранний детский период, сенильный иммунодефицит, беременность, стрессовые состояния).

2) Врожденные иммунодефициты (синдром Ди– Джорджи, Незелофа, Шедиака–Хигаши и др.).

3) Инфекция вирусом иммунодефицита человека в терминальной стадии (синдром приобретенного иммунодефицита). Микозы составляют 70% в структуре клинических проявлений ВИЧ–инфекции.

4) Онкологические заболевания (включая гемобластозы); химиотерапия злокачественных опухолей, сопровождающаяся тяжелой гранулоцитопенией ( $<1 \times 10^9$  гранулоцитов в л). Развитие кандидоза на фоне противоопухолевой терапии обычно связывают с подавлением функций иммунной системы, наблюдающимся как нежелательный эффект лечения.

В то же время существуют предположения, что цитостатики и лучевая терапия угнетают защитные функции эпителиального покрова кишечника и способствуют транслокации *Candida* в другие органы. При проведении химиотерапии возрастает процент грибковых микроорганизмов, адгезированных к энтероцитам.

5) Аутоиммунные и аллергические заболевания, в особенности при назначении глюкокортикостероидов.

6) Трансплантация органов (применение иммунодепрессантов в посттрансплантационном периоде). Более половины больных, которым планируется проведение трансплантации костного мозга, еще до трансплантации имеют картину системного кандидоза.

7) Эндокринопатии (декомпенсированный сахарный диабет, аутоиммунный полигландулярный синдром).

8) Другие заболевания и состояния (шоковые состояния, анемия, гепатит, цирроз печени, хронические инфекции, синдром мальабсорбции и др.). При патологических состояниях, сопровождающихся снижением кровоснабжения кишечника, повышается транслокация грибов в другие ткани. Нарушение переваривания и всасывания сопровождается избыточным ростом микроорганизмов в просвете кишечника.

9) Антибиотикотерапия (обычно – длительное применение препаратов широкого спектра действия). Введение антибактериальных препаратов может приводить к нарушению равновесия в микробном биоценозе кишечника, вследствие чего возможно избыточное развитие кандидозной популяции в кишечнике. Назначение туберкулостатических препаратов в течение 3–4 мес. сопровождается развитием кандидоза кишечника в 58–62% случаев.

Риск развития идиопатической антибиотикоассоциированной диареи зависит от дозы введенного антибиотика; это заболевание обычно протекает без повышения температуры тела и лейкоцитоза в крови и при отсутствии лабораторных признаков инфекции *Clostridium difficile*. Полагают, что примерно в трети случаев развитие идиопатической антибиотикоассоциированной диареи обусловлено именно кандидозом кишечника.

10) Несбалансированное питание (дефицит в рационе белков, витаминов). В эксперименте на животных показано, что недостаточное поступление белка в организм сопровождается снижением фагоцитарной и бактерицидной

активности макрофагального звена, незавершенным фагоцитозом и повышением проницаемости кишечного барьера для *Candida albicans*.

По данным аутопсий кандидоз 12–перстной, тонкой и толстой кишки обнаруживается примерно у 3% погибших пациентов (учитывались только макроскопические изменения). При этом половина случаев приходится на долю пациентов, получавших химиотерапию по поводу злокачественных новообразований.

Патогенез развития кандидоза кишечника. Исследования последних лет в большой степени прояснили закономерности взаимодействия грибов *Candida* с организмом хозяина. По современным представлениям, можно выделить два принципиально различных механизма патогенеза кандидоза органов пищеварения: инвазивный и неинвазивный кандидоз.

Инвазивный кандидоз обусловлен внедрением нитчатой формы гриба *Candida* в ткани. Первым этапом кандидоза, как инфекционного процесса, служит адгезия к эпителиоцитам, затем происходит инвазия в эпителиальный слой, проникновение за пределы базальной мембраны.

Этим проявлениям микробной агрессии макроскопически соответствуют эрозивно–язвенные дефекты стенки кишечника различного размера и формы, трещины, мембранные наложения (сходные с таковыми при псевдомембранозном колите), полиповидные или сегментарные циркулярные образования. При прогрессирующей инвазии возможно развитие лимфо–гематогенной диссеминации грибов (системный кандидоз с поражением слизистых оболочек других органов; генерализованный кандидоз с поражением висцеральных органов). В экспериментальной модели на животных, перорально инфицированных *C. albicans* в условиях иммуносупрессии, показано первоначальное возникновение эрозий и язв слизистой оболочки в подвздошной кишке, колонизация лимфоидных образований кишечника, их некроз и дальнейшая диссеминация. Отсутствие макроскопических изменений, по всей видимости, не должно рассматриваться, как свидетельство против инвазивного кандидоза.

При диссеминированных формах кандидоза в лимфатических узлах и протоках обнаруживаются многоядерные гигантские клетки, содержащие грибы, что, вероятно, отражает феномен незавершенного фагоцитоза.

Инвазивный кандидоз чаще наблюдается в органах, выстланных многослойным плоским эпителием (полость рта, пищевод), и реже – цилиндрическим эпителием (желудок, кишечник), что, вероятно, связано с особенностями местной иммунной защиты.

Неинвазивный кандидоз не сопровождается превращением грибка в нитчатую форму; наблюдается избыточный рост его колоний в просвете полого органа – кишечника. Предполагается, что важное патогенетическое значение при этом имеет нарушение полостного и пристеночного пищеварения, проникновение в системный кровоток микробных компонентов и метаболитов, развитие в той или иной степени выраженной системной иммунно–воспалительной реакции.

На основании всего сказанного выше следует еще раз подчеркнуть, что кандидоз слизистых внекишечной локализации или генерализованный кандидоз с поражением паренхиматозных органов служит проявлением транслокации грибков из просвета кишечника, где представлена основная масса этих сапрофитных грибков. Кандидоз внекишечной локализации (например, полости рта или гениталий) служит проявлением системного кандидоза, «берущего свое начало» из кишечника.

Ниже приводится классификация кандидоза органов пищеварения:

1. Оро–фарингеальный кандидоз (хейлит, гингивит, заеды, глоссит, стоматит, фарингит).
2. Кандидоз пищевода (осложнения – кровотечение, стриктура).
3. Кандидоз желудка:
  - диффузный (специфический эрозивно–фибринозный гастрит);
  - фокальный (вторичный для язвы желудка).
4. Кандидоз кишечника:
  - инвазивный диффузный;

- фокальный (вторичный для язвы 12-перстной кишки, при неспецифическом язвенном колите);
- неинвазивный (избыточный рост *Candida* в просвете кишечника).

#### 5. Ано-ректальный кандидоз:

- инвазивный кандидоз прямой кишки,
- перианальный кандидозный дерматит.

Ниже охарактеризованы основные проявления кандидозного поражения кишечника, который, как уже было сказано выше, является основой для развития системных проявлений.

Клиническая картина кандидоза кишечника. Особенности течения кандидоза кишечника недостаточно четко очерчены, недостаточно хорошо изучены и мало знакомы большей части практикующих врачей. Характерно, что у погибших от разных причин больных, у которых при аутопсии были обнаружены макроскопические изменения кишечника, соответствующие инвазивному кандидозу, при жизни, как правило, отмечалась весьма скудная симптоматика со стороны желудочно-кишечного тракта, а эндоскопический диагноз часто был ошибочным. Нередко при обнаружении единичных изъязвлений кишечной стенки врач затрудняется в их трактовке, а по результатам морфологического исследования дается заключение о неспецифических воспалительных изменениях в краях язвенных дефектов, тогда как целенаправленное микологическое исследование не проводится. Клинические проявления кандидоза кишечника могут быть различными в зависимости от уровня поражения.

При диффузном инвазивном кандидозе кишечника имеются проявления энтероколита: жалобы на боли в животе спастического характера, метеоризм, наличие патологических примесей в стуле (крови и слизи), обычно имеются признаки системного кандидоза (поражение слизистых оболочек полости рта, гениталий). При эндоскопическом исследовании выявляются изменения по типу фибринозно-язвенного колита.

При инвазивном фокальном кандидозе кишечника проявления заболевания могут напоминать упорное, резистентное к традиционной терапии, течение язвенной болезни 12–перстной кишки или неспецифического язвенного колита.

При неинвазивном кандидозе кишечника пациенты предъявляют жалобы на неоформленный стул, метеоризм, дискомфорт в животе, с положительной клинико–лабораторной динамикой при лечении антимикотическими препаратами.

При инвазивном кандидозе прямой кишки могут отмечаться симптомы проктита (боли, тенезмы, патологические примеси в кале). В ряде случаев этому сопутствуют явления перианального кандидо–дерматита.

Кандидоз кишечника нередко сопровождается субфебрильной лихорадкой .

Осложнения. В качестве осложнений кандидоза кишечника возможно развитие кишечной перфорации, пенетрации язв в окружающие органы, кровотечения, генерализации с поражением паренхима тозных органов, развитием грибкового сепсиса.

Поражение паренхиматозных органов (печень, желчный пузырь, поджелудочная железа и др.) весьма часто сопутствует глубокой нейтропении (менее 500 нейтрофилов в мм<sup>3</sup> крови) и наблюдается в терминальной фазе СПИДа .

Летальность при инвазивном кандидозе достигает 25–55%. Для некоторых категорий больных (реципиенты трансплантатов, пациенты с острым лейкозом) инвазивные микозы являются основной причиной летального исхода.

Диагностика. Вопрос о диагностике кандидоза кишечника и определении показаний к противогрибковой терапии исключительно важен.

В распознавании кандидоза слизистых оболочек необходимо проводить различие между физиологическим «кандидоносительством» и инфекционным процессом, вызванным этим грибом.

Для диагностики кандидоза абсолютно информативно обнаружение *Candida* в стерильных жидкостях (спинно–мозговой, лаважной, перитонеальной и др.) или обнаружение грибов в тканях (нередко обнаруживаются изменения по типу гранулем с некрозом).

Для повышения чувствительности культуральных и морфологических методов диагностики кандидоза рекомендуется исследовать несколько биоптатов слизистой оболочки.

Биопсированную ткань собирают в 2 стерильные чашки Петри или стерильные баночки с завинчивающейся крышкой; одну пробу заливают 10% раствором формальдегида и направляют для гистологического исследования, вторую используют для микологического исследования.

Материал транспортируют в микробиологическую лабораторию, защищая от прямых солнечных лучей. Необходимо, чтобы материал был доставлен на микологическое исследование не позднее 1 ч после взятия при хранении в условиях комнатной температуры или не более чем через 3 ч при хранении при +4°C.

Микроскопическое исследование необходимо проводить в нативных и окрашенных препаратах.

ШИК–реакция (обработка хромовой кислотой) или ее модификация – окраска по Гридли – позволяют выявить возбудителя в ткани или мазке за счет окрашивания полисахаридных компонентов клеточной стенки; для подавления окраски окружающих тканей применяется «контрокраска» световым зеленым, метаниловым желтым, и т.п.

В данном случае обнаруживаются только инвазирующие клетки грибов, в то же время невозможно судить о реакции со стороны окружающих тканей. Поэтому необходимо также оценивать препараты, «докрашенные» гематоксилином и эозином.

Псевдомицелий *Candida* также можно выявить в мазке–отпечатке слизистой оболочки или мазке–отпечатке из дна язвы (окраска по Романовскому–Гимзе).

На поверхности плотной питательной среды в чашке Петри делают отпечаток исследуемым кусочком ткани, затем производят рассев петлей. Этот же кусочек ткани помещают в 50 мл жидкой питательной среды (среда Сабуро, сусло) и инкубируют при +37°C в течение 5 дней.

Широко применяются методы быстрой идентификации *C. albicans*. Этот вид *Candida* способен образовывать ростковые трубки и короткие нити псевдомицелия в течение 2–4 часов при +37°C на сыворотке крови, яичном белке и др. подобных средах. Для вида *C. albicans* этот феномен характерен в 90% случаев.

Для эффективного лечения необходимо стремиться к определению видовой принадлежности грибков *Candida* и определению индивидуальной чувствительности штамма к антимикотическим средствам; некоторые штаммы *Candida lusitaniae* устойчивы к амфотерицину, *Candida krusei* и *Candida glabrata* – к флуконазолу.

Обнаружение *Candida* в крови позволяет поставить диагноз генерализованного кандидоза только в сочетании с соответствующей клинической симптоматикой (особенно информативно повторное обнаружение *Candida* в крови). Следует помнить о том, что у 70–80% больных, реально страдающих генерализованным кандидозом, выявить грибы при посеве крови не удастся.

Значение серологических методов состоит, главным образом, в выявлении больных с вероятными инвазивными микозами. Ложноположительные результаты серологических проб возможны при миконосительстве и у здоровых людей, сенсibilизированных антигенами грибов; ложноотрицательные пробы могут наблюдаться при иммунодефиците.

Предложены оригинальные процедуры обнаружения антигенов и антител некоторых метаболитов клеток грибов; созданы специальные диагностические наборы. В качестве примера можно привести *Pastorex Candida*, – для определения в реакции «латекс–агглютинации»

повторяющихся олигоманнозных эпитопов антигенных структур, экспрессирующихся на большом числе макромолекул гриба.

Набор Platelia Candida может использоваться для определения антигена-маннана Candida, например, в сыворотке крови пациента с циркулирующей микроорга́низма. С помощью первого набора порог определения антигенных структур равен 2,5 нг/мл, с помощью второго в связке с методом порог определения – 0,5 нг/мл.

В диагностике неинвазивного кишечного кандидоза, при котором отсутствует тканевой биопсийный материал для микологического исследования, в качестве стандарта диагностики предлагается использовать следующие критерии: рост свыше 1000 КОЕ/г Candida spp. при посеве кишечного содержимого, взятого в стерильных условиях, в сочетании с явлениями кишечной диспепсии и положительной клинико-лабораторной динамикой при лечении антимикотическими препаратами .

К сожалению, правильный забор кишечного содержимого для культурального исследования технически сложен; широко распространенная в нашей стране методика «посева кала на дисбактериоз» не может служить опорой в оценке реального состава микрофлоры кишечника .

В диагностике любой формы кандидоза органов пищеварения важно учитывать наличие у пациента предрасполагающих факторов риска. «Случайное» выявление кандидоза должно послужить стимулом к поиску такого фонового фактора. Важно помнить, что кандидоз может выступать в качестве ранней манифестации общих заболеваний, сопровождающихся развитием иммунодефицита.

Учитывая вышесказанное, вероятно, было бы не совсем корректно формулировать диагноз кратко, как «Кандидоз», не указывая при этом фонового состояния.

Дифференциальный диагноз инвазивного кишечного кандидоза (при обнаружении макроскопических изменений кишечника) необходимо проводить с хроническими воспалительными заболеваниями кишечника,

антибиотикоассоциированной диареей, обусловленной инфекцией *C. difficile*, злокачественным поражением, ишемическим колитом.

Неинвазивную форму кандидоза следует дифференцировать с широким спектром энтеритов и колитов другой этиологии. Косвенным свидетельством в пользу наличия кандидоза кишечника могут выступать внекишечные системные проявления кандидоза.

Лечение. Следует еще раз подчеркнуть, что одно лишь обнаружение грибов рода *Candida* при бактериологическом анализе испражнений (по принятой методике в России), независимо от наличия или отсутствия симптомов кишечной диспепсии, не может служить показанием для назначения пациенту антимикотических средств. Для лечения кандидоза кишечника необходимо назначение препаратов, неадсорбирующихся из просвета кишечника.

Сегодня существуют разнообразные антимикотические средства. Такие препараты, как амфотерицин В, итраконазол, кетоконазол, флуконазол, обладают системным действием, могут применяться местно, перорально и внутривенно. При назначении внутрь эти препараты практически полностью адсорбируются из верхних отделов желудочно–кишечного тракта и не достигают уровня подвздошной кишки, где сосредоточена основная популяция грибов. Кроме того, применение «системных» противогрибковых препаратов нередко сопровождается побочными явлениями, в частности, развитием токсического гепатита.

К практически неадсорбирующимся антимикотическим средствам относятся леворин, нистатин и натамицин (Пимафуцин). Назначение леворина и нистатина с достаточно высокой частотой сопровождается развитием побочных эффектов (диспепсические явления, аллергия, токсический гепатит).

Пимафуцин (натамицин) – противогрибковый полиеновый антибиотик широкого спектра. Обладает фунгицидным потенциалом. Пимафуцин связывает стеролы клеточных мембран, нарушая их целостность и функции,

что приводит к гибели микроорганизмов. К натамицину чувствительно большинство патогенных дрожжевых грибов, в наибольшей степени – *Candida albicans*.

Пимафуцин обладает более высокой эффективностью по сравнению с нистатином. Случаев резистентности к натамицину в клинической практике не встречалось; при многократном применении этого препарата минимальная подавляющая концентрация его в отношении *C. albicans* не меняется. Пимафуцин в таблетках действует только в просвете кишечника, практически не всасывается из желудочно–кишечного тракта.

При применении таблеток в первые дни лечения возможны диспепсические явления – тошнота и диарея, которые не требуют отмены препарата и самостоятельно разрешаются в ходе лечения. Единственным противопоказанием к назначению Пимафуцина является повышенная чувствительность к компонентам препарата. Пимафуцин можно назначать в периоды беременности и лактации, а также новорожденным детям.

Для лечения кишечного кандидоза необходимо проведение курса лечения невсасываемыми противогрибковыми препаратами в течение 7–10 дней. Нистатин назначают по 250000 ЕД 6–8 раз в сутки (суточная доза – до 3 млн ЕД) в течение 14 дней. Его назначают по 100 мг (1 таблетке) 2–4 раза в день в течение 7–10 дней .

Опираясь на изложенные выше положения и клинический опыт, приходится признать, что тактика лечения кандидоза слизистых оболочек внекишечной локализации только местными противогрибковыми средствами или препаратами системного действия, всасываемыми желудочно–кишечного тракта, по своей сути ошибочна.

Поскольку источником лимфо–гематогенного распространения вирулентных штаммов *Candida*, вызывающих системный кандидоз, является кишечник, – без подавления роста грибов в его просвете противогрибковая терапия оказывается неэффективной или наблюдается лишь кратковременный нестойкий эффект.

При системном кандидозе доза нистатина может быть повышена до 4–6 млн ЕД/сут, одновременно назначается местно действующее противогрибковое средство. При системном кандидозе Пимафуцин используется в той же дозе при одновременном назначении местно действующего противогрибкового средства. В тяжелых случаях к комплексной терапии добавляются препараты с системным действием .

Особенно важны своевременное распознавание и терапия кишечного кандидоза, как профилактика системного и генерализованного кандидоза у больных групп риска, к которым относятся прежде всего пациенты, получающие противоопухолевую лучевую и/или химиотерапию, противотуберкулезные препараты, пациенты, готовящиеся к плановым операциям на органах брюшной полости.

В данных ситуациях наиболее предпочтительно назначение невсасывающихся противогрибковых препаратов, поскольку их длительный и повторный прием существенно не влияет на фармакодинамику других препаратов.

Основным критерием эффективности терапии является не получение отрицательного результата посева на грибы, а прежде всего исчезновение основных проявлений болезни, нормализация количества грибов по данным микологического исследования (при возможности адекватного проведения посева кишечного содержимого). Для достижения эффекта нередко приходится прибегать к повторным курсам лечения .

В данной статье ставилась цель расширить представления практических врачей о гибкости взаимодействия организма человека с симбионтной микрофлорой, о патогенном потенциале, которым обладает безобидный кишечный комменсал – *Candida*.

Перед интернистами и специалистами по медицинской микологии стоят актуальные задачи отчетливого определения распространенности и клинического значения грибковых инфекций в клинической практике,

разработки алгоритма диагностики и показаний к лечению кандидоза кишечника[40].

## 2.2. Особенности эпидемиологии грибковых инфекций

В настоящее время, особенно в связи с ростом заболеваний, сопровождающихся различными иммунодефицитными состояниями и нейтропениями, возрос интерес ученых всего мира к поражениям различных органов и тканей организма человека патогенными и условно-патогенными грибковыми инфекциями. Этот интерес стимулирует изучение микробиологических свойств грибов, макробиологических реакций на грибковую инвазию, создание новых методов диагностики микозов, а также усовершенствование схем и форм применения имеющихся и поиск новых антимикотических лекарственных препаратов. Наиболее частыми возбудителями грибковых инфекций рода *Candida*. По данным ВОЗ, пятая часть населения Земли страдает или хоть раз перенесла различные формы кандидоза. Грибы рода *Candida* из довольно редко встречающихся патогенов стали одним из основных оппортунистических микроорганизмов, вызывающих внутрибольничные инфекции. Они находятся на 4 месте по частоте среди выделяемых из крови микроорганизмов и на первом по смертности от внутрибольничных септических состояний в США.

На долю микозов приходится от 37-42% от всех болезней кожи и ногтей. Микозы стоп по частоте приближаются к простудным заболеваниям. У 18-40% больных обезображивающие изменения ногтей вызывают возбудители микозов стоп.

На сегодня известно около 400 болезнетворных грибов – возбудителей зарегистрированных случаев микозов. В последнее время список болезнетворных грибов пополняется, в среднем, на 10 видов в год.

Существующие классификации возбудителей, как правило, отражают их таксономическое положение или особенности морфологии (например,

дрожжевые, плесневые и диморфные), клинические или патологические характеристики соответствующих инфекций (например, возбудители поверхностных и глубоких микозов), или особенности эпидемиологии (например, возбудители тропических и эндемических микозов, оппортунистических инфекций). По мере накопления знаний о болезнетворных грибах классификации усложняются, а иногда и пересматриваются.

Наиболее целесообразным подходом к классификации болезнетворных грибов представляется их распределение в зависимости от уровня патогенности/биологической угрозы, которую представляет каждый болезнетворный гриб. В России возбудителей инфекционных заболеваний классифицируют по группам патогенности (I-IV по убыванию), в зависимости от опасности, которую они представляют не только для человека, но и общества. Большинство возбудителей микозов относится к IV группе патогенности (оппортунистические инфекции), возбудители эндемических микозов и криптококкоза – к III группе. За рубежом используют так называемые уровни биологической защиты (BSL – biological safety levels), характеризующие возбудителей по степени риска, который представляет контакт с ними, в частности, для сотрудников микробиологической лаборатории.

Все известные возбудители микозов относятся к 1-3 группам BSL. К 1 группе BSL отнесены условно-патогенные грибы, вызывающие глубокие микозы случайно, как правило, только на фоне иммунодефицита или критического состояния пациента. Сюда же входят случайные возбудители недерматофитных онихомикозов.

Ко 2 группе BSL относятся условно-патогенные грибы, лучше приспособленные к обитанию в среде макроорганизма. Случаи обусловленных ими глубоких микозов встречаются регулярно. Во 2 группу также входят основные возбудители подкожных микозов. Сюда же причислены дерматофиты и другие облигатно патогенные возбудители поверхностных микозов.

К 3 группе BSL отнесены инфекционные формы диморфных возбудителей эндемических микозов, криптококкоза и редкие нейротропные возбудители феогифомикоза.

Для диагностики микозов используют микроскопию патологического или биопсийного материала, посев на среды Сабуро, мясопептонную с сердечно-мозговой вытяжкой и их модификации. При подозрении на глубокие и диссеминированные микозы используются иммунологическая и молекулярная диагностики. Хроматография как метод диагностики в настоящее время ограничивается несколькими микозами, как правило – кандидозом. Применение ПЦР в настоящее время также ограничено. Имеющиеся методики страдают от недостатка чувствительности (глубокие микозы, дерматофитии) или специфичности (контаминация условно-патогенными грибами). Вместе с тем генодиагностика представляется наиболее перспективным методом диагностики микозов, в ближайшее время способным заменить классические микробиологические методы.

В СНГ общепринятой классификацией дерматомикозов долгие годы являлась классификация, предложенная Н. Д. Шеклаковым в 1976 г. В настоящее время она полностью пересмотрена и составлена в соответствии с МКБ-10. В основу классификации положен принцип локализации процесса; она удобна с практической точки зрения, однако не учитывает этиологических особенностей в некоторых локализациях. Варианты этиологии определяют эпидемиологические характеристики в соответствующих мероприятиях, а также особенности лабораторной диагностики. Разумным и практически приемлемым компромиссом является использование классификации МКБ с уточнением, при необходимости этиологии возбудителя или его эквивалента. Например: *tinea corporis* В 35-4, вызванном *Tr. Rubrum* (син. Руброфития гл. к.) Или: дерматофития в/ч головы (В 35-0 фавус/ микроспория/ трихофития)[41].

### 2.3 Кристаллографический метод идентификации микроорганизмов

Существующие в настоящее время бактериологические методы идентификации холерных вибрионов достаточно трудоемки, продолжительны, требуют значительного расхода питательных сред и реактивов, необходимых для постановки дифференцирующих биохимических тестов [1,2]. Весьма важным является также своевременное и достоверное тестирование вирулентности культур *Vibrio cholerae*. Поэтому до сих пор не прекращаются поиски новых более эффективных подходов к распознаванию данных патогенов и определению их биологических свойств. В этом аспекте весьма перспективным представляется использование кристаллографического метода идентификации микроорганизмов.

Кристаллографический метод является принципиально новым методом идентификации микроорганизмов, отличающимся доступностью и высокой воспроизводимостью. Ранее установлено наличие специфических особенностей кристаллограмм *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida spp.*, *Bacillus subtilis*, *Helicobacter pylori* и других микроорганизмов. Использование данного метода позволяет практически с помощью одного теста достоверно идентифицировать перечисленные микроорганизмы, тогда как при традиционной идентификации необходима постановка от 5 до 20 и более тестов.

Целью настоящего исследования явилось изучение кристаллогенных свойств холерных вибрионов и определение возможности применения кристаллографического метода для их идентификации и дифференциации.

Материал и методы. Материалом для исследований послужили 80 культур *V. cholerae*, представленных эталонными штаммами агглютинирующих (АГ) *V. cholerae* (7 штаммов), АГ *V. cholerae*, выделенных от людей (44) и неагглютинирующими (НАГ) *V. cholerae* (29), находящиеся в коллекции Центра профилактики карантинных и особо опасных инфекций МЗ РУз. Изучение их

биологических свойств и идентификацию проводили с помощью методов, представленных в Методических указаниях.

Изучение кристаллогенных свойств культур *V. cholerae* выполняли следующим образом: из суточной культуры, выращенной на щелочном скошенном агаре, готовили 5 миллиардную микробную взвесь в физиологическом растворе. Затем на дно пластиковой чашки Петри помещали каплю микробной взвеси и равномерно распределяли ее кончиком пипетки в виде овала размером примерно 1,5x1.0 см. Чашку помещали в эксикатор с силикагелем, закрывали эксикатор и инкубировали его в термостате при 37 °С в течение 18-24 часов до полного высыхания капель и образования на их месте кристаллического налета (кристаллограмм а). Полученные кристаллограмм изучали визуально и с помощью стереоскопического микроскопа затем фотографировали и переносили в банк кристаллограмм в компьютере. Для контроля использовали кристаллограммы условно патогенных микроорганизмов (*E. coli*, *Ps.aeruginosa*), хранящихся в коллекции бактериологической лаборатории РСЦХ им. ак. В. Вахидова.

Результаты и обсуждение. Исследование полученных кристаллограмм *V. cholerae* показало, что они обладают специфическими особенностями, позволяющими дифференцировать их с другими микроорганизмами (*E. coli*, *Ps.aeruginosa*) (рис.). Основными характерными элементами кристаллограммам холерных вибрионов являются кристаллические дендриты в виде изогнутых параллельно расположенных веточек, а также веточек, расходящихся крестообразно от центров кристаллизации. Последние представляют собой кристаллы правильной четырехугольной формы, с заостренными или закругленными углами. От основных дендритов перпендикулярно отходят более мелкие отростки 2-го порядка.

Представляло определенный интерес сравнение кристаллограмм холерных вибрионов, относящихся к АГ и НАГ группам. Как видно из рисунка, кристаллограммы этих двух групп *V. cholerae* имеют существенные отличия. Они, прежде всего, касаются центров кристаллизации. У НАГов их как правило

больше чем у АГов и они имеют закругленные углы, тогда как у АГов -углы кристаллов заостренные.

Кристаллограммы холерных вибрионов, при точном соблюдении методики, характеризуются высокой воспроизводимостью. На их получение тратится не более 18-24 часов, тогда как при традиционных методах до 3-х суток. Реактивы, применяемые при рутинных методах идентификации дорогостоящи и дефицитны, тогда как физиологический раствор доступен и дешев.

Дальнейшее совершенствование метода, изучение механизмов формирования кристаллов и влияния на этот процесс различных физических и химических факторов, составление баз данных кристаллограмм типичных культур *V. cholerae* и различных их вариантов, создание экспертной системы их распознавания значительно расширят возможности в деле систематизации и идентификации этих микроорганизмов. Помимо этого, возможность использования для анализа электронных копий кристаллических изображений и безопасная пересылка их по электронно-информационным каналам в региональные центры мониторинга, помогут решить проблему быстрой и достоверной идентификации карантинных и особо-опасных микроорганизмов и подтверждения ее результатов, независимо от нахождения места первичного выделения подозрительной культуры.

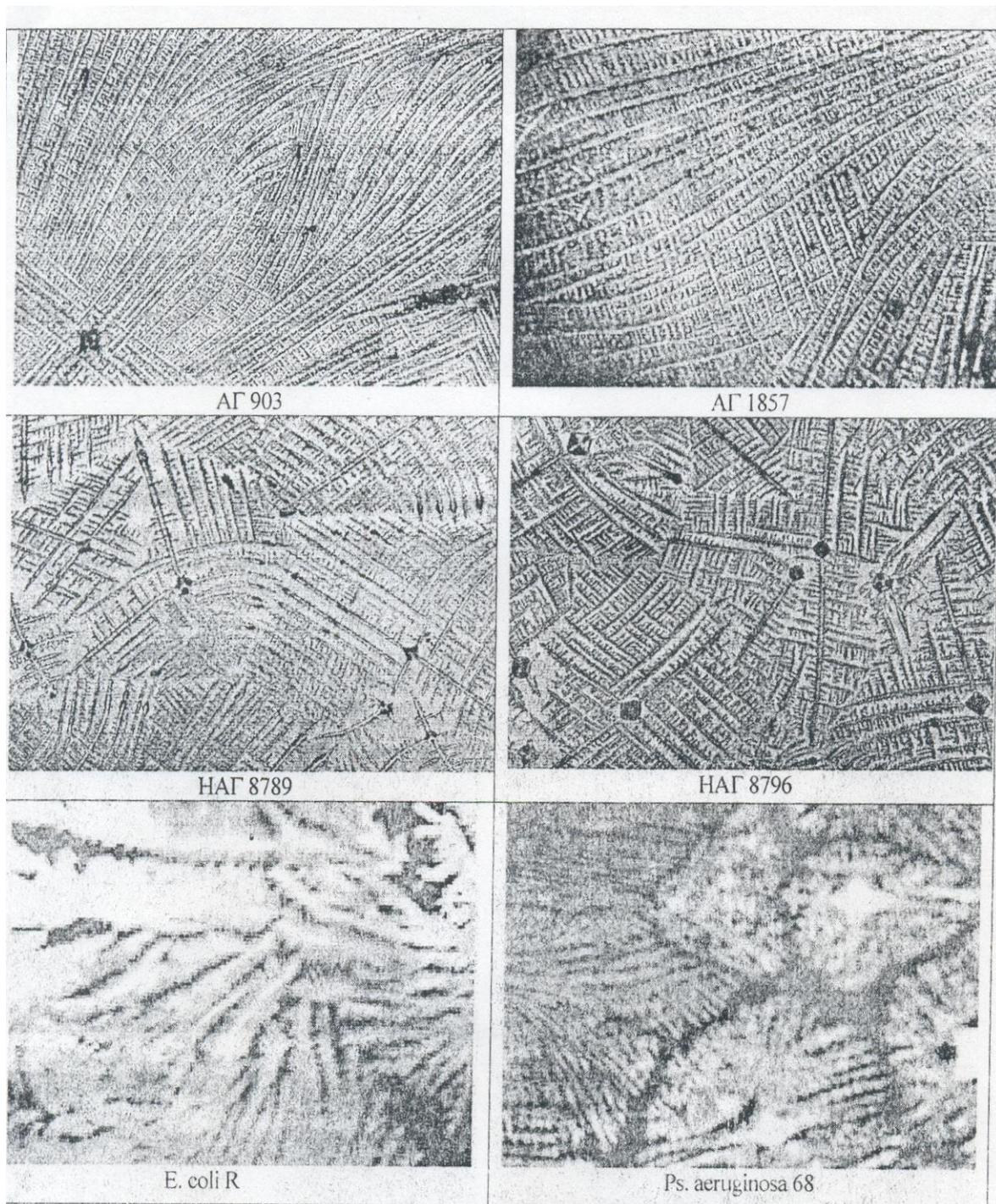


Рис. 8. Образцы кристаллограмм *Vibrio cholerae* (АГ и НАГ), *E. coli* R и *Ps. aeruginosa* 68

Таким образом, установлена принципиальная возможность использования кристаллографического метода для идентификации холерных вибрионов и дифференциации их АГ и НАГ вариантов.

Выводы. *V.cholerae* характеризуются специфическими кристаллографическими свойствами, что позволяет использовать кристаллографический метод для их идентификации и дифференциации АГ' и НАГ вариантов. Применение кристаллографического метода дает возможность существенно ускорить и упростить идентификацию и дифференциацию холерных вибрионов[42].

## ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ II

Дано описание вида микроорганизмов - грибов рода *Candida*. В связи с ростом числа заболеваний, ведущих к поражениям различных органов и тканей организма человека патогенными и условно-патогенными грибковыми инфекциями, большое внимание уделено освещению эпидемиологии грибковых инфекций. В качестве основного приводится описание кристаллографического метода идентификации микроорганизмов, основанного на сравнении кристаллограмм различных родов грибов.

## ГЛАВА III

### ПРОГРАММНАЯ РЕАЛИЗАЦИЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ СРЕДСТВАМИ DELPHI

#### 3.1. Описание среды Delphi

Среда Delphi - это сложный механизм, обеспечивающий высокоэффективную работу программиста. Визуально она реализуется несколькими одновременно раскрытыми на экране окнами. Окна могут перемещаться по экрану, частично или полностью перекрывая друг друга.

Запуск Delphi позволяет открыть шесть наиболее важных окон Delphi: главное окно 1, окно Древа объектов (Object Tree View) 2, окно Инспектора объектов 3, окно браузера 4, окно формы 5 и окно кода программы 6. Чтобы упорядочить окна так, необходимо вручную изменять их положение и размеры, т.к. обычно окно кода программы почти полностью перекрыто окном формы.

Главное окно. Главное окно осуществляет основные функции управления проектом создаваемой программы. Это окно всегда присутствует на экране и занимает его самую верхнюю часть. С одной стороны, оно несет в себе элементы, которые всегда должны быть под рукой у программиста, с другой - окно не должно отнимать у остальных окон Delphi значительного пространства экрана. Минимизация главного окна приводит к исчезновению с экрана других окон Delphi (Эти окна появятся, как только будут восстановлены размеры главного окна.), а его закрытие означает окончание работы программиста с системой программирования. В главном окне располагается главное меню Delphi, набор пиктографических командных кнопок и палитра компонентов. Главное меню (Помимо главного меню в Delphi широко используется система вспомогательных меню, доступ к которым осуществляется правой кнопкой мыши.) содержит все необходимые средства для управления проектом. Все

опции главного меню представляют собой опции-заголовки, открывающие доступ к выпадающим меню второго уровня.

Все элементы главного окна располагаются на специальных панельках, в левой части которых имеются кнопки управления позволяющие с помощью мыши перетаскивать панельки с помещенными на них элементами. Любую панельку (кроме главного меню) можно убрать из окна (сделать ее невидимой) или “пустить плавать” по экрану в отдельном окне.

Пиктографические кнопки. Пиктографические кнопки открывают быстрый доступ к наиболее важным опциям главного меню. По функциональному признаку они разделены на 7 групп. Каждая группа занимает отдельную панельку.

Настройка окон. С помощью этих инструментов программист может подготовить несколько вариантов расположения остальных окон Delphi и сохранить их в настроечном файле. Обычно выбираются две или три основные конфигурации окон: для режима разработки форм, для кодирования и для отладки. При разработке формы на экране должна быть видна сама форма, Дерево объектов и Инспектор объектов. Настроив соответствующие размеры и положение этих окон, такую настройку можно сохранить под именем, например, Design Desk. Для режима кодирования обычно нужно только максимально распахнутое на экран окно кода с браузером Code Explorer и пристыкованное к нему окно Дерева объектов.

Палитра компонентов. Палитра компонентов - это главное богатство Delphi. Она занимает правую часть главного окна и имеет закладки, обеспечивающие быстрый поиск нужного компонента. Под компонентом понимается некий функциональный элемент, содержащий определенные свойства и размещаемый программистом в окне формы. С помощью компонентов создается каркас программы, во всяком случае - ее видимые на экране внешние проявления: окна, кнопки, списки выбора и т. д. Как и панель кнопок, палитра компонентов может настраиваться. Для этого используется специальный редактор, окно которого появляется на экране после щелчка

правой кнопкой мыши на любой пиктограмме в палитре компонентов и выбора опции `properties` (Свойства).

В стандартном наборе страниц палитры компонентов есть страница `Samples`, содержащая довольно часто используемые компоненты. В то же время ее закладка в палитре закрыта двумя небольшими кнопками “прокрутки” закладок палитры.

Окно формы. Окно формы представляет собой проект Windows-окна будущей программы. Вначале это окно пусто. Точнее, оно содержит стандартные для Windows интерфейсные элементы - кнопки вызова системного меню, максимизации, минимизации и закрытия окна, полосу заголовка и очерчивающую рамку. Вся рабочая область окна обычно заполнена точками координатной сетки, служащей для упорядочения размещаемых на форме компонентов (вы можете убрать эти точки, вызвав с помощью меню `Tools | Environment options` соответствующее окно настроек и убрав флажок в переключателе `Display Grid` на окне, связанном с закладкой `Preferences`). Значительную часть времени программист занят увлекательным занятием, напоминающим работу с набором деталей конструктора `Lego`: он “достаёт” из палитры компонентов, как из коробки с деталями, нужный компонент и размещает его на “наборном поле” окна формы, постепенно заполняя форму интерфейсными элементами. Собственно, именно в этом процессе наполнения формы и заключается главная изюминка визуального программирования. Программист в любой момент времени контролирует содержание окна создаваемой программы и может внести в него необходимые изменения.

Окно дерева объектов. Это окно появилось в версии 6 и предназначено для наглядного отображения связей между отдельными компонентами, размещенными на активной форме или в активном модуле данных. Щелчок по любому компоненту в этом окне активизирует соответствующий компонент в окне формы и отображает свойства этого компонента в окне Инспектора объектов. Двойной щелчок приводит к срабатыванию механизма `Code Insight`, который вставляет в окно кода заготовку для обработчика события `OnClick`.

Наконец, компонент можно “перетащить” в окне и таким образом поменять его владельца (свойство `parent`). В предыдущих версиях такую замену можно было сделать только с помощью межпрограммного буфера обмена `Clipboard`.

Окно инспектора объектов. Любой размещаемый на форме компонент характеризуется некоторым набором параметров: положением, размером, цветом и т. д. Часть этих параметров, например, положение и размеры компонента, программист может изменять, манипулируя с компонентом в окне формы. Для изменения других параметров предназначено окно Инспектора объектов. Это окно содержит две страницы - `Properties` (Свойства) и `Events` (События). Страница `properties` служит для установки нужных свойств компонента, страница `Events` позволяет определить реакцию компонента на то или иное событие. Совокупность свойств отображает видимую сторону компонента: положение относительно левого верхнего угла рабочей области формы, его размеры и цвет, шрифт и текст надписи на нем и т. п.; совокупность событий - его поведенческую сторону: будет ли компонент реагировать на щелчок мыши или на нажатие клавиш, как он будет вести себя в момент появления на экране или в момент изменения размеров окна и т. п.

Каждая страница окна Инспектора объектов представляет собой двухколоночную таблицу, левая колонка которой содержит название свойства или события, а правая - конкретное значение свойства или имя подпрограммы (Если вам еще не знаком этот термин, считайте, что подпрограмма - это просто относительно небольшой фрагмент программы.), обрабатывающей соответствующее событие. Строки таблицы выбираются щелчком мыши и могут отображать простые или сложные свойства.

Окно кода программы. Окно кода предназначено для создания и редактирования текста программы. Этот текст составляется по специальным правилам и описывает алгоритм работы программы. Совокупность правил записи текста называется языком программирования. В системе `Delphi` используется язык программирования `Object Pascal`, который представляет

собой расширенную и усовершенствованную версию широко распространенного языка Паскаль. Несмотря на то, что визуальная среда Delphi берет на себя многие рутинные аспекты программирования, знание языка Object Pascal является неременным условием для любого программиста, работающего в этой среде. Первоначально окно кода содержит минимальный исходный текст, обеспечивающий нормальное функционирование пустой формы в качестве полноценного Windows-окна.

В ходе работы над проектом программист вносит в него необходимые дополнения, чтобы придать программе нужную функциональность. Поскольку для создания даже простых программ вам понадобится создавать и изменять (редактировать) код программы, ниже описываются основные приемы работы с окном кода. Как уже говорилось, окно кода определяет поведенческую сторону окна программы (т. е. окна, появляющегося после начала работы программы), а окно формы - его внешние проявления. Обычно текст кода программы располагается в нескольких строках.

Текстовый редактор версий Delphi 4, 5 и 6 имеет расширенные “интеллектуальные” возможности Code Insight, связанные с контролем текста по мере его ввода.

### 3.2. Назначение программы идентификации бактерий

Данная компьютерная программа предназначена для идентификации бактерий, использует установленные цифровые методы. В таких вычислениях, результаты теста показывают вероятностный процент результата теста в выбранном тесте для связанного бактериального вида. Вы можете использовать другой вид/тест матриц для других целей идентификации, как например, для Enterobacteriaceae, стафилококков, вида Bacteroides, и т.п..

Дополнительно к матрицам обеспеченным этим распределением, программе предусмотрена возможность устанавливать ваши собственные матрицы, чтобы хранить их для последующего использования для идентификации неизвестных бактериальных типов. Процедуры ввода, как для матричного определения так и ввода данных, а также для ввода результатов теста в идентификации неизвестных типов – очень просты в использовании.

Программа дает оценку идентификации для неизвестного вида бактерии в сравнении со всем видом в выбранной матрице, использовавшей цифровые методы.

### 3.3. Работа с программой

Программа является прогоном в двух других режимах, один, который назван режим идентификации и другого режима редактирования. Открывая матрицу для редактирования, появляется возможность отредактировать матрицы, удалить матрицы, экспортировать матрицу, создание полностью новых матриц для выполнения идентификации. Открывая матрицу для цифровой идентификации, автоматически отключаются функции редактирования и возможно только выполнить вычисления идентификации.

Цифровые процедуры идентификации пригодны для обычного использования в клинической лаборатории по простой причине того, что она возможно не должна включить частоту конкретного вида в вычисление. Редкий бактериальный вид в данной среде не должен возникать как первый выбор в вычислении с ограниченным количеством тестов использованных на

клинической лабораторной практике. Рекомендуемое использование цифровых процедур идентификации должно проверять вероятность на наличие обычных биохимических результатов теста для того, чтобы дать врачу-микробиологу руководство к улучшению вероятности результатов теста, добавляя тесты к определенным комбинациям результатов. Цифровая идентификация может быть использована как часть страховой схемы внутреннего качества.

Цифры процента введенные в матрицу могут колебаться от нуля до сотни, вычисления всегда используют 1 процент, и считаются вместо нуля и 99 процентов вместо сотен. Есть две причины этого. Первая очевидна - , для использования результата в умножении или делениях. Другая причина в том , что есть всегда тестирующая ошибка во всех процедурах и не ожидается полное совпадение с идеальным результатом. Тем не менее, 100 процентов совпадение или присутствия определенного результата теста могли сильно противоречить вероятности диагноза. Присутствие такого конфликта в результатах маркировано списком результата с маркой восклицания (!) после имени вида. Блок-схема алгоритма функционирования программы приведена на рис.

Когда загружается матрица для редактирования, есть возможность изменить величины, добавить/удалить тесты, напечатать и вырезать матрицы в буфер обмена. Для того, чтобы редактировать матрицу, достаточно просто щелкнуть мышью в строку или столбец и набирать нужную величину ,вводя ее клавишей enter. Если маркер в матрице после этого перескочил на следующую колонну, то есть автоматический прыжок выбора на следующую ячейку на выборах-окне вводимых данных. Так же, есть возможность перемещать маркер в матрице с четырьмя стрелами на клавиатуре, просто нажимать <enter>, чтобы вводить значения столбцов и строк. Если двойным кликом выделить ячейку то, выделенная ячейка станет пустой, для занесения новой величины.

В редактировании могут быть использованы следующие горячие клавиши:

CTRL+X Добавляется, еще один вход теста (X-column)

CTRL+Y Добавляет еще один бактериальный вход (Y-column)

SHIFT+INS Включает тест в текущей позиции

CTRL+INS Включает бактерию в текущей позиции.

CTRL+A Удаляет правый вход теста (X-column)

CTRL+B Удаляется, нижний вход бактерии (Y-column)

ALT+BKSP Удаляет текущий тест

DELETE Удаляет текущую бактерию

Эти же функции также включены в Меню Матрицы Modify.



Рис. 9 . Блок-схема программы идентификации микроорганизмов.

При выборе цифровой идентификации, появляется окно с готовыми матрицами. После выбора матрицы, программа предлагает ввести данные по бактерии. Данными по бактерии являются результаты реакции с реактивами, то есть если реакция присутствует, то ставится «+», если нет тогда «-». Затем запускается идентификация клавишей «enter». После идентификации, программа выводит результат с несколькими вероятными бактериями, напротив каждой из них указан процент точности идентификации. Если нужно узнать количественные характеристики выбранной рода бактерии, то достаточно нажать на кнопку «Matrix», которая выведет их. Для получения характеристик одной бактерии достаточно нажать на кнопку «Strain». Так же в программе есть возможность изменить входные данные по идентифицируемой бактерии, для этого используется кнопка «Change». Результаты идентификации бактерии можно вывести на печать, для этого нужно зайти в меню результаты и выбрать печать результатов. Работа с программой показана на рис. 10-15

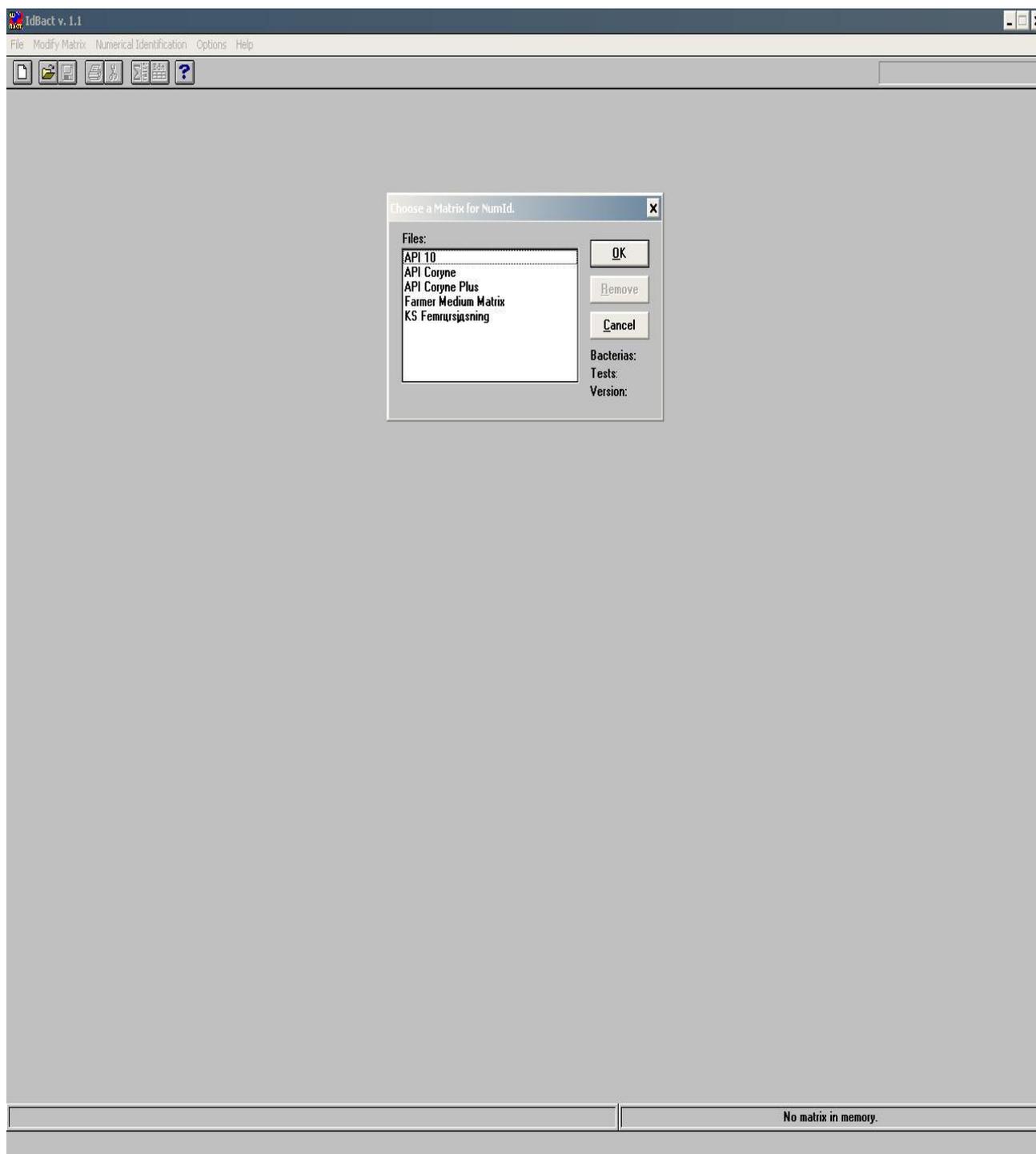


Рис. 10. Выбор матрицы.

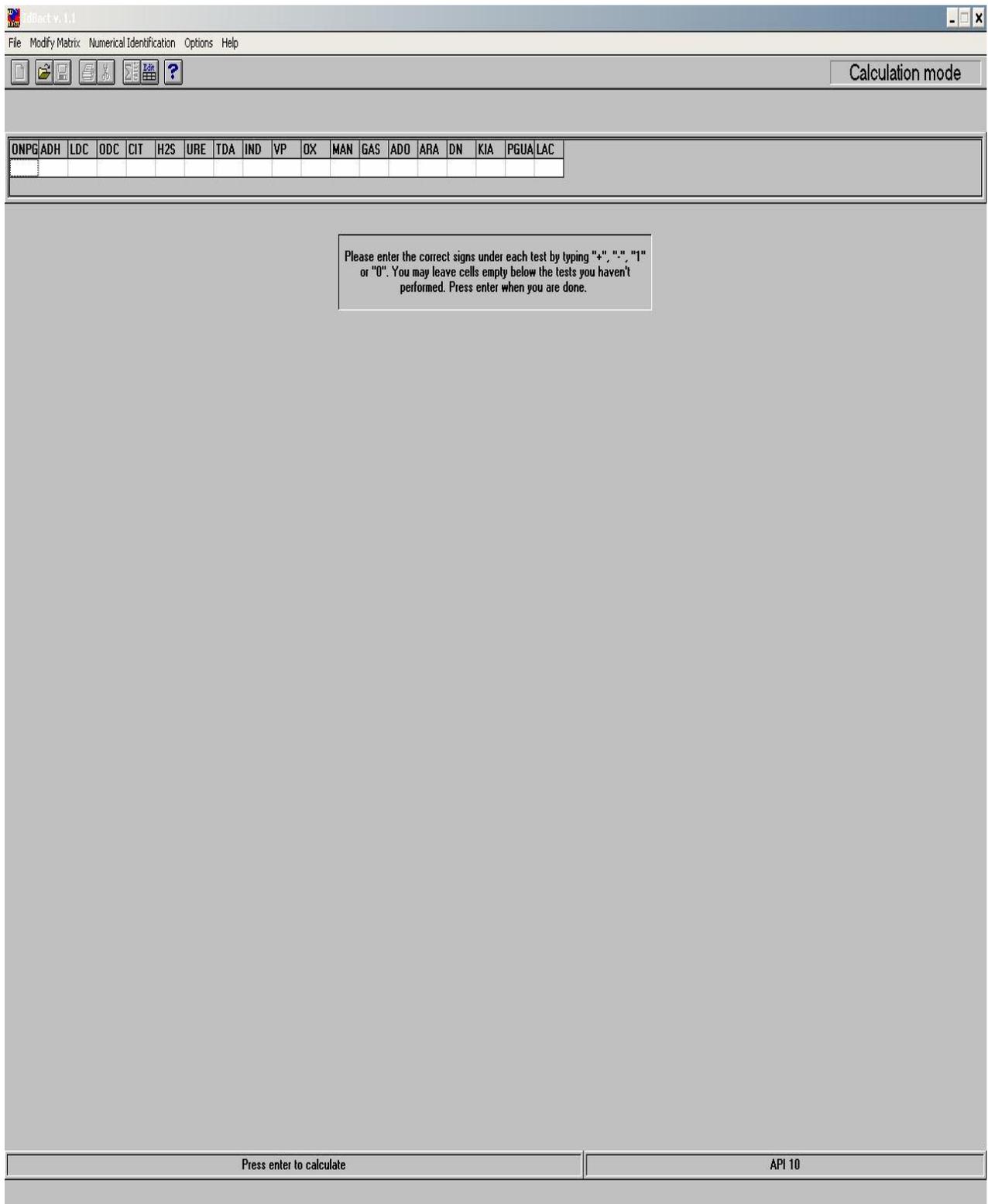


Рис. 11. Ввод входных данных идентифицируемой бактерии.

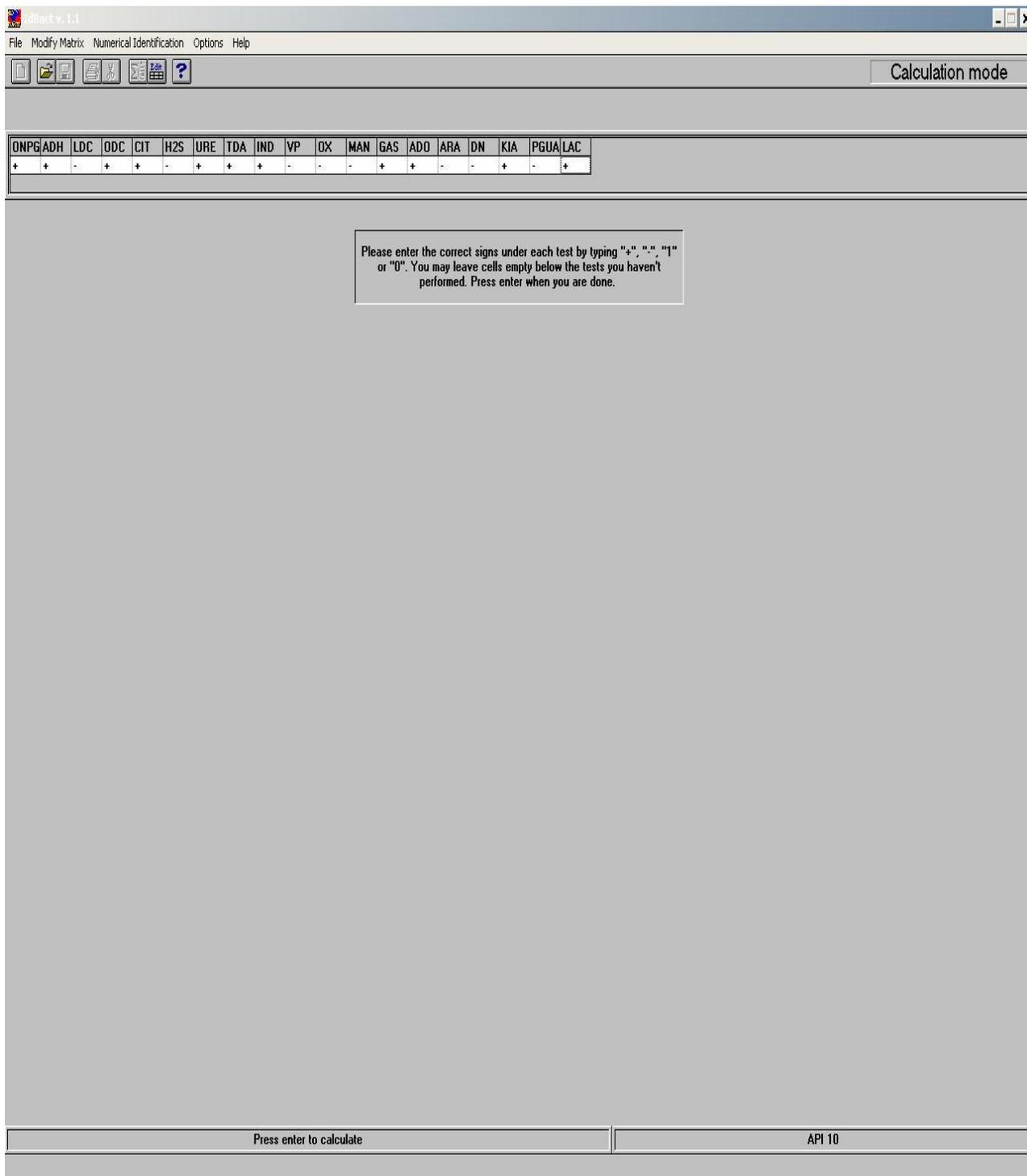


Рис. 12. Заполнение входных данных.

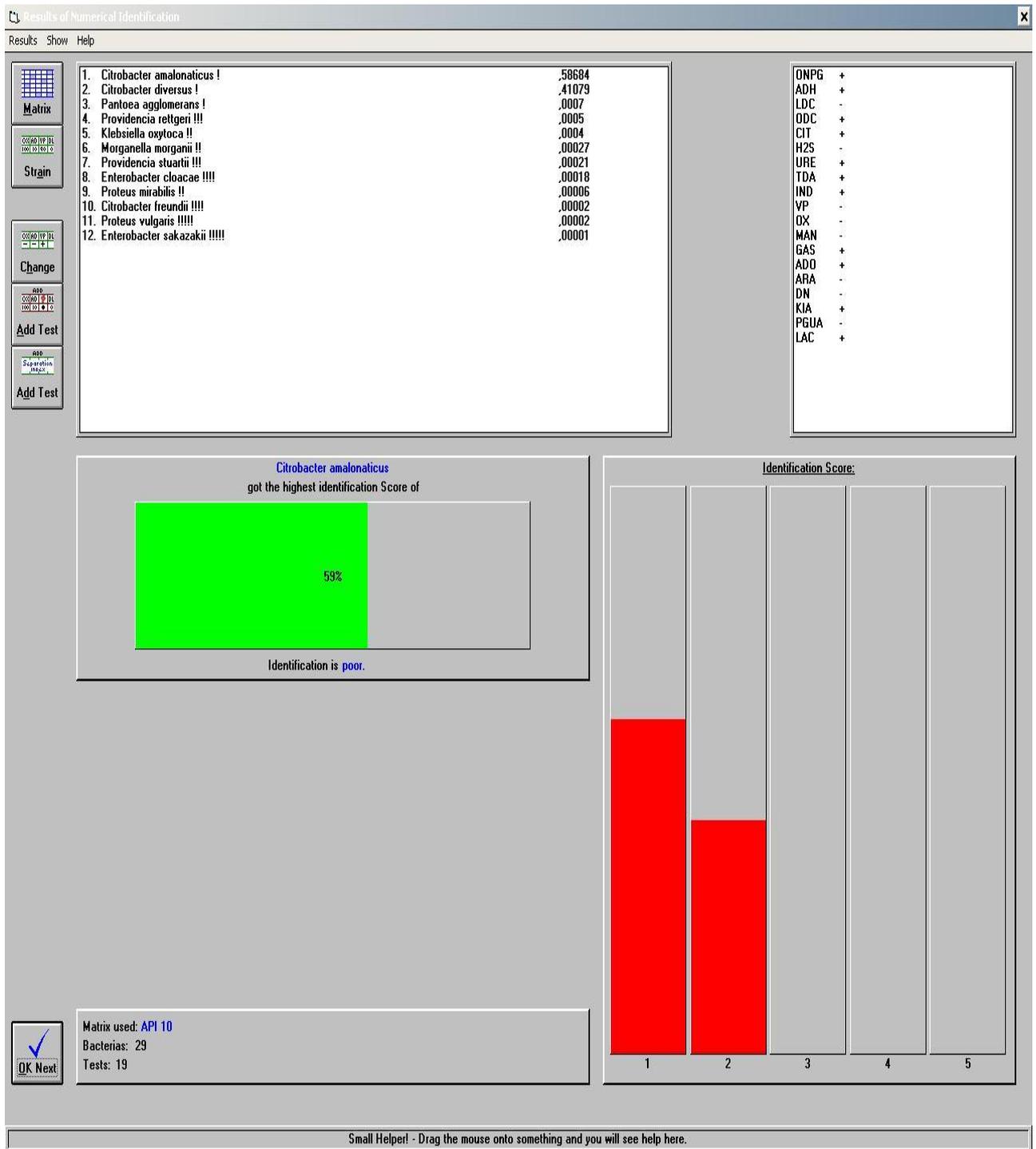


Рис. 13. Результат цифровой идентификации.

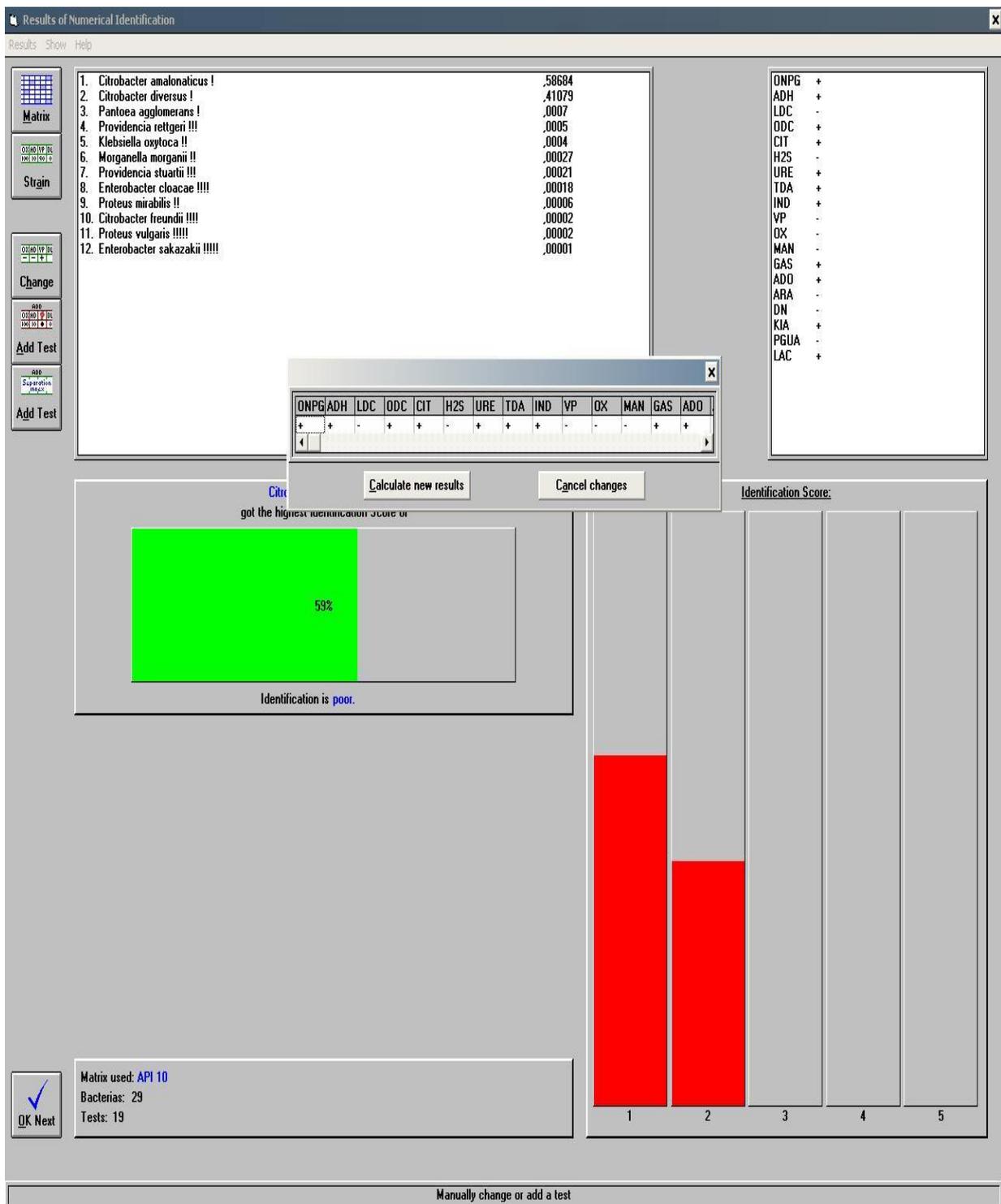


Рис. 14. Изменение входных данных идентифицируемой бактерии.

Results of Numerical Identification

Results Show Help

**Matrix**

**Strain**

**Change**

**Add Test**

**Add Test**

1. <i>Klebsiella oxytoca</i> !!!	.98485
2. <i>Klebsiella pneumoniae</i> !!!!	.00953
3. <i>Aeromonas hydrophila</i> !!!!!	.0053
4. <i>Pantoea agglomerans</i> !!!!!	.0002
5. <i>Vibrio cholera</i> !!!!!	.00008
6. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> !!!!!	.00002
7. <i>Enterobacter aerogenes</i> !!!!!	.00001

ONPG	+
ADH	-
LDC	+
ODC	-
CIT	+
H2S	-
URE	+
TDA	-
IND	+
VP	+
OX	+
MAN	-
GAS	-
ADO	+
ARA	+
DN	-
KIA	-
PGUA	+

Per cent positive test results for *Klebsiella oxytoca*:

ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	OX	MAN	GAS	ADO	ARA	DN	KIA	PGUA	LAC
99	0	86	2	84	0	60	0	100	91	0	99	97	99	98	0	100	0	100

[Close](#)

Identification is very good.

**Matrix used:** API 10

Bacterias: 29

Tests: 18

**OK Next**

Small Helper! - Drag the mouse onto something and you will see help here.

Рис. 15. Получение характеристик выбранной бактерии

## **ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ III**

Создана программа идентификации микроорганизмов. В качестве среды программирования использовался объектно-ориентированный язык высокого уровня Delphi. Описаны назначение программы, её интерфейс и основные операции, производимые пользователем для работы с программой.

## Заключение

1. Описано применение микротест-систем в микробиологии, показана необходимость их применения для идентификации микроорганизмов. Подробно рассмотрены и проанализированы компьютерные программы идентификации микроорганизмов: «Микроб-автомат», «Идентификация», а также микробиологические анализаторы, применяемые в настоящее время для исследований в клинической микробиологии.

2. Дано описание вида микроорганизмов - грибов рода *Candida*. В связи с ростом числа заболеваний, ведущих к поражениям различных органов и тканей организма человека патогенными и условно-патогенными грибковыми инфекциями, большое внимание уделено освещению эпидемиологии грибковых инфекций. В качестве основного приводится описание кристаллографического метода идентификации микроорганизмов, основанного на сравнении кристаллограмм различных родов грибов.

3. Создана программа идентификации микроорганизмов. В качестве среды программирования использовался объектно-ориентированный язык высокого уровня Delphi. Описаны назначение программы, её интерфейс и основные операции, производимые пользователем для работы с программой.

## Список литературы

1. Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. Молекулярная биология клетки. М. Мир. 1986.
2. Антибактериальная терапия. Практическое руководство. Под редакцией Л.С. Страчунского, Ю.Б. Белоусова, С.Н. Козлова. Москва, 2000.
3. Баженов Л.Г. Кристаллографический метод изучения микроорганизмов и его использование при идентификации грибов рода *Candida*. В кн.: "Новые технологии в медицине - 2004". Санкт-Петербург. 2004. -С. 12-13.
4. Баженов Л.Г, Способ идентификации *Serratia marcescens*. Патент №1231 Республики Узбекистан, 1994. - Расмий ахборотнома.-1994,- №3.-С.Ш.
5. Белобородова Н.В., Осипов Г.А. Гомеостаз малых молекул микробного происхождения и его роль во взаимоотношениях микроорганизмов с хозяином. Вестник РАМН. –1999. Т.16, –№7, с. 25-31.
6. Вейант Р., Мосс У., Холлис Д., Джордан Дж., Кук Э., Дейншвар М. Определитель нетривиальных патогенных грамотрицательных бактерий. М. Мир, 1999, С. 612-783
7. Елинов Н. П. Медицинская микология к XXI веку — в начале третьего тысячелетия// Проблемы медицинской микологии. – 2000. – Т. 2, № 4. – С. 6–12.
8. Златкина А.Р., Исаков В.А., Иваников И.О. Кандидоз кишечника как новая проблема гастроэнтерологии. // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2001. – №6. – С.33–38.
9. Зернов Ю.П., Дедков В.С., Антонова Ю.А., Михненкова Н.А., Дегтярев С.Х. // Биотехнология, 2005, № 2, с. 38-43.([Интернет-версия](#))
10. Ломов Ю.М. Эволюция возбудителя холеры и прогноз по этой инфекции на ближайшее будущее.// Эпидемиология и инфек. болезни. -2004. - №1. С. 7-12.
11. Международная статистическая классификация болезней и проблем, связанных со здоровьем (10 пересмотр ВОЗ), Женева 1992 г, издательство Медицина 1995 год

12. Методы общей бактериологии. / Под. ред. Ф. Герхардта и др.: В 3 томах: Пер. с англ. под ред. чл. корр. АН СССР Е. Н. Кондратьевой и проф. Л. В. Калакуцкого, - М., 1984.
13. Методические указания по лабораторной диагностике холеры. МЗ РУз.. Ташкент, 2006.
14. Ньматов А.С., Иногамоа И.А., Мустанов А.Н. и др. Характеристика культур холерных вибрионов Эльтор серогруппы, изолированных из объектов окружающей среды на территории Республики Узбекистан в 2005 году.// Холера и патогенные для человека вибрионы. Ростов-на-Дону, 2004. - Вып. №17. - С.44-46.
15. Определитель бактерий Берджи, М. "Мир", 1997.
16. Осипов Г.А. Демина А.М. Хромато-масс-спектрометрическое обнаружение микроорганизмов в анаэробных инфекционных процессах. Вестник РАМН. – 1996. Т.13, №2, с.52-59.
17. Осипов Г.А., Парфенов А.И., Богомолов П.О. Сравнительное хромато-масс-спектрометрическое исследование состава химических маркеров микроорганизмов в крови и биоптатах слизистой оболочки кишечника. Российский гастроэнтерол.журнал. 2001, 1: 54-69.
18. Скала Н. В Сидоренко М. В. “Практические аспекты современной микробиологии” Москва 2006 г. с. 6 -19, с. 217 – 241.
19. Л.З. Скала, А.Г. Нехорошева, С.В. Поликарпова "Микро-Ла-Тест - усовершенствованные коммерческие наборы в клинической микробиологии". Лаборатория. №1,2000г, с.12-13
20. Л.З.Скала, С.В. Сидоренко, А.Г.Нехорошева и др. "Практические аспекты современной клинической микробиологии", М., 1997 г.
21. Л.З.Скала, А.Г. Нехорошева, И.Н. Лукин и др." Система регистрации и анализа в работе микробиологических лабораторий". Эпидемиология и инфекционные болезни , 5,2000, с.36-41.
22. Л.З.Скала, А.Г. Нехорошева, А.Е.Винокуров, И.Н.Лукин " Современные технологии в клинической микробиологии и химиотерапии.

Автоматизированное рабочее место врача-микробиолога, химиотерапевта и эпидемиолога" Клиническая лабораторная диагностика. №12, 2001 г, с.25-32

23. Alberti C., Brun-Buisson Ch., Burchardi H. et al. Epidemiology of sepsis and infection in JCU patients from an international multicentre cohort study// Intensive Care Med. – 2002. – Vol. 28, № 2. – P. 108–121.

24. Bentley, R.W., Leigh, J.A., Collins, M.D. // Int. J. Syst. Bacteriol. - 1991. - V. 41. - P. 487-494.

25. Danna P.L., Urban C., Bellin E., Rahal J.J. Role of Candida in pathogenesis of antibiotic-associated diarrhoea in elderly patients.//Lancet/–1991.–Vol.337.–P.511–514.

26. Gauthier, G., Gauthier, M., Christen, R. // Int. J. Syst. Bacteriol. - 1995. - V. 45. - P. 755-761.

27. Garnier, F., Gerbaud, G., Courvalin, P., Galimand, M. // J. Clin. Microbiol. - 1997. - V. 35. - P. 2337-2341.

28. Grimont, F., Grimont, P. A.D. // Ann. Inst. Pasteur Microbiol. - 1986. - 137. P. 165-175.

29. Gilbert D.N., Moellering R.C., Sande M.A. "The Sanford Guide to antimicrobial therapy", 1999

30. Ibrahim, A., Gerner-Smidt, P., Sjostedt, S. // J. Clin. Microbiol. - 1996. - V. 34. - P. 2894-2896.

31. Jayarao, B.M., Dore, J.J.E., Oliver, S.P. // J. Clin. Microbiol. - 1992. - V. 30. - P. 2235-2240.

32. Levy M. M., Fink M. P., Marchall J. C. et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference// Crit Care Med. – 2003. – Vol. 31, № 4. – P. 1250–1256.

33. Luckey T.D. 1987. Overview of gastrointestinal microecology. Die Narung, ,vol.31,N 5-6.

34. Munoz P., Burillo A., Bouza E. Criteria used when initiating antifungal therapy against Candida spp. in the Intensive Care Unit// International journal of Antimicrobial Agents. – 2002. – Vol. 15. – P. 83–90.

35. New England Biolabs protocols of DNA purification, 1990.
36. Ohara-Nemoto, Y., Tajika, S., Sasaki, M., Kaneko, M. // J. Clin.
37. Poyard, C., Quesne, G., Coulon, S., Berche, P., Trieu-Cuot, P. // J. Clin. Microbiol. - 1998. - V. 36. - P. 41-47.
38. Prescott R.J., Harris M., Banerjee S.S. Fungal infections of small and large intestine.//J.clin.Path.–1992.–Vol.45.–P.806–811.
39. Redmond H.P., Shou J., Kelly C.J. et al. Protein–calorie malnutrition impairs host defense against *Candida albicans*.//J.Surg.Res.–1991.–Vol.50.–P.552–559.
40. Schlegel, L., Grimont, F., Grimont, P. A.D., Bouvet, A. // J. Clin. Microbiol. - 2003. - V. 41. - P. 657-666.
41. The Merck Manual. Sixteenth edition. Copyright (c) 1992 by Merck&Co., Inc.
42. Vaneechoutte, M., Beenhouwer, H., Claeys, G., Verchraegen, G., Rouck, A., Paepe, N., Elaichouni, A., Portaels, F. // J. Clin. Microbiol. - 1993. - V. 31. - P. 2061-2065.
43. Vaneechoutte, M., Dijkshoorn, L., Tjernberg, I., Elaichouni, A., DeVos, P., Claeys, G., Verchraegen, G. // J. Clin. Microbiol. - 1995. - V. 33. - P. 11-15.

## Приложение

### Листинг программы

```
unit idbact;

interface

uses
  Windows, Messages, SysUtils, Classes, Graphics, Controls, Forms,
  Dialogs, Grids, DBGrids, Db, DBTables, ExtCtrls, DBCtrls, StdCtrls,
  MPlayer, OleCtrls, Mask, ComCtrls, TabNotBk;

type
  TForm1 = class(TForm)
    Table1: TTable;
    Query1: TQuery;
    DataSource1: TDataSource;
    DBGrid1: TDBGrid;
    DBNavigator1: TDBNavigator;
    Button1: TButton;
    Button2: TButton;
    Label1: TLabel;
    Label2: TLabel;
    DBLookupListBox1: TDBLookupListBox;
    Label3: TLabel;
    TabbedNotebook1: TTabbedNotebook;
    MediaPlayer1: TMediaPlayer;
    StatusBar1: TStatusBar;
    Timer1: TTimer;
    Panel1: TPanel;
    Button3: TButton;
    DBEdit1: TDBEdit;
    DBEdit2: TDBEdit;
    DBEdit3: TDBEdit;
    Label4: TLabel;
    Label5: TLabel;
    Label6: TLabel;
    Label7: TLabel;
    DBEdit4: TDBEdit;
    DBEdit5: TDBEdit;
    Label8: TLabel;
    Label9: TLabel;
    procedure Button1Click(Sender: TObject);
    procedure Button2Click(Sender: TObject);
    procedure FormActivate(Sender: TObject);
    procedure Button3Click(Sender: TObject);
    procedure Timer1Timer(Sender: TObject);
    procedure FormCreate(Sender: TObject);
```

```

private
  { Private declarations }
public
  { Public declarations }
end;

var
  Form1: TForm1;
d:string;
implementation

{$R *.DFM}

// ùâë÷îê íà êîîêâ Çàîîñ
procedure TForm1.Button1Click(Sender: TObject);
var
  fam: string[30];
begin
  fam:=InputBox(
  if fam <>
  then
    begin
      with form1.Query1 do begin
        Close
        SQL.Clear;
        SQL
        SQL.Add('SELECT Fam, Name, Otce, Data_roj, Nac');
        SQL.Add('FROM: Bakteriya.db');
        SQL.Add('WHERE');
        SQL.Add('(Fam = "'+ fam + '"');
        SQL.Add('ORDER BY Name, Fam');
        Open;
      end;

      if Query1.RecordCount <> 0 then
        DataSource1.DataSet:=Query1           else begin
        ShowMessage(Complete Test);
        DataSource1.DataSet:=Table1;
      end;
    end;
  end;
end;

procedure TForm1.Button2Click(Sender: TObject);
begin
  DataSource1.DataSet:=Table1;

procedure TForm1.FormActivate(Sender: TObject);
begin
  with Session do
    begin

```

```

ConfigMode := cmSession;
try
  AddStandardAlias(
    ExtractFilePath(ParamStr(0))+ 'DATA\',
    'PARADOX');
  Table1.Active:=True;
finally
  ConfigMode := cmAll;
end;
end;
end;

procedure TForm1.Button3Click(Sender: TObject);
begin
form1.MediaPlayer1.Play;
end;

procedure TForm1.Timer1Timer(Sender: TObject);
begin
with StatusBar1 do
begin
Panels[1].Text := DateToStr(Now);
Panels[2].Text := TimeToStr(Now);
end;
end;

procedure TForm1.FormCreate(Sender: TObject);
begin
MediaPlayer1.FileName:='Movie.avi';
MediaPlayer1.Open;
MediaPlayer1.Play;
end;

end.

```

\* NUMERICAL IDENTIFICATION \*

Strain specification/comment:  
Результат идентификации

TEST RESULTS:

ONPG+ OXADH + MANLDC -GAS+ ODC -ADO+  
CIT + ARAH2S -DN+ URE + KIA+ TDA -  
PGUAIND + LAC+ VP

IDENTIFICATION RESULTS:

	BACTERIAL SPECIES	ID	SCORE	PROB	PROD
1.	1. Citrobacter amalonaticus.....		,46036	0,000000000245728	
2.	2. Citrobacter diversus.....		,32226	0,00000000017201	
3.	3. Klebsiella oxytoca.....		,20663	0,000000000110292	
4.	4. Pantoea agglomerans.....		,00719	0,000000000003839	
5.	5. Klebsiella pneumoniae.....		,00186	0,000000000000993	
6.	6. Serratia marcescens.....		,001	0,000000000000535	
7.	7. Citrobacter freundii.....		,00043	0,000000000000228	
8.	8. Providencia stuartii.....		,00011	0,000000000000061	
9.	9. Enterobacter cloacae.....		,00008	0,000000000000042	
10.	10. Providencia rettgeri.....		,00005	0,000000000000028	
11.	11. Serratia liquefaciens.....		,00001	0,000000000000008	

Identification is poor.