

ОРД-СОЦ.ГИГ-23

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

«Северо-Осетинская государственная медицинская академия»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

(ФГБОУ ВО СОГМА Минздрава России)

Кафедра микробиологии

МЕТОДИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ

По- микробиологии

основной профессиональной образовательной программы высшего
образования – программы ординатуры по специальности
32.08.11 Социальная гигиена и организация госсанэпидслужбы,
утвержденной 13.04.23 г.

Владикавказ, 2023

Методические материалы предназначены для обучения работы ординаторов по специальности 32.08.11 Социальная гигиена и организация госсанэпидслужбы, ФГБОУ ВО СОГМА Минздрава России по дисциплине микробиология

Составитель:

Доцент каф. микробиологии ФГБОУ ВО СОГМА,
к.м.н. Чертокоева М.Г.

Рецензенты:

Л.В. Бибасова –д.м.н., профессор, зав. кафедрой биологии и гистологии ФГБОУ ВО СОГМА Минздрава России.

Ф.Т. Бекузарова – начальник отдела эпид. надзора Управления Роспотребнадзора по РСО-Алания.

ПЕРЕЧЕНЬ МЕТОДИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ:

1. Сборник методических разработок по микробиологии, вирусологии и иммунологии для ординаторов по специальности 32.08.11 Социальная гигиена и организация госсанэпидслужбы.
2. Сборник методических разработок по микробиологии, вирусологии и иммунологии для преподавателей (по специальности 32.08.11 Социальная гигиена и организация госсанэпидслужбы).

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СЕВЕРО-ОСЕТИНСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

КАФЕДРА МИКРОБИОЛОГИИ

МИКРОБИОЛОГИЯ

**Учебно-методическое пособие для ординаторов по специальности: «Социальная
гигиена и организация госсанэпидслужбы»**

ВЛАДИКАВКАЗ

Занятие №1

ТЕМА: БАКТЕРИЙ- ВОЗБУДИТЕЛИ КОНТАКТНЫХ ИНФЕКЦИЙ
(условно-патогенные бактерий:- возбудители гнойно-воспалительных инфекций: стафилококки, стрептококки, синегнойная палочка, неспорообразующие анаэробы, протей, клебсиеллы, эшерихии).

Учебная цель:

1. Обучить ординаторов методам микробиологической диагностики и специфической профилактики гнойно- воспалительных инфекций, вызываемых стафилококками, стрептококками, синегнойной палочкой, неспорообразующими анаэробами, протеем, клебсиеллами, эшерихиями.

ПЛАН:

1. Таксономия и основные биологические свойства возбудителей гнойно- воспалительных инфекций (стафилококки, стрептококки, синегнойная палочка, неспорообразующие анаэробы, протей, клебсиеллы, эшерихии).
2. Эпидемиология, патогенез, иммунитет вызываемых заболеваний.
3. Принципы микробиологической диагностики гнойно- воспалительных инфекций.
4. Препараты для этиотропной терапии и специфической профилактики гнойно- воспалительных инфекций.
5. Сдача модуля.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА

1. Приготовление мазка и гноя и окраска по Граму.
2. Посев гноя на среды с глицерином, ЖСА, кровяной агар, Эндо.
3. Учет результатов посева на дифференциально-диагностические среды (демонстрация).
4. Учет посева стафилококка на кроличью плазму для выявления плазмокоагулазы (демонстрация).
5. Определение сине-зеленого пигмента на глицериновом агаре (демонстрация).
6. Определение лецитиназы стафилококка на ЖСА (демонстрация).
7. Определение гемолитической активности на кровяном агаре (демонстрация).
8. Определение лактозоположительных и лактозоотрицательных палочек на среде Эндо (демонстрация).
9. Посев исследуемого материала на сахарно-кровоной агар Цейслера с культивированием в анаэроостате. Учет результатов (демонстрация).
10. Проведение микроскопического исследования готовых мазков из культур неспорообразующих анаэробных микроорганизмов.
11. Оформление протоколов исследования.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Стафилококк (лат. Staphylococcus) — род бактерий семейства Micrococaceae.

Представители данного рода — неподвижные грамположительные кокки, диаметр клетки которых составляет от 0,6 до 1,2 мкм. Для представителей рода характерно расположение микробных клеток «виноградными гроздьями» в чистой культуре. Стафилококки — факультативные анаэробы, при этом они не образуют спор или капсул. В состав этого рода входят патогенные и условно-патогенные для человека виды, колонизирующие носоглотку, ротоглотку и кожные покровы.

Патогенные стафилококки продуцируют эндо- и экзотоксины, ферменты, нарушающие жизнедеятельность клеток. Например, виды, обладающие способностью к синтезу эксфолиативного токсина, могут вызывать "синдром ошпаренной кожи", а

гиалуронидаза "разрушает" соединительную ткань не позволяя организму локализовать очаг. Устойчивость стафилококков в окружающей среде высока: при $t^{\circ}60^{\circ}$ они погибают через 1 ч, в высушенном состоянии на перевязочном материале сохраняются до 6 мес; в экссудате - до 2.5-3.5 года. Им свойственна чрезвычайно высокая изменчивость в организме человека, широко распространенная резистентность к антибиотикам бета-лактамного ряда (пенициллин, метициллин), обусловленная наличием бета-лактамаз.

Существует стафилококковый бактериофаг, обладающий способностью специфически лизировать стафилококковые бактерии. Известна достаточно высокая чувствительность стафилококков к водным растворам солей серебра и его электролитическим растворам.

По степени и патогенности Х. Гросс разделил стафилококков следующим образом: *безусловно патогенные стафилококки*, обладающие большой степенью летальности (гибели) для клеток крови;

условно патогенные стафилококки, способные вызвать незначительный воспалительный процесс в виде гиперемии (покраснения) и инфильтрации (уплотнения);

сапрофиты (обитатели поверхности кожи и внешней среды), практически не вызывающие поражений.

Данная классификация является относительной, ибо патогенные проявления стафилококков зависят не только от их биологических свойств, но и от состояния организма человека, его устойчивости и реактивности.

ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ОБНАРУЖЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ПАТОГЕННЫХ СТАФИЛОКОККОВ

Предварительная диагностика стафилококков может основываться на бактериоскопическом изучении препаратов - мазков, окрашенных по Граму. Для точного установления патогенности обнаруженных стафилококков требуется выделить эти микроорганизмы в чистой культуре путем посева исследуемого материала на плотные питательные среды.

Гемолитическая способность определяется на чашках с кровяным агаром.

Если же проводится исследование гноя открытых ран или отделяемого язв или свищей, то следует пользоваться элективно-дифференциальной средой для стафилококков - желточно-солевым агаром (ЖСА) Г. Н. Чистовича. Элективность этой среды обеспечивается высоким содержанием хлористого натрия, а добавленный яичный желток позволяет выявлять лецитовителлазную активность, которая является одним из показателей патогенности стафилококков и в силу этого ЖСА более четко дифференцирует патогенных представителей, чем кровяной агар. Непосредственно при просмотре чашек вокруг колоний отмечается образование радужных венчиков и мутной зоны - лецитовителлазная реакция. Такие колонии, не менее двух из каждого посева, отбирают на скошенный мясо-пептонный агар для последующей проверки выросших культур в реакции плазмокоагуляции.

Коагулазная проба является основным признаком, определяющим болезнетворность стафилококков, поэтому ее постановка требует к себе максимального внимания. Для выявления коагулазной активности у стафилококков, выделенных от людей, можно пользоваться как цельной кровью, так и плазмой кроликов или человека. Можно использовать также кровь или плазму, взяв результаты проводится обязательно дважды: через 2-3 ч и 24 ч. Учитывают свертывание плазмы и образование сгустков. Обычно культуры, активно продуцирующие коагулазу, дают положительную реакцию уже через 2-3 ч. а если они обладают и выраженной фибринолитической активностью, то первоначально образовавшиеся сгустки могут подвергнуться расплавлению к концу суток. Слабокоагулирующие штаммы могут давать положительную реакцию в поздние сроки - к концу суток. Опыты, давшие сомнительный результат, необходимо повторить.

Стафилококки, дающие положительную коагулазную пробу, должны

рассматриваться как потенциально патогенные, независимо от наличия или отсутствия у них гемолитических свойств и характера пигмента, их относят к виду *St. aureus* и в дальнейшем подвергают фаготипизации и проверке на чувствительность к антибиотикам. Углубленное изучение стафилококков показало, что основной признак патогенности - коагулазная реакция может подвергаться изменчивости при воздействии различных факторов, поэтому в ряде случаев, при выделении коагулазонегативных стафилококков в монокультуре из патологических очагов, целесообразно изучить у них другие признаки потенциальной болезнетворности и прежде всего - способность ферментировать маннит в анаэробных условиях.

Стрептококки - обнаружены Т. Бильротом в 1874 г. при рожистом воспалении и через несколько лет Л. Пастером при гнойных заболеваниях и сепсисе. Род *Streptococcus* включает многочисленные виды, которые различаются между собой по экологическим, физиологическим и биохимическим признакам, а также патогенности для человека.

Морфология, физиология. Клетки шаровидной или овальной формы, расположенные парно или в виде цепочек разной длины. Грамположительны. Хемоорганотрофы. Требовательны к питательному субстрату. Размножаются на кровяных или сахарных средах. На поверхности твердых сред образуют мелкие колонии, на жидких дают придонный рост, оставляя среду прозрачной. По характеру роста на кровяном агаре различают α -гемолитические стрептококки, окруженные небольшой зоной гемолиза с зеленовато-сероватым оттенком, β -гемолитические, окруженные прозрачной зоной гемолиза, и негемолитические, не изменяющие кровяной агар. Однако гемолитический признак оказался весьма переменчивым, вследствие чего для дифференциально-диагностических целей используется с осторожностью. Ферментация углеводов не является стабильным и четким признаком, вследствие чего он не используется для дифференцировки и идентификации стрептококков. Стрептококки аэробы, не образуют каталазы, в отличие от стафилококков.

Антигены. Стрептококки имеют несколько типов антигенов, позволяющих дифференцировать их друг от друга. По Р. Лэндсфилд (1933 г), их подразделяют на 17 серогрупп по полисахаридным антигенам, которые обозначаются заглавными латинскими буквами А, В, С, D, Е, F и т.д. К самой многочисленной серогруппе А относится вид *S. pyogenes*. Дифференциация на серотипы проводится по белковому М-антигену. Сейчас насчитывается свыше 100 серотипов стрептококков серовара А.

У некоторых стрептококков этой серогруппы обнаружены перекрестно реагирующие антигены (ПРА). Антитела к ним реагируют с мышечными волокнами миокарда, тканью почки и других органов человека. ПРА могут стать причиной иммунопатологических состояний.

Экология и эпидемиология. Стрептококки сравнительно широко распространены в природе. По экологическому признаку их можно подразделить на несколько групп. К первой группе относят стрептококки серогруппы А, патогенные только для человека (*S. pyogenes*). Вторую группу составляют патогенные и условно-патогенные стрептококки серогруппы В и D (*S. agalactia*, *S. faecalis* и др.), патогенные для людей и животных. Третья экологическая группа - это условно-патогенные оральные стрептококки (*S. mutans*, *S. mitis* и др.). Таким образом, одни стрептококки вызывают только антропонозные инфекции, другие - антропозоонозные инфекции.

В организме человека стрептококки обитают в экологических нишах: полость рта, верхние дыхательные пути, кожа и кишечник. Источником инфекции являются здоровые бактерионосители, рековалесценты и больные люди. Основной путь распространения возбудителя - воздушно-капельный, реже контактный.

Во внешней среде стрептококки сохраняются в течение нескольких дней. При нагревании до 50°C они погибают через 10-30 мин.

Лабораторная диагностика. Материал для исследования: гной, слизь из зева и носа, моча и др. - подвергают бактериоскопическому исследованию. Для этого готовят мазки,

которые окрашивают по Граму. Бактериологическое исследование проводят путем посева исследуемого материала на чашки Петри с кровяным агаром. Выросшие колонии характеризуют по наличию или отсутствию гемолиза. Заключительным этапом бактериологического исследования является идентификация выделенной культуры по антигенным свойствам в реакции преципитации с полисахаридным преципитиногеном, выделенным из исследуемой культуры, и антисыворотками к серотипам А, В, D. При подозрении на сепсис делают посевы крови.

Серологическое исследование проводят для подтверждения диагноза ревматизма. С этой целью определяют наличие антител к О-стрептолизину в РСК или реакции преципитации, а также С-реактивного белка. В последние годы для диагностики стрептококковых инфекций используют ПЦР.

Профилактика и лечение. Специфическая профилактика стрептококковых инфекций не разработана вследствие неэффективности полученных вакцин и эритрогенного анатоксина (против скарлатины). В настоящее время разрабатывается вакцина против карисса. Лечение проводится главным образом антибиотиками. Резистентность стрептококков к различным антибиотикам, в том числе и к пенициллину, развивается медленно. Это дает возможность использовать многие бета-лактамы, в том числе бензилпенициллин. Из других антибиотиков применяют цефалоспорины 1 и 2 поколений, аминогликозиды, макролиды.

Синегнойная палочка -*Pseudomonas aeruginosa*— грамотрицательная подвижная (монотрих) палочковидная бактерия. Обитает в воде и почве, условно патогенна для человека, возбудитель нозокомиальных инфекций у человека.

Pseudomonas aeruginosa обнаруживается при абсцессах и гнойных ранах, ассоциирована с энтеритами и циститами. *P. aeruginosa* является одним из распространённых возбудителей нозокомиальных инфекций ввиду того, что *P. aeruginosa* особенно легко поражает лиц с ослабленным иммунным статусом. Факторами патогенности *P. aeruginosa* является наличие подвижности, токсинообразование, продукция гидролитических ферментов. Прогноз ухудшается высокой резистентностью к действию антибиотиков. *P. aeruginosa* устойчива к действию многих беталактамов, аминогликозидов, фторированных хинолонов.

Симптомы. Синегнойная инфекция мочевыводящих путей, как правило, протекает хронически, длится месяцами, а иногда и годами, нарушая функцию почек. Часто инфекция протекает бессимптомно и выявляется при бактериоскопическом исследовании мочи лихорадящих больных, нуждающихся в частой и постоянной катетеризации мочевого пузыря. Иногда урогенитальная инфекция переходит в генерализованную форму с клиническими явлениями сепсиса.

Последствия.

Все вызванные синегнойной палочкой инфекции поддаются лечению и излечимы, за исключением, пожалуй, хронической легочной инфекции у больных муковисцидозом.

Лечение затруднительно ввиду высокой устойчивости к антибиотикам.

Обычно при инфекциях, вызванных синегнойной палочкой, назначают один или несколько антибактериальных препаратов, к которым чувствителен возбудитель.

В отношении синегнойной палочки активны аминогликозиды, некоторые цефалоспорины третьего и четвертого поколения, некоторые пенициллины широкого спектра действия, карбапенемы, монобактамы и фторхинолоны.

При различных инфекциях, вызванных синегнойной палочкой, наряду с антибактериальной терапией часто используют синегнойный бактериофаг, который представляет собой вирус, активный в отношении именно синегнойной палочки. Важным условием эффективной фаготерапии является предварительное определение фагочувствительности возбудителя.

Культуральная диагностика с последующей бактериоскопией не представляет трудностей, поскольку синегнойной палочки хорошо растёт на различных питательных

средах. Культуральная диагностика («культура», «посев») – помещение взятого у больного материала на специальные питательные среды, состав которых подобран так, чтобы для выявляемого возбудителя создавались бы максимально благоприятные условия для развития и размножения. Появление специфических для возбудителя колоний (зон роста) свидетельствует о его присутствии в материале, взятом для исследования. Дополнительно «выращенных в культуре» возбудителей могут исследовать под микроскопом, оценивать на устойчивость к различным группам антибиотиков, «перевивать» на среды с другим составом для исследования ферментативных свойств и т.п.

С помощью серологической диагностики в относительно короткие сроки можно правильно поставить диагноз путём выявления как антигенов возбудителя инфекции, так и антител, вырабатываемые в ответ на антигенную стимуляцию иммунной системы. Антиген – вещество (обычно белковой природы), характерное и специфичное для выработавшего его организма. В чужеродном по составу антигенов организме стимулирует выработку иммунной системой последнего антител, направленных на изоляцию и уничтожение вышеупомянутых антигенов. Определение антигенов и антител широко используется в лабораторной диагностике различного рода инфекций. Выявление антигена какого-либо возбудителя подтверждает присутствие этого возбудителя в организме. Обнаружение антител свидетельствует о реакции организма на внедрение чужеродного агента. «Спектр» антител позволяет судить о стадии заболевания, а титр (количество) антител – с определёнными оговорками – о массивности инфекции.

Протей (лат. proteus) — род грамотрицательных, споронеобразующих, факультативно анаэробных бактерий. Представитель нормальной, условно-патогенной микрофлоры кишечника человека.

Протей в систематике бактерий

Род протей (proteus) входит в семейство энтеробактерии (enterobacteriaceae), порядок энтеробактерии (enterobacteriales), класс гамма-протеобактерии (γ proteobacteria), тип протеобактерии (proteobacteria), царство бактерий.

Род протей включает следующие виды: proteus hauseri, proteus mirabilis, proteus muenchii, proteus penneri, proteus vulgaris.

Протеи имеют вид мелких, 0,3 на 3 мкм, нитевидных палочек. Они отличаются очень активной подвижностью. Протеи обладают токсическими (вырабатывают эндотоксин) и гемолитическими свойствами.

Протеи считаются санитарно-показательными бактериями. Количество обнаруживаемых proteus mirabilis рассматривают как показатель фекального загрязнения, а proteus vulgaris — как показатель загрязнения объекта органическими веществами.

Три вида из рода протей — proteus mirabilis, proteus vulgaris и proteus penneri являются патогенными для человека, причем 75–90 % инфекций вызывает proteus mirabilis.

Наиболее часто острые кишечные инфекции, вызываемые протеом, встречаются у детей раннего возраста.

Бактерии рода протей являются возбудителями многих инфекций мочевыводящих путей и почек человека, при осложнениях калькулёзного пиелонефрита, врождённых пороках развития, после хирургических операций. Proteus mirabilis является причины раневых инфекций. Proteus vulgaris присутствует в кишечнике здорового человека и многих животных, он обнаруживается в навозе, почве и загрязнённых водах.

Антибиотики (из имеющих описание в данном справочнике), активные в отношении протей: рифаксимин, нифуроксазид. Антибактериальные средства (из имеющих описание в данном справочнике), активные в отношении proteus mirabilis: амоксициллин (за исключением индолположительных штаммов протей (proteus vulgaris) которые, наоборот, к амоксициллину устойчивы). Менее активен нифурател (только в отношении proteus mirabilis и proteus vulgaris). Большинство штаммов proteus mirabilis, в

отличие от *proteus vulgaris*, чувствительны не только к ампициллину, но и к цефалоспорином. *Proteus mirabilis* и *proteus vulgaris* чувствительны к левофлоксацину и ципрофлоксацину. Протеи устойчивы к тетрациклину.

Лабораторная диагностика заболеваний, этиологически связанных с протеями, проводится бактериологическим методом. Выделенные чистые культуры идентифицируют по культуральным и биохимическим свойствам. Этиологическая роль устанавливается так же, как и всех других условно-патогенных микроорганизмов.

Клебсиелла (лат. *Klebsiella*) — род условно-патогенных бактерий, относящихся к семейству *Enterobacteriaceae*.

Представители рода встречаются в фекалиях человека, на коже и слизистых дыхательных путей, в почве, воде, фруктах и овощах. Благодаря капсуле устойчивы в окружающей среде.

Род состоит из 4 видов:

Klebsiella oxytoca,

Klebsiella planticola,

Klebsiella pneumoniae typus — Клебсиелла пневмонии, или Палочка Фридлендера,

Klebsiella terrigena.

Наиболее частыми возбудителями клебсиеллезов являются *Klebsiella pneumoniae* и *Klebsiella oxytoca*.

Бактерии этого рода вызывают пневмонию, урогенитальные инфекции, в том числе у новорожденных, у ослабленных и пожилых лиц, конъюнктивиты, менингиты, сепсис, острые кишечные инфекции.

Клебсиеллы — прямые грамтрицательные палочки (0,3-1,0 × 0,6-6,0 мкм), располагающиеся одиночно, парами или короткими цепочками. Образуют капсулы. Неподвижны. Факультативные анаэробы. Факторы вирулентности: капсула, эндотоксин, маннозореzистентные пили.

Растут на простых питательных средах. Обладают выраженной биохимической активностью.

Лабораторная диагностика клебсиеллезов базируется на выделении чистой культуры возбудителя, дифференциации ее от других энтеробактерий и идентификации вида по морфологическим, культурным и биохимическим признакам, определении серовара. Серодиагностика проводится в РСК с О-антигеном клебсиелл.

Профилактика и лечение. Вакцинопрофилактика клебсиеллезов не разработана. Для лечения применяют антибиотики ампициллин, аминогликозиды, тетрациклины, левомицетин. За последние годы отмечается широкое распространение антибиотикореzистентных штаммов клебсиелл.

Эшерихии (лат. *escherichia*) — род грамтрицательных, спорообразующих, факультативно анаэробных бактерий.

Род эшерихии (лат. *escherichia*) входит в семейство энтеробактерии (лат. *enterobacteriaceae*), порядок энтеробактерии (лат. *Enterobacteriales*).

Самым изученным видом эшерихий является *escherichia coli* (эшерихия коли), которая называется также кишечной палочкой, входящей в состав нормальной микрофлоры кишечника человека. В то же время разнообразные патогенные серотипы эшерихий коли могут быть причиной эшерихиозов — различных инфекционных заболеваний, протекающих с интоксикацией, лихорадкой, чаще с поражением желудочно-кишечного тракта, реже — мочевыводящих, желчевыводящих путей, других органов или с развитием сепсиса.

Лабораторная диагностика. Основным подходом является выделение чистой культуры на дифференциально — диагностических средах и ее идентификация по антигенным свойствам. Ставят РА с набором поливалентных ОК (к О- и К- антигенам) сывороток, затем — адсорбированных О- сывороток и прогретыми при 100 градусах Цельсия (для разрушения К- антигенов) культурами.

Неспорообразующие анаэробы.

Бактероиды (род Bacteroides)

Грамотрицательные палочки, неподвижны, спор не образуют, образуют капсулу. Типовой вид — *Bacteroides fragilis*. Бактерии группы *Bacteroides fragilis*.

Культивируются на анаэробном кровяном агаре; лучше растут на комплексных средах. Образуют белые, прозрачные S-формы колоний.

Протеолитическая активность умеренная, лецитиназу не образуют, не вызывают гемолиза эритроцитов, образует H₂S, образование кислоты при ферментации глк., лактозы, сахарозы.

Содержат соматический О-АГ, могут иметь Н- и К-АГ.

Факторы патогенности: образуют капсулу и продуцируют супероксиддисмутазу, эндотоксин, нейраминидаза.

Колонизируют слизистые полости рта, верхних дыхательных путей, гениталий и кишечника.

Порфиромонады (род Porphyromonas)

Короткие грамотрицательные палочки. Неподвижны, спор не образуют. Род представлен тремя видами: *P. asaccharolytica* (типовой вид), *P. gingivalis* и *P. endodontalis*.

На анаэробном кровяном агаре образуют слизистые черные колонии. Для роста нуждаются в гемине и менадионе.

Биохимическая активность очень низкая. Инертны по отношению к углеводам. Все виды образуют индол. *P. gingivalis* связывает и разрушает фибриноген, продуцирует коллагеназу, повреждающую дентин, а также агглютинирует эритроциты. Колонизируют слизистые полости рта и верхних дыхательных путей.

Превотеллы (род Prevotella)

Полиморфные неподвижные аспорогенные палочки. Типовой вид — *Prevotella melaninogenica*.

На кровяном агаре образуют светло-коричневые/черные колонии.

Проявляют умеренную сахаролитическую активность. Основные продукты ферментации углеводов — сукцинаты и ацетаты.

Основной фактор патогенности — эндотоксин, фосфолипаза А, нарушающая целостность мембран эпителиальных клеток.

Колонизируют слизистые полости рта, верхних дыхательных путей, гениталий и кишечника.

Лептотрихии (род Leptotrichia)

Прямые неподвижные грамотрицательные палочки. Анаэробы. Для роста необходимо 5 % СО₂. Ферментируют глюкозу до кислоты без образования газа; главные продукты — молочная и уксусная кислоты; масляную кислоту не образуют. Не образуют сероводород и аммиак.

Экологическая ниша — ротовая полость человека.

Фузобактерии (род Fusobacterium)

Веретенообразные, неподвижные палочки. Облигатные анаэробы. На анаэробном кровяном агаре образуют мелкие выпуклые желтоватые колонии, окруженные зоной агемолиза. На жидких средах образуют осадок.

Биохимическая активность: утилизируют пептон и углеводы, ферментативная активность низкая.

Факторы патогенности: фосфолипаза А, облегчает инвазию бактерий в глубокие ткани, и лейкоцидин, который обладает цитотоксическим действием на различные клетки.

Колонизируют слизистые полости рта, верхних дыхательных путей, гениталий и кишечника.

ОБЩЕЕ:

Чувствительность к антимикробным препаратам. Резистентны к пенициллинам, цефалоспорином I и II поколений. Препараты выбора — левомицетин, метронидазол.

Иммунитет: нестойкий, непродолжительный.

Лечение: Химиопрепараты нитроимидазольного ряда: метронидазол, тинидазол, орнидазол, и антибиотик клиндамицин. Препараты резерва — производные нитрониазолов. Дренирование гнойников, удаление мертвых тканей, антибактериальная химиотерапия.

Профилактика: Специфическая — нет. Неспецифическая профилактика - назначение при операциях на органах брюшной полости и малого таза, метронидазола в/в, обработка ран и выявлении гнойно-воспалительных очагов.

Микробиологическая диагностика

Бактериологический. Серологический и бактериоскопический методы — ограниченное применение. Для экспресс-диагностики применяется ГЖХ (газожидкостная хроматография).

Бактериологическое исследование: Посев производят на кровяные среды, обогащенные факторами роста (гемин, менадион). Посевы инкубируют в анаэробных условиях. Для выявления в исследуемом материале темнопигментированных бактериоидов, превотелл, порфиромонад пробу исследуют в УФ лучах (микроколонии светятся красным светом).

На первом этапе идентификации определяют родовую принадлежность изолированных культур. На втором этапе проводят окончательную идентификацию до вида по биохимическим тестам, антигенным свойствам.

Газовая хроматография. Для экспресс-диагностики анаэробной инфекции применяют метод ГЖХ, основанный на хроматографическом определении в материале от больных специфических продуктов метаболизма облигатных анаэробных бактерий — летучих жирных кислот. Наличие жирных кислот - анаэробная этиология воспалительного процесса. Маркеры: изомасляная и масляная, изовалериановая и валериановая, изокапроновая и капроновая. Аэробные бактерии летучие жирные кислоты не продуцируют.

Делай что должен, и будь что будет.

Занятие №2

ТЕМА: МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ ВОДЫ, ВОЗДУХА, ПОЧВЫ.

Учебная цель:

1. Обучить ординаторов методам микробиологического контроля воды, воздуха, почвы.

ПЛАН:

1. Методы микробиологического контроля воды.
2. Исследование общей микробной обсемененности дистиллированной воды.
3. Методы микробиологического контроля воздуха.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА

1. Проведение микробиологического исследования воздуха, аптечной посуды.
2. Разбор схемы микробиологического исследования воды.
3. Проведение микробиологического исследования дистиллированной воды.
4. Оформление протоколов исследования.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Санитарно-бактериологическое исследование воды:
а) определить микробное число воды. Для определения исследуемую воду разводят в 10,

100, 1000 раз. В пробирку с 9 мл стерильной воды вносят 1 мл исследуемой воды (1:10), затем из разведения 1:10 переносят 1 мл в 9 мл стерильной воды (1:100) и так до разведения 1:1000. По 1 мл полученных разведений воды, начиная с большего, переносят в промаркированные стерильные чашки Петри и заливают каждую чашку 10 мл расплавленного и охлажденного до 45⁰ МПА. Осторожно перемешивают, затем чашки с застывшим агаром переворачивают вверх дном и инкубируют сутки в термостате

Оснащение: пробирка с исследуемой водой, пробирки с 9 мл стерильной воды – 3 шт., стерильные чашки Петри – 3 шт., пробирки с 10 мл МПА – 3 шт.

б) изучить по демонстрации и отметить в таблице определение коли-титра бродильным методом

в) изучить по демонстрации и зарисовать определение коли-индекса методом мембранных фильтров.

Оснащение: чашки Петри со средой Эндо и фильтром с колониями кишечной палочки.

2. Санитарно-бактериологическое исследование воздуха

а) определить микробную обсемененность воздуха седиментационным методом

Для исследования воздуха чашки Петри с МПА открыть на 10 мин., затем инкубировать в термостате при 37⁰С.

б) определить

микробное число воздуха аспирационным методом. Чашки Петри с МПА поместить в аппарат Кротова. Отбор пробы проводить в течении 4 мин., при скорости просасывания воздуха 25 л/мин.

Оснащение: чашки с МПА – 2 шт., аппарат Кротова.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРОБНОГО ЧИСЛА ВОДЫ

Разведение воды	1:10	1:100	1:1000
Объем в мл	1	1	1
МПА в мл			
Результат			
Заключение			

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИ-ТИТРА ВОДЫ

Объем воды	10	1	1:10	1:100
1.ГПС (глюкозо-пептонная среда)	1 (конц)	10	10	10
Результат				
2.Высев из ГПС на среду Эндо секторами				
Учет результатов (микроскопия мазков, окраска по Граму)				
ЗАКЛЮЧЕНИЕ				
Коли-титр				
Коли-индекс				

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОБНОЙ ОБСЕМЕНЕННОСТИ ВОЗДУХА

	Место отбора	Экспозиция	Результат Число микробов в 1м^3
Метод седиментации (по Коху), посев на МПА			
Аспирационный метод (аппарат Кротова) посев на МПА			

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

3. Санитарно-бактериологическое исследование смывов с аптечной посуды

Приготовить смыв с аптечной посуды: налить во флакон 10 мл стерильного изотонического раствора хлорида натрия, тщательно встряхнуть, ополоснуть внутреннюю поверхность сосуда. Для обнаружения золотистого стафилококка смыв в количестве 3-4 капель засеять на чашки Петри с желчно-солевым агаром, чашку поставить в термостат.

4. *Исследование аптечного оборудования.* Посуду, пробки, прокладки, воронки, цилиндры исследуют в момент подготовки к разливу инъекционных растворов и глазных капель. Посуду отбирают в укупоренном виде, но без содержимого в количестве трёх штук одинаковой ёмкости; пробки и уплотнители по пять штук, помещая их в стерильную закупоривающуюся посуду. Исследование проводят путём споласкивания оборудования 10 мл стерильной водопроводной воды. В смывной жидкости определяют МАФАМ и БГКП. Бактерий группы МАФАМ не должно быть более 150 КОЕ в смывах с трех флаконов, пяти пробок и пяти прокладок. Присутствие БГКП не допускается.

Вода дистиллированная для приготовления ЛС, кроме инъекционных растворов и глазных капель. Пробы отбирают из бюретки, заполненной исследуемой водой; выводной конец которой предварительно обжигают ватно-спиртовым факелом. Пробы забирают в стерильные бутылки в объёме 300 мл. Если результаты оказываются неудовлетворительными, то пробы отбирают из приёмника дистиллятора. Определяют содержание МАФАМ, плесневых и дрожжевых грибов. Результаты оценивают по общему количеству микроорганизмов путём суммирования числа выросших колоний бактерий и грибов. Предельно допустимо содержание 10—15 КОЕ в 1 см^3 . Наличие бактерий группы БГКП в дистиллированной воде не допускается. МАФАМ – мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы. Количество МАФАМ можно рассматривать как общее микробное число, т.е. содержание всех микроорганизмов в исследуемом материале. Если контролировать этот показатель на всех этапах производства, то можно проследить насколько "чистое" сырьё поступает на производство, как меняется его "чистота" после обработки и не претерпевает ли продукт, на нашем примере это ЛС повторного загрязнения после термообработки и во время фасовки. Если в конечном продукте содержание МАФАМ превышает нормы, то это может в равной степени свидетельствовать как о нарушении санитарных условий на производстве или нарушении технологии, так и о нарушении условий хранения и реализации продукта в аптечной сети.

Занятие №3

ТЕМА: ВИРУСЫ–ВОЗБУДИТЕЛИ КРОВЯНЫХ ИНФЕКЦИЙ

(возбудители гепатитов В,С,Д,Г, ВИЧ- инфекции, возбудители клещевого энцефалита и других арбовирусных инфекций).

Учебная цель:

1. Обучить ординаторов методам вирусологической диагностики и специфической профилактики гепатитов В,С,Д,Г, ВИЧ- инфекции.
2. Обучить студентов методам вирусологической диагностики и специфической профилактики клещевого энцефалита и других арбовирусных инфекций.

ПЛАН:

1. Таксономия и основные биологические свойства возбудителей гепатитов В,С,Д,Г, ВИЧ- инфекции, клещевого энцефалита, арбовирусных инфекций.
2. Эпидемиология, патогенез, иммунитет вызываемых заболеваний.
3. Принципы микробиологической диагностики гепатитов В,С,Д,Г, ВИЧ- инфекции, клещевого энцефалита.
4. Препараты для этиотропной терапии и специфической профилактики гепатитов В,С,Д,Г,ВИЧ- инфекции, клещевого энцефалита.
5. Сдача модуля.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА

- 1.Разбор постановки и учет результатов реакции ИФА для серодиагностики и сероидентификации при гепатитов В,С,Д,Г, ВИЧ- инфекции (демонстрация).
- 2.Разбор постановки и учет результатов реакции РПГА при гепатите В (демонстрация).
- 3.Разбор постановки и учет результатов РТГА и ИФА для серодиагностики при клещевом энцефалите и арбовирусных инфекций (демонстрация).

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Гепатит В — вирусное заболевание, возбудителем которого является вирус гепатита В (в специальной литературе его могут обозначать «вирус ГВ», ВГВ или HBV) из семейства гепаднавирусов.

Вирус отличается чрезвычайно высокой устойчивостью к различным физическим и химическим факторам: низким и высоким температурам (в том числе кипячению), многократному замораживанию и оттаиванию, длительному воздействию кислой среды. Во внешней среде при комнатной температуре вирус гепатита В может сохраняться до нескольких недель: даже в засохшем и незаметном пятне крови, на лезвии бритвы, конце иглы. В сыворотке крови при температуре +30°C инфекционность вируса сохраняется в течение 6 месяцев, при -20°C около 15 лет. Инактивируется при автоклавировании в течение 30 минут, стерилизации сухим жаром при температуре 160°C в течение 60 минут, прогревании при 60°C в течение 10 часов.

Механизм передачи инфекции — парентеральный. Заражение происходит естественным (половой, вертикальный, бытовой) и искусственным (парентеральным) путями. Вирус присутствует в крови и различных биологических жидкостях — слюне, моче, сперме, влагалищном секрете, менструальной крови и др. Контагиозность (заразность) вируса гепатита В превышает контагиозность ВИЧ в 100 раз.

Наибольшее значение раньше повсеместно имел именно парентеральный путь — заражение при лечебно-диагностических манипуляциях, сопровождающихся нарушением

целостности кожного или слизистого покрова через медицинский, стоматологический, маникюрный и прочий инструментарий, трансфузии крови и её препаратов.

Патогенез. Самый значимый патогенетический фактор при вирусном гепатите В — гибель зараженных гепатоцитов вследствие атаки собственными иммунными агентами. Массивная гибель гепатоцитов приводит к нарушению функций печени, прежде всего детоксикационной, в меньшей степени — синтетической.

Инкубационный период (время с момента заражения до появления симптомов) гепатита В составляет в среднем 12 недель, но может колебаться в пределах от 2 до 6 месяцев. Инфекционный процесс начинается с момента попадания вируса в кровь. После попадания вирусов в печень через кровь идет скрытая фаза размножения и накопления вирусных частиц. При достижении определенной концентрации вируса в печени развивается острый гепатит В. Иногда острый гепатит проходит для человека практически незаметно, и обнаруживается случайно, иногда протекает в легкой безжелтушной форме — проявляется только недомоганием и снижением работоспособности. Некоторые исследователи полагают, что бессимптомное течение, безжелтушная форма и «желтушный» гепатит составляют равные по количеству пораженных лиц группы. То есть выявленные диагностированные случаи острого гепатита В составляют только одну треть всех случаев острого гепатита.

Вакцинация. Обязательная вакцинация. С недавнего времени вакцинация против гепатита В была включена в обязательный календарь прививок. Новорожденные наиболее чувствительны к вирусу гепатита В — в случае инфицирования в этом возрасте, риск приобретения хронической формы гепатита В составляет 100%. В то же время иммунитет, создаваемый вакциной в этот период жизни, наиболее стойкий. Рекомендовано прививать новорожденного еще в родильном доме, затем через 1 месяц после первой прививки, и через 6 месяцев после первой прививки (так называемая схема 0-1-6). При пропуске очередной инъекции следует помнить о допустимых интервалах - 0-1(4)-6(4-18) месяцев. Однако если были пропущены допустимые интервалы, необходимо продолжать вакцинацию по схеме, как если бы пропуска не было. Если вакцинация проведена по стандартной схеме, повторная вакцинация обычно не требуется, поскольку иммунитет сохраняется по меньшей мере в течение 15 лет. Для определения, насколько долго сохраняется иммунитет в течение жизни, необходимы дальнейшие исследования — ведь вакцинация начала применяться относительно недавно. Только после проведения всего курса вакцинации, достигается почти 100%-ый иммунитет. Около 5% общей популяции не отвечает на вакцинацию, в этих случаях следует использовать другие виды вакцин против гепатита В.

Лабораторная диагностика ГВ - основана на выявлении специфических для ГВ антигенов и соответствующих антител в крови, а также вирусных нуклеиновых кислот, основными из которых являются:

HB sAg - анти-HB s
анти-HBc класса Ig M и IgG
HBe Ag - анти-HBe
ДНК ВГВ

Наиболее широко в диагностике ГВ используется определение HBsAg. Данный антиген выявляется как при остром, так и при хроническом заболевании (однако острая инфекция обычно подтверждается наличием высоких титров анти-HBc IgM). При остром ГВ поверхностный антиген вируса обнаруживается через 3-5 недель от момента инфицирования, то есть задолго до появления клинических признаков болезни и в этих случаях является единственным серологическим маркером. HBsAg постоянно выявляется в преджелтушном и желтушном периодах болезни. Персистирование HBsAg в течение 6 месяцев и более указывает на затяжное или хроническое течение болезни, и позволяет предположить хроническое носительство вируса. Элиминация HBsAg и появление антител к нему является непрямым условием выздоровления. Серологическими

маркерами репликации ВГВ являются - анти-НВс класса IgM, НВсAg, ДНК и ДНК-полимераза, которые обнаруживаются при остром ГВ с первых дней клинических проявлений и могут обнаруживаться при обострении хронического ГВ. Серологические маркеры репликации ВГВ определяют как в целях общей диагностики, так и для оценки эффективности применяемой терапии.

Вирус гепатита Д (НДV) впервые был обнаружен в 1977 году. Он не принадлежит ни к одному из известных семейств вирусов. НДV представляет собой сферическую частицу, в центре которой находится сферический антиген (НД-Ag), содержащий РНК. Наружная оболочка частицы образована поверхностным антигеном вируса гепатита В - НВс антигеном (НВсAg). НДV не может существовать без репликации НВ-вируса, поэтому его называют вирусом - паразитом, или дефектным вирусом. Вирус гепатита В выполняет при этом хелперную функцию, то есть роль помощника для размножения НДV. Поэтому НДV - инфекция протекает всегда вместе с НВV-инфекцией. НДV располагается в основном в ядрах гепатоцитов и изредка в цитоплазме.

Эпидемиология. НДV-инфекция широко распространена. Интенсивность циркуляции НДV в различных регионах мира значительно колеблется, но в целом повторяет ситуацию при ВГВ, хотя и не абсолютно точно. При острых гепатитах антитела к НДV выделяются в различных регионах у 2-7 % больных, а при хронических гепатитах - у 9-50 % больных. На территории бывшего СССР среди "здоровых" носителей НВсAg наибольшая частота (10-20 %) обнаружения антител к НДV выявлена в Молдове, Казахстане, Средней Азии, Туве, то есть в районах, гиперэндемичных по ВГВ. В европейской части России частота выявления антител к НДV составляет 1,2-5,5 %.

Источником инфекции являются больные острым и хроническим ВГД, вирусоносители, а также носители антиНДV, так как известно, что у лиц с антиНДV одновременно можно обнаружить РНК-НДV. Передача НДV происходит так же, как и при ВГВ (парентеральным, половым путем, от матери плоду). К дельта-инфекции восприимчивы лица, не болевшие ВГВ (то есть не имеющие антиНВс), а также носители НВ-вируса (здоровые носители НВсAg и больные хроническим ВГВ). Дельта-инфекция возникает как спорадически, так и в виде вспышек.

Патогенез, клиника. Инфекционный процесс, обусловленный НДV, проявляется прежде всего появлением НД-Ag в крови. Дельта-антигемия может быть кратковременной или продолжительной в зависимости от того, как происходило инфицирование и имеется ли интегрирование НВ-вируса в геном гепатоцита. Различают острое, затяжное и хроническое течение дельта-инфекции. Характер ее течения лимитируется продолжительностью НВс-антигемии: по мере ее истощения прекращается и синтез НДV, и завершается дельта-зависимый патологический процесс.

Дельта-инфекция развивается в виде коинфекции или суперинфекции. При коинфекции происходит одновременное заражение НВV + НДV у лиц, не болевших ранее НВV-инфекцией (не имеющих до инфицирования маркеров НВV-инфекции). В этом случае развивается острый ВГВ+ВГД-гепатит с появлением серологических маркеров сразу двух острых инфекций. При коинфекции репликация НВV чаще всего ВГВ+ВГД-гепатита обычно бывает острым и заканчивается выздоровлением.

При суперинфекции НДV-инфекция наслаивается на текущую НВV-инфекцию у здоровых носителей НВсAg, у реконвалесцентов основного ВГВ, у больных хроническим ВГВ. При этом развивается клиника острого вирусного гепатита дельта, сопровождающегося появлением антител к дельта-антигену.

Лабораторная диагностика гепатита Д (ГД) Вирус гепатита Д (ВГД) – это дефектный вирус, содержащий одно-спиральную РНК, которому для репликации необходимо помощь вируса ГВ для синтеза оболочечных белков, состоящих из НВсAg, который используется для инкапсуляции генома ВГД. ВГД не принадлежит ни к одному из известных семейств вирусов животных, по своим свойствам ВГД наиболее близок к вироидам и сателлитным вирусам растений. Лабораторная диагностика осуществляется

путем обнаружения серологических маркеров ВГД, включая наличие антигена, антител к нему и РНК ВГД. Обнаружение антигена ВГД и РНК ВГД в сыворотке крови или ткани печени свидетельствует о наличии активной ГД-инфекции, однако, следует отметить, что эти маркеры могут не обнаруживаться в сыворотке больных фульминантным ГД. Маркером активной репликации ВГД также является анти-ВГД класса IgM. Серологические маркеры инфекции ГД зависят от того, как был приобретен вирус – в виде коинфекции с ВГВ (у большинства больных заболевание имеет острое течение и заканчивается выздоровлением) или суперинфекции у больных с хронической ГВ-инфекцией (протекает тяжелее, чем коинфекция - в 10% развивается фульминантный гепатит). При суперинфекции у больных с хронической ГВ-инфекцией серологическая картина имеет следующие характерные особенности: – титр HBsAg снижается к моменту появления антигена ВГД в сыворотке; - антиген ВГД и РНК-ВГД продолжают определяться в сыворотке, так как обычно у большинства пациентов с суперинфекцией ГД (70-80%) развивается хроническая инфекция, в отличие от случаев коинфекции; - определяются высокие титры антител (анти-ВГД) как класса IgM, так и IgG, которые сохраняются неопределенное время. Серологические маркеры вируса ГД определяют методом иммуноферментного и радиоиммунного анализа, а РНК-ВГД - методом полимеразной цепной реакции.

Гепатит С — антропонозное вирусное заболевание с парентеральным механизмом заражения, наиболее часто протекающее в виде посттрансфузионного гепатита с преобладанием безжелтушных и склонное к хронизации.

Гепатит С называют «ласковым убийцей» из-за способности маскировать истинную причину под видом множества других заболеваний.

Парентеральный вирусный гепатит С вызывается РНК-содержащим вирусом с размером вириона 30-60 нм, относящимся к семейству Flaviviridae. Вирусные частицы HCV имеют оболочку, содержатся в крови в следовых количествах и ассоциированы с липопротеинами низкой плотности и антителами к белкам вируса гепатита С. Вирусы, выделенные из комплексов с липопротеинами и анти-HCV антителами, имеют диаметр 60-70 нм. При электронно-микроскопическом изучении на поверхности вириона выявлены хорошо выраженные выступы высотой 6-8 нм.

Источником инфекции являются больные с активным гепатитом С и латентные больные — носители вируса. HCV-инфекция является инфекцией с парентеральным механизмом заражения — через инфицированную кровь и её компоненты. Инфицирование возможно при парентеральных манипуляциях, в том числе в медицинских учреждениях, включая оказание стоматологических услуг, через инъекционное оборудование, при акупунктуре, пирсинге, нанесении татуировок, при оказании ряда услуг в парикмахерских, однако при половых контактах вероятность заболеть гепатитом С гораздо меньше, чем гепатитом В, и сводится к минимальным показателям.

Лабораторная диагностика гепатита С (ГС). Лабораторная диагностика ГС была решена при помощи современных методов молекулярной биологии, учитывая, что при ГС вирус находится в крайне низкой концентрации и его антигены не доступны выявлению с помощью современных методов индикации, усилия исследователей сосредоточены на выявлении антител к различным антигенным компонентам вируса, обнаружение которых может служить индикатором наличия вируса. В качестве антигенов использовали белки, кодированные структурной и неструктурной зоной РНК-ВГС, полученные при помощи рекомбинантной технологии или синтеза (полипептиды, используемые в современных иммунологических методах – С22-3; С33с, С100-3, С200, NS5, S-1-1). Лабораторная диагностика ГС основывается на обнаружении серологических маркеров ВГС: антител к вирусу ГС (анти-ВГС, анти-ВГС класса IgM, IgG) методом ИФА и РНК-ВГС методом ПЦР. К настоящему времени разработаны 4 поколения тест-систем для выявления анти-ВГС в иммуноферментном методе, но ИФА первого поколения сейчас не используется из-

за низкой чувствительности. РНК-ВГС является показателем активной репликации ВГС и самым ранним маркером инфекции, и может быть обнаружена методом полимеразной цепной реакции уже через 1- 2 недели после инфицирования, незадолго до повышения уровня сывороточных трансаминаз. Анти-ВГС обнаруживаются к 5-6 неделе после начала гепатита в 80% случаев и к 12 неделе у 90% лиц методом иммуноферментного анализа. При определении анти-ВГС в некоторых случаях регистрируется ложноположительная реакция. Для разграничения ложноположительных образцов от образцов действительно содержащих антитела к ВГС, разработаны дополнительные тесты – рекомбинантный иммуноблотинг, определение спектра белков анти-ВГС.

ВИЧ — вирус иммунодефицита человека, вызывающий заболевание — ВИЧ-инфекцию, последняя стадия которой известна как синдром приобретённого иммунодефицита (СПИД) — в отличие от врождённого иммунодефицита.

Распространение ВИЧ-инфекции связано, главным образом, с незащищенными половыми контактами, использованием зараженных вирусом шприцев, игл и других медицинских и парамедицинских инструментов, передачей вируса от инфицированной матери ребенку во время родов или при грудном вскармливании. В развитых странах обязательная проверка донорской крови в значительной степени сократила возможность передачи вируса при её использовании.

ВИЧ заражает прежде всего клетки иммунной системы (CD4+ Т-лимфоциты, макрофаги и дендритные клетки), а также некоторые другие типы клеток. Инфицированные ВИЧ CD4+ Т-лимфоциты постепенно гибнут.

Вирус иммунодефицита человека относят к семейству ретровирусов (Retroviridae), роду лентивирусов (Lentivirus). Название Lentivirus происходит от латинского слова lente — медленный. Такое название отражает одну из особенностей вирусов этой группы, а именно — медленную и неодинаковую скорость развития инфекционного процесса в макроорганизме. Для лентивирусов также характерен длительный инкубационный период.

Диагностика. Течение ВИЧ-инфекции характеризуется длительным отсутствием существенных симптомов болезни. Диагноз ВИЧ-инфекции ставится на основании лабораторных данных: при выявлении в крови антител к ВИЧ. Антитела к ВИЧ в период острой фазы, как правило, не обнаруживают. В первые 3 мес. после заражения антитела к ВИЧ выявляются у 96-97 % пациентов, через 6 мес. — у остальных 2-3 %, а в более поздние сроки — только у 0,5-1 % (источник Centers for Disease Control and Prevention USA, 2009г). В стадии СПИД регистрируют существенное снижение содержания антител в крови. Первые недели после инфицирования представляют собой «период серонегативного окна», когда антитела к ВИЧ не выявляются. Поэтому отрицательный результат тестирования на ВИЧ в этот период не означает, что человек не инфицирован ВИЧ и не может заразить других.

Для диагностики поражения слизистой оболочки рта у ВИЧ-инфицированных больных принята рабочая классификация, утверждённая в Лондоне, в сентябре 1992 года. Все поражения разделены на 3 группы:

1 группа — поражения, чётко связанные с ВИЧ-инфекцией. В эту группу включены следующие нозологические формы:

- кандидозы (эритематозный, псевдомембранозный, гиперпластический, атрофический);
- волосистая лейкоплакия;
- маргинальный гингивит;
- язвенно-некротический гингивит;
- деструктивный пародонтит;
- саркома Капоши;
- неходжкинская лимфома.

2 группа — поражения, менее чётко связанные с ВИЧ-инфекцией:

- бактериальные инфекции;
- болезни слюнных желёз;

вирусные инфекции;
тромбоцитопеническая пурпура.

3 группа — поражения, которые могут быть при ВИЧ-инфекции, но не связанные с нею.

Клещевой энцефалит — природно-очаговая вирусная инфекция, характеризующаяся лихорадкой, интоксикацией и поражением серого вещества головного (энцефалит) и/или оболочек головного и спинного мозга (менингит и менингоэнцефалит). Заболевание может привести к стойким неврологическим и психиатрическим осложнениям и даже к смерти больного.

Вирус клещевого энцефалита — нейротропный, РНК-содержащий. Относится к роду *Flavivirus*. Входит в семейство тогавирусов экологической группы арбовирусов. Возбудитель способен длительно сохранять вирулентные свойства при низких температурах, но нестойк к высоким температурам (при кипячении погибает через 2-3 мин), дезинфицирующим средствам и ультрафиолетовому излучению. Основным резервуаром, поддерживающим существование возбудителя являются: иксодовые клещи — *Ixodes persulcatus* (преимущественно в азиатском регионе России) и *Ixodes ricinus* (преимущественно в европейском регионе). Традиционные районы распространения клещевого энцефалита — Сибирь, Урал, Дальний Восток. В то же время случаи заражения встречаются и в средней полосе России, Северо — Западном регионе, Поволжье. Естественным резервуаром вируса и его источником являются более 130 видов различных теплокровных диких и домашних животных и птиц: грызуны, зайцы, насекомоядные, хищники и копытные. Клещи заражаются от животных-носителей вируса и передают вирус человеку.

Для заболевания характерна строгая весенне-летняя сезонность заболевания, соответствующая активности клещей.

Пути передачи: трансмиссивный (присасывание клеща), редко — алиментарный (употребление в пищу сырого молока коз и коров).

Человек заражается при укусе инфицированных клещей. Первичная репродукция вируса происходит в макрофагах и гистиоцитах, на этих клетках происходит адсорбция вируса, рецепторный эндоцитоз, «раздевание» РНК. Затем в клетке начинается репликация РНК и белков капсида, формируется зрелый вирион. Путем почкования через модифицированные мембраны эндоплазматического ретикулума вирионы собираются в везикулы, которые транспортируются к наружной клеточной мембране и покидают клетку. Наступает период вирусемии, вторичная репродукция происходит в регионарных лимфоузлах, в клетках печени, селезенки и эндотелия сосудов, затем вирус попадает в двигательные нейроны передних рогов шейного отдела спинного мозга, клетки мозжечка и мягкой мозговой оболочки.

Серологический метод. Материалом являются парные сыворотки больного. Определение диагностического нарастания титра антител в реакциях РТГА (реакция торможения гемагглютинации) и ИФА (иммуноферментный анализ).

Молекулярно-биологический метод. Материалом является клещ. Клеща исследуют на наличие антигена вируса клещевого энцефалита, реже с помощью ПЦР (полимеразно-цепная реакция) выявляют вирусную РНК (клеща). Для исследований на наличие антигена используют живой материал, ПЦР диагностика возможна по фрагментам клеща.

Вирусологический метод. Выделение вируса из крови и спинно-мозговой жидкости путем введения материала в мозг новорожденным белым мышам.

Арбовирусы (от англ. arthropod-borne viruses) — группа вирусов, переносчиками которых являются членистоногие. Арбовирусы имеют одноцепочечную геномную РНК, двуцепочечную РНК (реовирусы) или двуцепочечную ДНК (в случае Asfarvirus) и могут передаваться от животных человеку через насекомых и вызывать развитие таких заболеваний, как энцефалит, лихорадка Денге, лихорадка паппатачи и жёлтая лихорадка.

Арбовирусы широко распространены на земном шаре, встречаясь, однако, преимущественно в жарких странах.

Размеры их варьируют от 30—40 до 150—180 мкм. Большинство изученных арбовирусов — сферической формы и построены по кубическому типу симметрии; некоторые (с винтовым типом симметрии) имеют форму палочки с одним концом закругленным, а другим плоским.

Арбовирусы разрушаются под действием эфира, хлороформа и дезоксихолата. При t° 56—60° инаktivация происходит в течение 10—30 мин. Погибают при рН = 3,0. Протеолитические ферменты разрушают вирусы группы Б и совершенно не оказывают влияния на группу А.

Все арбовирусы патогенны для новорожденных мышей при заражении в мозг; многие из них патогенны для различных животных при разных путях введения. Патогенность для человека установлена уже более чем у 50 арбовирусов.

Размножаются в куриных эмбрионах, причем вирусы группы А часто вызывают их быструю гибель в течение 24—48 час. Культуры тканей многих видов животных, человека, птиц, комаров и клещей, а также культуры перевиваемых клеток способны поддерживать размножение арбовирусов *in vitro*; цитопатический эффект зависит от вида вируса и ткани; наиболее употребительны первичные культуры куриных фибробластов, почек хомячка и перевиваемые клетки HeLa. Подавляющее большинство арбовирусов обладает гемагглютинирующими свойствами. Гемагглютинины, устойчивые в щелочной среде (рН=8,0—9,0) и быстро погибающие в кислой (рН=6,0), выявляются в мозге, сыворотке крови зараженных мышей и в жидкой фазе тканевых культур после удаления ингибиторов. Для гемагглютинации используют 0,25% взвесь эритроцитов гусей или новорожденных цыплят. Гемагглютинация протекает в узкой, оптимальной для каждого вируса зоне рН. Лабораторная диагностика осуществляется выделением вирусов на 1—2-дневных мышках и тканевых культурах. Серологическая диагностика осуществляется при помощи РСК, реакций торможения гемагглютинации и нейтрализации с сыворотками реконвалесцентов.

Основанием для включения в группу арбовирусов новых членов служат: чувствительность к дезоксихолату, способность размножаться в комарах *Aedes aegypti* или наличие перекрестных серологических реакций с каким-нибудь представителем арбовирусов.

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СЕВЕРО-ОСЕТИНСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

КАФЕДРА МИКРОБИОЛОГИИ

МИКРОБИОЛОГИЯ

**Учебно-методическое пособие для преподавателей по специальности: «Социальная
гигиена и организация госсанэпидслужбы» (ординатура)**

ВЛАДИКАВКАЗ

Занятие №1

ТЕМА: БАКТЕРИЙ- ВОЗБУДИТЕЛИ КОНТАКТНЫХ ИНФЕКЦИЙ

(условно-патогенные бактерий:- возбудители гнойно-воспалительных инфекций: стафилококки, стрептококки, синегнойная палочка, неспорообразующие анаэробы, протей, клебсиеллы, эшерихии).

Учебная цель:

1. Обучить ординаторов методам микробиологической диагностики и специфической профилактики гнойно- воспалительных инфекций, вызываемых стафилококками, стрептококками, синегнойной палочкой, неспорообразующими анаэробами, протеем, клебсиеллами, эшерихиями.

ПЛАН:

6. Таксономия и основные биологические свойства возбудителей гнойно- воспалительных инфекций (стафилококки, стрептококки, синегнойная палочка, неспорообразующие анаэробы, протей, клебсиеллы, эшерихии).
7. Эпидемиология, патогенез, иммунитет вызываемых заболеваний.
8. Принципы микробиологической диагностики гнойно- воспалительных инфекций.
9. Препараты для этиотропной терапии и специфической профилактики гнойно-воспалительных инфекций.
10. Сдача модуля.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА

12. Приготовление мазка и гноя и окраска по Граму.
13. Посев гноя на среды с глицерином, ЖСА, кровяной агар, Эндо.
14. Учет результатов посева на дифференциально-диагностические среды (демонстрация).
15. Учет посева стафилококка на кроличью плазму для выявления плазмокоагулазы (демонстрация).
16. Определение сине-зеленого пигмента на глицериновом агаре (демонстрация).
17. Определение лецитиназы стафилококка на ЖСА (демонстрация).
18. Определение гемолитической активности на кровяном агаре (демонстрация).
19. Определение лактозоположительных и лактозоотрицательных палочек на среде Эндо (демонстрация).
20. Посев исследуемого материала на сахарно-кровоной агар Цейслера с культивированием в анаэроостате. Учет результатов (демонстрация).
21. Проведение микроскопического исследования готовых мазков из культур неспорообразующих анаэробных микроорганизмов.
22. Оформление протоколов исследования.

ОСНАЩЕНИЕ

1. Набор для бактериологического исследования

Штатив – 8шт.
Пинцет -8 шт.
Бактериологическая петля -8 шт.
Флакон с физ.р-ром – 8шт.
Спиртовка -8 шт.
Лоток с подставкой-8шт.

2. Микроскопы – 8шт.

3. Иммерсионное масло.
4. Набор красок по Граму – 8 шт.
5. Пробирки с гноем – 8 шт..
6. Демонстрация: учет результатов посева на дифференциально-диагностические среды.
7. Демонстрация: учет посева стафилококка на кроличью плазму для выявления плазмокоагулазы.
8. Демонстрация: определение сине-зеленого пигмента на глицериновом агаре.
9. Демонстрация: определение лецитиназы стафилококка на ЖСА.
10. Демонстрация: определение гемолитической активности на кровяном агаре.
11. Демонстрация: определение лактозоположительных и лактозоотрицательных палочек на среде Эндо.
12. Демонстрация: учет результатов посева исследуемого материала на сахарно-кровяной агар Цейслера с культивированием в анаэроstate.
13. Демонстрация: проведение микроскопического исследования готовых мазков из культур неспорообразующих анаэробных микроорганизмов.
14. Бакпрепараты.
15. Таблицы.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Стафилококк (лат. *Staphylococcus*) — род бактерий семейства *Micrococcaceae*.

Представители данного рода — неподвижные грамположительные кокки, диаметр клетки которых составляет от 0,6 до 1,2 мкм. Для представителей рода характерно расположение микробных клеток «виноградными гроздьями» в чистой культуре. Стафилококки — факультативные анаэробы, при этом они не образуют спор или капсул. В состав этого рода входят патогенные и условно-патогенные для человека виды, колонизирующие носоглотку, ротоглотку и кожные покровы.

Патогенные стафилококки продуцируют эндо- и экзотоксины, ферменты, нарушающие жизнедеятельность клеток. Например, виды, обладающие способностью к синтезу эксфолиативного токсина, могут вызывать "синдром ошпаренной кожи", а гиалуронидаза "разрушает" соединительную ткань не позволяя организму локализовать очаг. Устойчивость стафилококков в окружающей среде высока: при $t^{\circ}60^{\circ}$ они погибают через 1 ч, в высушенном состоянии на перевязочном материале сохраняются до 6 мес; в экссудате - до 2.5-3.5 года. Им свойственна чрезвычайно высокая изменчивость в организме человека, широко распространенная резистентность к антибиотикам бета-лактамного ряда (пенициллин, метициллин), обусловленная наличием бета-лактамаз.

Существует стафилококковый бактериофаг, обладающий способностью специфически лизировать стафилококковые бактерии. Известна достаточно высокая чувствительность стафилококков к водным растворам солей серебра и его электролитическим растворам.

По степени и патогенности Х. Гросс разделил стафилококков следующим образом:
безусловно патогенные стафилококки, обладающие большой степенью летальности (гибели) для клеток крови;
условно патогенные стафилококки, способные вызвать незначительный воспалительный процесс в виде гиперемии (покраснения) и инфильтрации (уплотнения);
сапрофиты (обитатели поверхности кожи и внешней среды), практически не вызывающие поражений.

Данная классификация является относительной, ибо патогенные проявления стафилококков зависят не только от их биологических свойств, но и от состояния организма человека, его устойчивости и реактивности.

ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ОБНАРУЖЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ПАТОГЕННЫХ СТАФИЛОКОККОВ

Предварительная диагностика стафилококков может основываться на

бактериоскопическом изучении препаратов - мазков, окрашенных по Граму. Для точного установления патогенности обнаруженных стафилококков требуется выделить эти микроорганизмы в чистой культуре путем посева исследуемого материала на плотные питательные среды.

Гемолитическая способность определяется на чашках с кровяным агаром.

Если же проводится исследование гноя открытых ран или отделяемого язв или свищей, то следует пользоваться элективно-дифференциальной средой для стафилококков - желточно-солевым агаром (ЖСА) Г. Н. Чистовича. Элективность этой среды обеспечивается высоким содержанием хлористого натрия, а добавленный яичный желток позволяет выявлять лецитовителлазную активность, которая является одним из показателей патогенности стафилококков и в силу этого ЖСА более четко дифференцирует патогенных представителей, чем кровяной агар. Непосредственно при просмотре чашек вокруг колоний отмечается образование радужных венчиков и мутной зоны - лецитовителлазная реакция. Такие колонии, не менее двух из каждого посева, отвивают на скошенный мясо-пептонный агар для последующей проверки выросших культур в реакции плазмокоагуляции.

Коагулазная проба является основным признаком, определяющим болезнетворность стафилококков, поэтому ее постановка требует к себе максимального внимания. Для выявления коагулазной активности у стафилококков, выделенных от людей, можно пользоваться как цельной кровью, так и плазмой кроликов или человека. Можно использовать также кровь или плазму, взяв результаты проводится обязательно дважды: через 2-3 ч и 24 ч. Учитывают свертывание плазмы и образование сгустков. Обычно культуры, активно продуцирующие коагулазу, дают положительную реакцию уже через 2-3 ч. а если они обладают и выраженной фибринолитической активностью, то первоначально образовавшиеся сгустки могут подвергнуться расплавлению к концу суток. Слабокоагулирующие штаммы могут давать положительную реакцию в поздние сроки - к концу суток. Опыты, давшие сомнительный результат, необходимо повторить.

Стафилококки, дающие положительную коагулазную пробу, должны рассматриваться как потенциально патогенные, независимо от наличия или отсутствия у них гемолитических свойств и характера пигмента, их относят к виду *St. aureus* и в дальнейшем подвергают фаготипизации и проверке на чувствительность к антибиотикам. Углубленное изучение стафилококков показало, что основной признак патогенности - коагулазная реакция может подвергаться изменчивости при воздействии различных факторов, поэтому в ряде случаев, при выделении коагулазонегативных стафилококков в монокультуре из патологических очагов, целесообразно изучить у них другие признаки потенциальной болезнетворности и прежде всего - способность ферментировать маннит в анаэробных условиях.

Стрептококки - обнаружены Т. Бильротом в 1874 г. при рожистом воспалении и через несколько лет Л. Пастером при гнойных заболеваниях и сепсисе. Род *Streptococcus* включает многочисленные виды, которые различаются между собой по экологическим, физиологическим и биохимическим признакам, а также патогенности для человека.

Морфология, физиология. Клетки шаровидной или овальной формы, расположенные попарно или в виде цепочек разной длины. Грамположительны. Хемоорганотрофы. Требовательны к питательному субстрату. Размножаются на кровяных или сахарных средах. На поверхности твердых сред образуют мелкие колонии, на жидких дают придонный рост, оставляя среду прозрачной. По характеру роста на кровяном агаре различают α -гемолитические стрептококки, окруженные небольшой зоной гемолиза с зеленовато-сероватым оттенком, β -гемолитические, окруженные прозрачной зоной гемолиза, и негемолитические, не изменяющие кровяной агар. Однако гемолитический признак оказался весьма переменчивым, вследствие чего для дифференциально-диагностических целей используется с осторожностью. Ферментация углеводов не является стабильным и четким признаком, вследствие чего он не используется для

дифференцировки и идентификации стрептококков. Стрептококки аэробы, не образуют каталазы, в отличие от стафилококков.

Антигены. Стрептококки имеют несколько типов антигенов, позволяющих дифференцировать их друг от друга. По Р. Лэндсфилд (1933 г), их подразделяют на 17 серогрупп по полисахаридным антигенам, которые обозначаются заглавными латинскими буквами А, В, С, D, Е, F и т.д. К самой многочисленной серогруппе А относится вид *S.pyogenes*. Дифференциация на серотипы проводится по белковому М-антигену. Сейчас насчитывается свыше 100 серотипов стрептококков серовара А.

У некоторых стрептококков этой серогруппы обнаружены перекрестнореагирующие антигены (ПРА). Антитела к ним реагируют с мышечными волокнами миокарда, тканью почки и других органов человека. ПРА могут стать причиной иммунопатологических состояний.

Экология и эпидемиология. Стрептококки сравнительно широко распространены в природе. По экологическому признаку их можно подразделить на несколько групп. К первой группе относят стрептококки серогруппы А, патогенные только для человека (*S.pyogenes*). Вторую группу составляют патогенные и условно-патогенные стрептококки серогруппы В и D (*S.agalactia*, *S.fascialis* и др.), патогенные для людей и животных. Третья экологическая группа - это условно-патогенные оральные стрептококки (*S.mutans*, *S.mitis* и др.). Таким образом, одни стрептококки вызывают только антропонозные инфекции, другие - антропозоонозные инфекции.

В организме человека стрептококки обитают в экологических нишах: полость рта, верхние дыхательные пути, кожа и кишечник. Источником инфекции являются здоровые бактерионосители, рековалесценты и больные люди. Основной путь распространения возбудителя - воздушно-капельный, реже контактный.

Во внешней среде стрептококки сохраняются в течение нескольких дней. При нагревании до 50°C они погибают через 10-30 мин.

Лабораторная диагностика. Материал для исследования: гной, слизь из зева и носа, моча и др. - подвергают бактериоскопическому исследованию. Для этого готовят мазки, которые окрашивают по Граму. Бактериологическое исследование проводят путем посева исследуемого материала на чашки Петри с кровяным агаром. Выросшие колонии характеризуют по наличию или отсутствию гемолиза. Заключительным этапом бактериологического исследования является идентификация выделенной культуры по антигенным свойствам в реакции преципитации с полисахаридным преципитиногеном, выделенным из исследуемой культуры, и антисыворотками к серотипам А, В, D. При подозрении на сепсис делают посевы крови.

Серологическое исследование проводят для подтверждения диагноза ревматизма. С этой целью определяют наличие антител к О-стрептолизину в РСК или реакции преципитации, а также С-реактивного белка. В последние годы для диагностики стрептококковых инфекций используют ПЦР.

Профилактика и лечение. Специфическая профилактика стрептококковых инфекций не разработана вследствие неэффективности полученных вакцин и эритрогенного анатоксина (против скарлатины). В настоящее время разрабатывается вакцина против кариеса. Лечение проводится главным образом антибиотиками. Резистентность стрептококков к различным антибиотикам, в том числе и к пенициллину, развивается медленно. Это дает возможность использовать многие бета-лактамы, в том числе бензилпенициллин. Из других антибиотиков применяют цефалоспорины 1 и 2 поколений, аминогликозиды, макролиды.

Синегнойная палочка -*Pseudomonas aeruginosa*— грамотрицательная подвижная (монотрих) палочковидная бактерия. Обитает в воде и почве, условно патогенна для человека, возбудитель нозокомиальных инфекций у человека.

Pseudomonas aeruginosa обнаруживается при абсцессах и гнойных ранах, ассоциирована с энтеритами и циститами. *P. aeruginosa* является одним из

распространённых возбудителей нозокомиальных инфекций ввиду того, что *P. aeruginosa* особенно легко поражает лиц с ослабленным иммунным статусом. Факторами патогенности *P. aeruginosa* является наличие подвижности, токсинообразование, продукция гидролитических ферментов. Прогноз ухудшается высокой резистентностью к действию антибиотиков. *P. aeruginosa* устойчива к действию многих беталактамов, аминогликозидов, фторированных хинолонов.

Симптомы. Синегнойная инфекция мочевыводящих путей, как правило, протекает хронически, длится месяцами, а иногда и годами, нарушая функцию почек. Часто инфекция протекает бессимптомно и выявляется при бактериоскопическом исследовании мочи лихорадящих больных, нуждающихся в частой и постоянной катетеризации мочевого пузыря. Иногда урогенитальная инфекция переходит в генерализованную форму с клиническими явлениями сепсиса.

Последствия.

Все вызванные синегнойной палочкой инфекции поддаются лечению и излечимы, за исключением, пожалуй, хронической легочной инфекции у больных муковисцидозом.

Лечение затруднительно ввиду высокой устойчивости к антибиотикам.

Обычно при инфекциях, вызванных синегнойной палочкой, назначают один или несколько антибактериальных препаратов, к которым чувствителен возбудитель.

В отношении синегнойной палочки активны аминогликозиды, некоторые цефалоспорины третьего и четвертого поколения, некоторые пенициллины широкого спектра действия, карбапенемы, монобактамы и фторхинолоны.

При различных инфекциях, вызванных синегнойной палочкой, наряду с антибактериальной терапией часто используют синегнойный бактериофаг, который представляет собой вирус, активный в отношении именно синегнойной палочки. Важным условием эффективной фаготерапии является предварительное определение фагочувствительности возбудителя.

Культуральная диагностика с последующей бактериоскопией не представляет трудностей, поскольку синегнойной палочки хорошо растёт на различных питательных средах. Культуральная диагностика («культура», «посев») – помещение взятого у больного материала на специальные питательные среды, состав которых подобран так, чтобы для выявляемого возбудителя создавались бы максимально благоприятные условия для развития и размножения. Появление специфических для возбудителя колоний (зон роста) свидетельствует о его присутствии в материале, взятом для исследования. Дополнительно «выращенных в культуре» возбудителей могут исследовать под микроскопом, оценивать на устойчивость к различным группам антибиотиков, «перевивать» на среды с другим составом для исследования ферментативных свойств и т.п.

С помощью серологической диагностики в относительно короткие сроки можно правильно поставить диагноз путём выявления как антигенов возбудителя инфекции, так и антител, вырабатываемые в ответ на антигенную стимуляцию иммунной системы. Антиген – вещество (обычно белковой природы), характерное и специфичное для выработавшего его организма. В чужеродном по составу антигенов организме стимулирует выработку иммунной системой последнего антител, направленных на изоляцию и уничтожение вышеупомянутых антигенов. Определение антигенов и антител широко используется в лабораторной диагностике различного рода инфекций. Выявление антигена какого-либо возбудителя подтверждает присутствие этого возбудителя в организме. Обнаружение антител свидетельствует о реакции организма на внедрение чужеродного агента. «Спектр» антител позволяет судить о стадии заболевания, а титр (количество) антител – с определёнными оговорками – о массивности инфекции.

Протей (лат. *proteus*) — род грамотрицательных, споронеобразующих, факультативно анаэробных бактерий. Представитель нормальной, условно-патогенной микрофлоры кишечника человека.

Протей в систематике бактерий

Род протей (*proteus*) входит в семейство энтеробактерии (*enterobacteriaceae*), порядок энтеробактерии (*enterobacteriales*), класс гамма-протеобактерии (γ *proteobacteria*), тип протеобактерии (*proteobacteria*), царство бактерии.

Род протей включает следующие виды: *proteus hauseri*, *proteus mirabilis*, *proteus murexofaciens*, *proteus penneri*, *proteus vulgaris*.

Протеи имеют вид мелких, 0,3 на 3 мкм, нитевидных палочек. Они отличаются очень активной подвижностью. Протеи обладают токсическими (вырабатывают эндотоксин) и гемолитическими свойствами.

Протеи считаются санитарно-показательными бактериями. Количество обнаруживаемых *proteus mirabilis* рассматривают как показатель фекального загрязнения, а *proteus vulgaris* — как показатель загрязнения объекта органическими веществами.

Три вида из рода протей — *proteus mirabilis*, *proteus vulgaris* и *proteus penneri* являются патогенными для человека, причем 75–90 % инфекций вызывает *proteus mirabilis*.

Наиболее часто острые кишечные инфекции, вызываемые протеом, встречаются у детей раннего возраста.

Бактерии рода протей являются возбудителями многих инфекций мочевыводящих путей и почек человека, при осложнениях калкулёзного пиелонефрита, врождённых пороках развития, после хирургических операций. *Proteus mirabilis* является причины раневых инфекций. *Proteus vulgaris* присутствует в кишечнике здорового человека и многих животных, он обнаруживается в навозе, почве и загрязнённых водах.

Антибиотики (из имеющих описание в данном справочнике), активные в отношении протей: рифаксимин, нифуроксазид. Антибактериальные средства (из имеющих описание в данном справочнике), активные в отношении *proteus mirabilis*: амоскициллин (за исключением индолположительных штаммов протей (*proteus vulgaris*), которые, наоборот, к амоксициллину устойчивы). Менее активен нифурател (только в отношении *proteus mirabilis* и *proteus vulgaris*). Большинство штаммов *proteus mirabilis*, в отличие от *proteus vulgaris*, чувствительны не только к ампициллину, но и к цефалоспорином. *Proteus mirabilis* и *proteus vulgaris* чувствительны к левофлоксацину и ципрофлоксацину. Протеи устойчивы к тетрациклину.

Лабораторная диагностика заболеваний, этиологически связанных с протейми, проводится бактериологическим методом. Выделенные чистые культуры идентифицируют по культуральным и биохимическим свойствам. Этиологическая роль устанавливается так же, как и всех других условно-патогенных микроорганизмов.

Клебсиелла (лат. **Klebsiella**) — род условно-патогенных бактерий, относящихся к семейству *Enterobacteriaceae*.

Представители рода встречаются в фекалиях человека, на коже и слизистых дыхательных путей, в почве, воде, фруктах и овощах. Благодаря капсуле устойчивы в окружающей среде.

Род состоит из 4 видов:

Klebsiella oxytoca,

Klebsiella planticola,

Klebsiella pneumoniae typus — Клебсиелла пневмонии, или Палочка Фридлендера,

Klebsiella terrigena.

Наиболее частыми возбудителями клебсиеллезов являются *Klebsiella pneumoniae* и *Klebsiella oxytoca*.

Бактерии этого рода вызывают пневмонию, урогенитальные инфекции, в том числе у новорожденных, у ослабленных и пожилых лиц, конъюнктивиты, менингиты, сепсис, острые кишечные инфекции.

Клебсиеллы — прямые грамтрицательные палочки (0,3–1,0 × 0,6–6,0 мкм), располагающиеся одиночно, парами или короткими цепочками. Образуют капсулы.

Неподвижны. Факультативные анаэробы. Факторы вирулентности: капсула, эндотоксин, маннозрезистентные пили.

Растут на простых питательных средах. Обладают выраженной биохимической активностью.

Лабораторная диагностика клебсиеллезов базируется на выделении чистой культуры возбудителя, дифференциации ее от других энтеробактерий и идентификации вида по морфологическим, культурным и биохимическим признакам, определении серовара. Серодиагностика проводится в РСК с О-антигеном клебсиелл.

Профилактика и лечение. Вакцинопрофилактика клебсиеллезов не разработана. Для лечения применяют антибиотики ампициллин, аминогликозиды, тетрациклины, левомицетин. За последние годы отмечается широкое распространение антибиотикорезистентных штаммов клебсиелл.

Эшерихии (лат. *escherichia*) — род грамотрицательных, споронеобразующих, факультативно анаэробных бактерий.

Род эшерихии (лат. *escherichia*) входит в семейство энтеробактерии (лат. *enterobacteriaceae*), порядок энтеробактерии (лат. *Enterobacteriales*).

Самым изученным видом эшерихий является *escherichia coli* (эшерихия коли), которая называется также кишечной палочкой, входящей в состав нормальной микрофлоры кишечника человека. В то же время разнообразные патогенные серотипы эшерихий коли могут быть причиной эшерихиозов — различных инфекционных заболеваний, протекающих с интоксикацией, лихорадкой, чаще с поражением желудочно-кишечного тракта, реже — мочевыводящих, желчевыводящих путей, других органов или с развитием сепсиса.

Лабораторная диагностика. Основным подходом является выделение чистой культуры на дифференциально — диагностических средах и ее идентификация по антигенным свойствам. Ставят РА с набором поливалентных ОК (к О- и К- антигенам) сывороток, затем — адсорбированных О- сывороток и прогретыми при 100 градусах Цельсия (для разрушения К- антигенов) культурами.

Неспорообразующие анаэробы.

Бактероиды (род *Bacteroides*)

Грамотрицательные палочки, неподвижны, спор не образуют, образуют капсулу. Типовой вид — *Bacteroides fragilis*. Бактерии группы *Bacteroides fragilis*.

Культивируются на анаэробном кровяном агаре; лучше растут на комплексных средах. Образуют белые, прозрачные S-формы колоний.

Протеолитическая активность умеренная, лецитиназу не образуют, не вызывают гемолиза эритроцитов, образует H₂S, образование кислоты при ферментации глк., лактозы, сахарозы.

Содержат соматический О-АГ, могут иметь Н- и К-АГ.

Факторы патогенности: образуют капсулу и продуцируют супероксиддисмутазу, эндотоксин, нейраминидаза.

Колонизируют слизистые полости рта, верхних дыхательных путей, гениталий и кишечника.

Порфиромонады (род *Porphyromonas*)

Короткие грамотрицательные палочки. Неподвижны, спор не образуют. Род представлен тремя видами: *P. asaccharolytica* (типовой вид), *P. gingivalis* и *P. endodontalis*.

На анаэробном кровяном агаре образуют слизистые черные колонии. Для роста нуждаются в гемине и менадионе.

Биохимическая активность очень низкая. Инертны по отношению к углеводам. Все виды образуют индол. *P. gingivalis* связывает и разрушает фибриноген, продуцирует коллагеназу, повреждающую дентин, а также агглютинирует эритроциты. Колонизируют слизистые полости рта и верхних дыхательных путей.

Превотеллы (род *Prevotella*)

Полиморфные неподвижные аспорогенные палочки. Типовой вид — *Prevotellamelaninogenica*.

На кровяном агаре образуют светло-коричневые/черные колонии.

Проявляют умеренную сахаролитическую активность. Основные продукты ферментации углеводов — сукцинаты и ацетаты.

Основной фактор патогенности — эндотоксин, фосфолипаза А, нарушающая целостность мембран эпителиальных клеток.

Колонизируют слизистые полости рта, верхних дыхательных путей, гениталий и кишечника.

Лептотрихии (под Leptotrichia)

Прямые неподвижные грамотрицательные палочки. Анаэробы. Для роста необходимо 5 % CO₂. Ферментируют глюкозу до кислоты без образования газа; главные продукты — молочная и уксусная кислоты; масляную кислоту не образуют. Не образуют сероводород и аммиак.

Экологическая ниша — ротовая полость человека.

Фузобактерии (под Fusobacterium)

Веретенообразные, неподвижные палочки. Облигатные анаэробы. На анаэробном кровяном агаре образуют мелкие выпуклые желтоватые колонии, окруженные зоной а-гемолиза. На жидких средах образуют осадок.

Биохимическая активность: утилизируют пептон и углеводы, ферментативная активность низкая.

Факторы патогенности: фосфолипаза А, облегчает инвазию бактерий в глубокие ткани, и лейкоцидин, который обладает цитотоксическим действием на различные клетки.

Колонизируют слизистые полости рта, верхних дыхательных путей, гениталий и кишечника.

ОБЩЕЕ:

Чувствительность к антимикробным препаратам. Резистентны к пенициллинам, цефалоспорином I и II поколений. Препараты выбора — левомецетин, метронидазол.

Иммунитет: нестойкий, непродолжительный.

Лечение: Химиопрепараты нитроимидазольного ряда: метронидазол, тинидазол, орнидазол, и антибиотик клиндамицин. Препараты резерва — производные нитрониазолов. Дренирование гнойников, удаление мертвых тканей, антибактериальная химиотерапия.

Профилактика: Специфическая — нет. Неспецифическая профилактика - назначение при операциях на органах брюшной полости и малого таза, метронидазола в/в, обработка ран и выявлении гнойно-воспалительных очагов.

Микробиологическая диагностика

Бактериологический. Серологический и бактериоскопический методы — ограниченное применение. Для экспресс-диагностики применяется ГЖХ (газожидкостная хроматография).

Бактериологическое исследование: Посев производят на кровяные среды, обогащенные факторами роста (гемин, менадион). Посевы инкубируют в анаэробных условиях. Для выявления в исследуемом материале темнопигментированных бактериоидов, превотелл, порфиромонад пробу исследуют в УФ лучах (микроколонии светятся красным светом).

На первом этапе идентификации определяют родовую принадлежность изолированных культур. На втором этапе проводят окончательную идентификацию до вида по биохимическим тестам, антигенным свойствам.

Газовая хроматография. Для экспресс-диагностики анаэробной инфекции применяют метод ГЖХ, основанный на хроматографическом определении в материале от больных специфических продуктов метаболизма облигатных анаэробных бактерий — летучих жирных кислот. Наличие жирных кислот - анаэробная этиология

воспалительного процесса. Маркеры: изомасляная и масляная, изовалериановая и валериановая, изокапроновая и капроновая. Аэробные бактерии летучие жирные кислоты не продуцируют.

Делай что должен, и будь что будет.

ХРОНОМЕТРАЖ

1. Определение исходного уровня знаний	80 мин.
2. Самостоятельная работа	90мин.
3. Проверка протоколов	45мин.
4. Уборка рабочего стола	45мин.
5. Контроль конечного уровня знаний и задание на дом.	55 мин.

Занятие №2

ТЕМА: ***МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ ВОДЫ, ВОЗДУХА, ПОЧВЫ.***

Учебная цель:

1.Обучить ординаторов методам микробиологического контроля воды, воздуха, почвы.

ПЛАН:

4. Методы микробиологического контроля воды.
5. Исследование общей микробной обсемененности дистиллированной воды.
6. Методы микробиологического контроля воздуха.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА

- 1.Проведение микробиологического исследования воздуха, аптечной посуды.
- 2.Разбор схемы микробиологического исследования воды.
- 3.Проведение микробиологического исследования дистиллированной воды.
- 4.Оформление протоколов исследования.

ОСНАЩЕНИЕ

1. Набор для бактериологического исследования:
Штатив – 8шт.
Пинцет -8 шт.
Бактериологическая петля -8 шт.
Флакон с физ.р-ром – 8шт.
Спиртовка -8 шт.
Лоток с подставкой- 8шт.
2. Пробирка с исследуемой водой.
3. Пробирки с 9 мл стерильной воды – 3 шт.
4. Стерильные чашки Петри – 3 шт.,
5. Пробирки с 10 мл МПА – 3 шт.

6. Водяная баня – 1 шт.
7. Демонстрация: чашки Петри со средой Эндо и фильтром с колониями кишечной палочки.
8. Чашки с МПА – 2 шт.
9. Аппарат Кротова.
10. Таблицы.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

3. Санитарно-бактериологическое исследование воды:

а) определить микробное число воды. Для определения исследуемую воду разводят в 10, 100, 1000 раз. В пробирку с 9 мл стерильной воды вносят 1 мл исследуемой воды (1:10), затем из разведения 1:10 переносят 1 мл в 9 мл стерильной воды (1:100) и так до разведения 1:1000. По 1 мл полученных разведений воды, начиная с большего, переносят в промаркированные стерильные чашки Петри и заливают каждую чашку 10 мл расплавленного и охлажденного до 45° МПА. Осторожно перемешивают, затем чашки с застывшим агаром переворачивают вверх дном и инкубируют сутки в термостате

Оснащение: пробирка с исследуемой водой, пробирки с 9 мл стерильной воды – 3 шт., стерильные чашки Петри – 3 шт., пробирки с 10 мл МПА – 3 шт.

б) изучить по демонстрации и отметить в таблице определение коли-титра бродильным методом

в) изучить по демонстрации и зарисовать определение коли-индекса методом мембранных фильтров.

Оснащение: чашки Петри со средой Эндо и фильтром с колониями кишечной палочки.

4. Санитарно-бактериологическое исследование воздуха

а) определить микробную обсемененность воздуха седиментационным методом

Для исследования воздуха чашки Петри с МПА открыть на 10 мин., затем инкубировать в термостате при 37°С.

б) определить

микробное число воздуха аспирационным методом. Чашки Петри с МПА поместить в аппарат Кротова. Отбор пробы проводить в течении 4 мин., при скорости просасывания воздуха 25 л/мин.

Оснащение: чашки с МПА – 2 шт., аппарат Кротова.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРОБНОГО ЧИСЛА ВОДЫ

Разведение воды	1:10	1:100	1:1000
Объем в мл	1	1	1
МПА в мл			
Результат			
Заключение			

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИ-ТИТРА ВОДЫ

Объем воды	10	1	1:10	1:100
1.ГПС (глюкозо-пептонная среда)	1 (конц)	10	10	10
Результат				
2.Высев из ГПС на				

среду Эндо секторами				
Учет результатов (микроскопия мазков, окраска по Граму)				
ЗАКЛЮЧЕНИЕ Коли-титр Коли-индекс				

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОБНОЙ ОБСЕМЕНЕННОСТИ ВОЗДУХА

	Место отбора	Экспозиция	Результат Число микробов в 1м ³
Метод седиментации (по Коху), посев на МПА			
Аспирационный метод (аппарат Кротова) посев на МПА			

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

3. Санитарно-бактериологическое исследование смывов с аптечной посуды

Приготовить смыв с аптечной посуды: налить во флакон 10 мл стерильного изотонического раствора хлорида натрия, тщательно встряхнуть, ополоснуть внутреннюю поверхность сосуда. Для обнаружения золотистого стафилококка смыв в количестве 3-4 капель засеять на чашки Петри с желчно-солевым агаром, чашку поставить в термостат.

4. *Исследование аптечного оборудования.* Посуду, пробки, прокладки, воронки, цилиндры исследуют в момент подготовки к разливу инъекционных растворов и глазных капель. Посуду отбирают в укупоренном виде, но без содержимого в количестве трёх штук одинаковой ёмкости; пробки и уплотнители по пять штук, помещая их в стерильную закупоривающуюся посуду. Исследование проводят путём споласкивания оборудования 10 мл стерильной водопроводной воды. В смывной жидкости определяют МАФАМ и БГКП. Бактерий группы МАФАМ не должно быть более 150 КОЕ в смывах с трех флаконов, пяти пробок и пяти прокладок. Присутствие БГКП не допускается.

Вода дистиллированная для приготовления ЛС, кроме инъекционных растворов и глазных капель. Пробы отбирают из бюретки, заполненной исследуемой водой; выводной конец которой предварительно обжигают ватно-спиртовым факелом. Пробы забирают в стерильные бутылки в объёме 300 мл. Если результаты оказываются неудовлетворительными, то пробы отбирают из приёмника дистиллятора. Определяют содержание МАФАМ, плесневых и дрожжевых грибов. Результаты оценивают по общему количеству микроорганизмов путём суммирования числа выросших колоний бактерий и грибов. Предельно допустимо содержание 10—15 КОЕ в 1 см³. Наличие бактерий группы БГКП в дистиллированной воде не допускается. МАФАМ – мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы. Количество МАФАМ можно рассматривать как общее микробное число, т.е. содержание всех микроорганизмов в исследуемом материале. Если контролировать этот показатель на всех этапах производства, то можно проследить насколько "чистое" сырьё поступает на производство, как меняется его "чистота" после обработки и не претерпевает ли продукт, на нашем примере это ЛС повторного загрязнения после термообработки и во время фасовки. Если в конечном продукте содержание МАФАМ превышает нормы, то это может в равной степени свидетельствовать как о нарушении санитарных условий на

производстве или нарушении технологии, так и о нарушении условий хранения и реализации продукта в аптечной сети.

ХРОНОМЕТРАЖ

- | | |
|---|---------|
| 1. Определение исходного уровня знаний | 90 мин. |
| 2. Самостоятельная работа | 130мин. |
| 3. Проверка протоколов | 45мин. |
| 4. Уборка рабочего стола | 45мин. |
| 5. Контроль конечного уровня знаний и задание на дом. | 50 мин. |

Занятие №3

ТЕМА: ВИРУСЫ–ВОЗБУДИТЕЛИ КРОВЯНЫХ ИНФЕКЦИЙ

(возбудители гепатитов В,С,Д,Г, ВИЧ- инфекции, возбудители клещевого энцефалита и других арбовирусных инфекций).

Учебная цель:

1. Обучить ординаторов методам вирусологической диагностики и специфической профилактики гепатитов В,С,Д,Г, ВИЧ- инфекции.
2. Обучить студентов методам вирусологической диагностики и специфической профилактики клещевого энцефалита и других арбовирусных инфекций.

ПЛАН:

6. Таксономия и основные биологические свойства возбудителей гепатитов В,С,Д,Г, ВИЧ- инфекции, клещевого энцефалита, арбовирусных инфекций.
7. Эпидемиология, патогенез, иммунитет вызываемых заболеваний.
8. Принципы микробиологической диагностики гепатитов В,С,Д,Г, ВИЧ- инфекции, клещевого энцефалита.
9. Препараты для этиотропной терапии и специфической профилактики гепатитов В,С,Д,Г,ВИЧ- инфекции, клещевого энцефалита.
10. Сдача модуля.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА

- 1.Разбор постановки и учет результатов реакции ИФА для серодиагностики и сероидентификации при гепатитах В,С,Д,Г, ВИЧ- инфекции (демонстрация).
- 2.Разбор постановки и учет результатов реакции РПГА при гепатите В (демонстрация).
- 3.Разбор постановки и учет результатов РТГА и ИФА для серодиагностики при клещевом энцефалите и арбовирусных инфекций (демонстрация).

ОСНАЩЕНИЕ

- 1.Демонстрация: учет результатов реакции ИФА для серодиагностики и сероидентификации при гепатитах В,С,Д,Г, ВИЧ- инфекции.
- 2.Демонстрация: учет результатов реакции РПГА при гепатите В.
- 3.Демонстрация: РТГА и ИФА для серодиагностики при клещевом энцефалите и арбовирусных инфекций.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Гепатит В — вирусное заболевание, возбудителем которого является вирус гепатита В

(в специальной литературе его могут обозначать «вирус ГВ», ВГВ или HBV) из семейства гепаднавирусов.

Вирус отличается чрезвычайно высокой устойчивостью к различным физическим и химическим факторам: низким и высоким температурам (в том числе кипячению), многократному замораживанию и оттаиванию, длительному воздействию кислой среды. Во внешней среде при комнатной температуре вирус гепатита В может сохраняться до нескольких недель: даже в засохшем и незаметном пятне крови, на лезвии бритвы, конце иглы. В сыворотке крови при температуре +30°C инфекционность вируса сохраняется в течение 6 месяцев, при -20°C около 15 лет. Инактивируется при автоклавировании в течение 30 минут, стерилизации сухим жаром при температуре 160°C в течение 60 минут, прогревании при 60°C в течение 10 часов.

Механизм передачи инфекции — парентеральный. Заражение происходит естественным (половой, вертикальный, бытовой) и искусственным (парентеральным) путями. Вирус присутствует в крови и различных биологических жидкостях — слюне, моче, сперме, влагалищном секрете, менструальной крови и др. Контагиозность (заразность) вируса гепатита В превышает контагиозность ВИЧ в 100 раз.

Наибольшее значение раньше повсеместно имел именно парентеральный путь — заражение при лечебно-диагностических манипуляциях, сопровождающихся нарушением целостности кожного или слизистого покрова через медицинский, стоматологический, маникюрный и прочий инструментарий, трансфузии крови и её препаратов.

Патогенез. Самый значимый патогенетический фактор при вирусном гепатите В — гибель зараженных гепатоцитов вследствие атаки собственными иммунными агентами. Массивная гибель гепатоцитов приводит к нарушению функций печени, прежде всего детоксикационной, в меньшей степени — синтетической.

Инкубационный период (время с момента заражения до появления симптомов) гепатита В составляет в среднем 12 недель, но может колебаться в пределах от 2 до 6 месяцев. Инфекционный процесс начинается с момента попадания вируса в кровь. После попадания вирусов в печень через кровь идет скрытая фаза размножения и накопления вирусных частиц. При достижении определенной концентрации вируса в печени развивается острый гепатит В. Иногда острый гепатит проходит для человека практически незаметно, и обнаруживается случайно, иногда протекает в легкой безжелтушной форме — проявляется только недомоганием и снижением работоспособности. Некоторые исследователи полагают, что бессимптомное течение, безжелтушная форма и «желтушный» гепатит составляют равные по количеству пораженных лиц группы. То есть выявленные диагностированные случаи острого гепатита В составляют только одну треть всех случаев острого гепатита.

Вакцинация. Обязательная вакцинация. С недавнего времени вакцинация против гепатита В была включена в обязательный календарь прививок. Новорожденные наиболее чувствительны к вирусу гепатита В – в случае инфицирования в этом возрасте, риск приобретения хронической формы гепатита В составляет 100%. В то же время иммунитет, создаваемый вакциной в этот период жизни, наиболее стойкий. Рекомендовано прививать новорожденного еще в родильном доме, затем через 1 месяц после первой прививки, и через 6 месяцев после первой прививки (так называемая схема 0-1-6). При пропуске очередной инъекции следует помнить о допустимых интервалах - 0-1(4)-6(4-18) месяцев. Однако если были пропущены допустимые интервалы, необходимо продолжать вакцинацию по схеме, как если бы пропуска не было. Если вакцинация проведена по стандартной схеме, повторная вакцинация обычно не требуется, поскольку иммунитет сохраняется по меньшей мере в течение 15 лет. Для определения, насколько долго сохраняется иммунитет в течение жизни, необходимы дальнейшие исследования – ведь вакцинация начала применяться относительно недавно. Только после проведения всего курса вакцинации, достигается почти 100%-ый иммунитет. Около 5% общей популяции не отвечает на вакцинацию, в этих случаях следует использовать другие виды вакцин против

гепатита В.

Лабораторная диагностика ГВ - основана на выявлении специфических для ГВ антигенов и соответствующих антител в крови, а также вирусных нуклеиновых кислот, основными из которых являются:

HB sAg - анти-HB s

анти-HBc класса Ig M и IgG

HBe Ag - анти-HBe

ДНК ВГВ

Наиболее широко в диагностике ГВ используется определение HBsAg. Данный антиген выявляется как при остром, так и при хроническом заболевании (однако острая инфекция обычно подтверждается наличием высоких титров анти-HBc IgM). При остром ГВ поверхностный антиген вируса обнаруживается через 3-5 недель от момента инфицирования, то есть задолго до появления клинических признаков болезни и в этих случаях является единственным серологическим маркером. HBsAg постоянно выявляется в преджелтушном и желтушном периодах болезни. Персистирование HBsAg в течение 6 месяцев и более указывает на затяжное или хроническое течение болезни, и позволяет предположить хроническое носительство вируса. Элиминация HBsAg и появление антител к нему является непрямым условием выздоровления. Серологическими маркерами репликации ВГВ являются - анти-HBc класса IgM, HBeAg, ДНК и ДНК-полимераза, которые обнаруживаются при остром ГВ с первых дней клинических проявлений и могут обнаруживаться при обострении хронического ГВ. Серологические маркеры репликации ВГВ определяют как в целях общей диагностики, так и для оценки эффективности применяемой терапии.

Вирус гепатита Д (HDV) впервые был обнаружен в 1977 году. Он не принадлежит ни к одному из известных семейств вирусов. HDV представляет собой сферическую частицу, в центре которой находится сферический антиген (HD-Ag), содержащий РНК. Наружная оболочка частицы образована поверхностным антигеном вируса гепатита В - HBsAg (HBsAg). HDV не может существовать без репликации HB-вируса, поэтому его называют вирусом - паразитом, или дефектным вирусом. Вирус гепатита В выполняет при этом хелперную функцию, то есть роль помощника для размножения HDV. Поэтому HDV - инфекция протекает всегда вместе с HBV-инфекцией. HDV располагается в основном в ядрах гепатоцитов и изредка в цитоплазме.

Эпидемиология. HDV-инфекция широко распространена. Интенсивность циркуляции HDV в различных регионах мира значительно колеблется, но в целом повторяет ситуацию при ВГВ, хотя и не абсолютно точно. При острых гепатитах антитела к HDV выделяются в различных регионах у 2-7 % больных, а при хронических гепатитах - у 9-50 % больных. На территории бывшего СССР среди "здоровых" носителей HBsAg наибольшая частота (10-20 %) обнаружения антител к HDV выявлена в Молдове, Казахстане, Средней Азии, Туве, то есть в районах, гиперэндемичных по ВГВ. В европейской части России частота выявления антител к HDV составляет 1,2-5,5 %.

Источником инфекции являются больные острым и хроническим ВГД, вирусоносители, а также носители антиHDV, так как известно, что у лиц с антиHDV одновременно можно обнаружить РНК- HDV. Передача HDV происходит так же, как и при ВГВ (парентеральным, половым путем, от матери плоду). К дельта-инфекции восприимчивы лица, не болевшие ВГВ (то есть не имеющие антиHBs), а также носители HB-вируса (здоровые носители HBsAg и больные хроническим ВГВ). Дельта-инфекция возникает как спорадически, так и в виде вспышек.

Патогенез, клиника. Инфекционный процесс, обусловленный HDV, проявляется прежде всего появлением HD-Ag в крови. Дельта-антигемия может быть кратковременной или продолжительной в зависимости от того, как происходило инфицирование и имеется ли интегрирование HB-вируса в геном гепатоцита. Различают острое, затяжное и хроническое течение дельта-инфекции. Характер ее течения

лимитируется продолжительностью HBs- антигенемии: по мере ее истощения прекращается и синтез HDV, и завершается дельта- зависимый патологический процесс.

Дельта- инфекция развивается в виде коинфекции или суперинфекции. При коинфекции происходит одновременное заражение HBV + HDV у лиц, не болевших ранее HBV - инфекцией (не имеющих до инфицирования маркеров HBV - инфекции). В этом случае развивается острый ВГВ+ВГД- гепатит с появлением серологических маркеров сразу двух острых инфекций. При коинфекции репликация HBV чаще всего ВГВ+ВГД - гепатита обычно бывает острым и заканчивается выздоровлением.

При суперинфекции HDV - инфекция наслаивается на текущую HBV- инфекцию у здоровых носителей HBsAg, у реконвалесцентов основного ВГВ, у больных хроническим ВГВ. При этом развивается клиника острого вирусного гепатита дельта, сопровождающегося появлением антител к дельта- антигену.

Лабораторная диагностика гепатита Д (ГД) Вирус гепатита Д (ВГД) – это дефектный вирус, содержащий одно-спиральную РНК, которому для репликации необходимо помощь вируса ГВ для синтеза оболочечных белков, состоящих из HBsAg, который используется для инкапсуляции генома ВГД. ВГД не принадлежит ни к одному из известных семейств вирусов животных, по своим свойствам ВГД наиболее близок к вироидам и сателлитным вирусам растений. Лабораторная диагностика осуществляется путем обнаружения серологических маркеров ВГД, включая наличие антигена, антител к нему и РНК ВГД. Обнаружение антигена ВГД и РНК ВГД в сыворотке крови или ткани печени свидетельствует о наличии активной ГД-инфекции, однако, следует отметить, что эти маркеры могут не обнаруживаться в сыворотке больных фульминантным ГД. Маркером активной репликации ВГД также является анти-ВГД класса IgM. Серологические маркеры инфекции ГД зависят от того, как был приобретен вирус – в виде коинфекции с ВГВ (у большинства больных заболевание имеет острое течение и заканчивается выздоровлением) или суперинфекции у больных с хронической ГВ-инфекцией (протекает тяжелее, чем коинфекция - в 10% развивается фульминантный гепатит). При суперинфекции у больных с хронической ГВ-инфекцией серологическая картина имеет следующие характерные особенности: – титр HBsAg снижается к моменту появления антигена ВГД в сыворотке; - антиген ВГД и РНК-ВГД продолжают определяться в сыворотке, так как обычно у большинства пациентов с суперинфекцией ГД (70-80%) развивается хроническая инфекция, в отличие от случаев коинфекции; - определяются высокие титры антител (анти-ВГД) как класса IgM, так и IgG, которые сохраняются неопределенное время. Серологические маркеры вируса ГД определяют методом иммуноферментного и радиоиммунного анализа, а РНК-ВГД - методом полимеразной цепной реакции.

Гепатит С — антропонозное вирусное заболевание с парентеральным механизмом заражения, наиболее часто протекающее в виде посттрансфузионного гепатита с преобладанием безжелтушных и склонное к хронизации.

Гепатит С называют «ласковым убийцей» из-за способности маскировать истинную причину под видом множества других заболеваний.

Парентеральный вирусный гепатит С вызывается РНК-содержащим вирусом с размером вириона 30-60 нм, относящимся к семейству Flaviviridae. Вирусные частицы HCV имеют оболочку, содержатся в крови в следовых количествах и ассоциированы с липопротеинами низкой плотности и антителами к белкам вируса гепатита С. Вирусы, выделенные из комплексов с липопротеинами и анти-HCV антителами, имеют диаметр 60-70 нм. При электронно-микроскопическом изучении на поверхности вириона выявлены хорошо выраженные выступы высотой 6-8 нм.

Источником инфекции являются больные с активным гепатитом С и латентные больные — носители вируса. HCV-инфекция является инфекцией с парентеральным механизмом заражения — через инфицированную кровь и её компоненты. Инфицирование возможно при парентеральных манипуляциях, в том числе в

медицинских учреждениях, включая оказание стоматологических услуг, через инъекционное оборудование, при акупунктуре, пирсинге, нанесении татуировок, при оказании ряда услуг в парикмахерских, однако при половых контактах вероятность заболеть гепатитом С гораздо меньше, чем гепатитом В, и сводится к минимальным показателям.

Лабораторная диагностика гепатита С (ГС). Лабораторная диагностика ГС была решена при помощи современных методов молекулярной биологии, учитывая, что при ГС вирус находится в крайне низкой концентрации и его антигены не доступны выявлению с помощью современных методов индикации, усилия исследователей сосредоточены на выявлении антител к различным антигенным компонентам вируса, обнаружение которых может служить индикатором наличия вируса. В качестве антигенов использовали белки, кодированные структурной и неструктурной зоной РНК-ВГС, полученные при помощи рекомбинантной технологии или синтеза (полипептиды, используемые в современных иммунологических методах – С22-3; С33с, С100-3, С200, NS5, S-1-1). Лабораторная диагностика ГС основывается на обнаружении серологических маркеров ВГС: антител к вирусу ГС (анти-ВГС, анти-ВГС класса IgM, IgG) методом ИФА и РНК-ВГС методом ПЦР. К настоящему времени разработаны 4 поколения тест-систем для выявления анти-ВГС в иммуноферментном методе, но ИФА первого поколения сейчас не используется из-за низкой чувствительности. РНК-ВГС является показателем активной репликации ВГС и самым ранним маркером инфекции, и может быть обнаружена методом полимеразной цепной реакции уже через 1- 2 недели после инфицирования, незадолго до повышения уровня сывороточных трансаминаз. Анти-ВГС обнаруживаются к 5-6 неделе после начала гепатита в 80% случаев и к 12 неделе у 90% лиц методом иммуноферментного анализа. При определении анти-ВГС в некоторых случаях регистрируется ложноположительная реакция. Для разграничения ложноположительных образцов от образцов действительно содержащих антитела к ВГС, разработаны дополнительные тесты – рекомбинантный иммуноблоттинг, определение спектра белков анти-ВГС.

ВИЧ — вирус иммунодефицита человека, вызывающий заболевание — ВИЧ-инфекцию, последняя стадия которой известна как синдром приобретённого иммунодефицита (СПИД) — в отличие от врождённого иммунодефицита.

Распространение ВИЧ-инфекции связано, главным образом, с незащищенными половыми контактами, использованием зараженных вирусом шприцев, игл и других медицинских и парамедицинских инструментов, передачей вируса от инфицированной матери ребенку во время родов или при грудном вскармливании. В развитых странах обязательная проверка донорской крови в значительной степени сократила возможность передачи вируса при её использовании.

ВИЧ заражает прежде всего клетки иммунной системы (CD4+ Т-лимфоциты, макрофаги и дендритные клетки), а также некоторые другие типы клеток. Инфицированные ВИЧ CD4+ Т-лимфоциты постепенно гибнут.

Вирус иммунодефицита человека относят к семейству ретровирусов (Retroviridae), роду лентивирусов (Lentivirus). Название Lentivirus происходит от латинского слова lente — медленный. Такое название отражает одну из особенностей вирусов этой группы, а именно — медленную и неодинаковую скорость развития инфекционного процесса в макроорганизме. Для лентивирусов также характерен длительный инкубационный период.

Диагностика. Течение ВИЧ-инфекции характеризуется длительным отсутствием существенных симптомов болезни. Диагноз ВИЧ-инфекции ставится на основании лабораторных данных: при выявлении в крови антител к ВИЧ. Антитела к ВИЧ в период острой фазы, как правило, не обнаруживают. В первые 3 мес. после заражения антитела к ВИЧ выявляются у 96-97 % пациентов, через 6 мес. — у остальных 2-3 %, а в более поздние сроки — только у 0,5-1 % (источник Centers for Disease Control and Prevention USA, 2009г). В стадии СПИД регистрируют существенное снижение содержания антител в крови. Первые недели после инфицирования представляют собой «период

серонегативного окна», когда антитела к ВИЧ не выявляются. Поэтому отрицательный результат тестирования на ВИЧ в этот период не означает, что человек не инфицирован ВИЧ и не может заразить других.

Клещевой энцефалит — природно-очаговая вирусная инфекция, характеризующаяся лихорадкой, интоксикацией и поражением серого вещества головного (энцефалит) и/или оболочек головного и спинного мозга (менингит и менингоэнцефалит). Заболевание может привести к стойким неврологическим и психиатрическим осложнениям и даже к смерти больного.

Вирус клещевого энцефалита — нейротропный, РНК-содержащий. Относится к роду Flavivirus. Входит в семейство тогавирусов экологической группы арбовирусов. Возбудитель способен длительно сохранять вирулентные свойства при низких температурах, но нестойк к высоким температурам (при кипячении погибает через 2-3 мин), дезинфицирующим средствам и ультрафиолетовому излучению. Основным резервуаром, поддерживающим существование возбудителя являются: иксодовые клещи — Ixodes persulcatus (преимущественно в азиатском регионе России) и Ixodes ricinus (преимущественно в европейском регионе). Традиционные районы распространения клещевого энцефалита — Сибирь, Урал, Дальний Восток. В то же время случаи заражения встречаются и в средней полосе России, Северо — Западном регионе, Поволжье. Естественным резервуаром вируса и его источником являются более 130 видов различных теплокровных диких и домашних животных и птиц: грызуны, зайцы, насекомоядные, хищники и копытные. Клещи заражаются от животных-носителей вируса и передают вирус человеку.

Для заболевания характерна строгая весенне-летняя сезонность заболевания, соответствующая активности клещей.

Пути передачи: трансмиссивный (присасывание клеща), редко — алиментарный (употребление в пищу сырого молока коз и коров).

Человек заражается при укусе инфицированных клещей. Первичная репродукция вируса происходит в макрофагах и гистиоцитах, на этих клетках происходит адсорбция вируса, рецепторный эндоцитоз, «раздевание» РНК. Затем в клетке начинается репликация РНК и белков капсида, формируется зрелый вирион. Путем почкования через модифицированные мембраны эндоплазматического ретикулума вирионы собираются в везикулы, которые транспортируются к наружной клеточной мембране и покидают клетку. Наступает период вирусемии, вторичная репродукция происходит в регионарных лимфоузлах, в клетках печени, селезенки и эндотелия сосудов, затем вирус попадает в двигательные нейроны передних рогов шейного отдела спинного мозга, клетки мозжечка и мягкой мозговой оболочки.

Серологический метод. Материалом являются парные сыворотки больного. Определение диагностического нарастания титра антител в реакциях РТГА (реакция торможения гемагглютинации) и ИФА (иммуноферментный анализ).

Молекулярно-биологический метод. Материалом является клещ. Клеща исследуют на наличие антигена вируса клещевого энцефалита, реже с помощью ПЦР (полимеразно-цепная реакция) выявляют вирусную РНК (клеща). Для исследований на наличие антигена используют живой материал, ПЦР диагностика возможна по фрагментам клеща.

Вирусологический метод. Выделение вируса из крови и спинно-мозговой жидкости путем введения материала в мозг новорожденным белым мышам.

Арбовирусы (от англ. arthropod-borne viruses) — группа вирусов, переносчиками которых являются членистоногие. Арбовирусы имеют одноцепочечную геномную РНК, двуцепочечную РНК (реовирусы) или двуцепочечную ДНК (в случае Asfarvirus) и могут передаваться от животных человеку через насекомых и вызывать развитие таких заболеваний, как энцефалит, лихорадка Денге, лихорадка паппатачи и жёлтая лихорадка.

Арбовирусы широко распространены на земном шаре, встречаясь, однако,

преимущественно в жарких странах.

Размеры их варьируют от 30—40 до 150—180 мкм. Большинство изученных арбовирусов — сферической формы и построены по кубическому типу симметрии; некоторые (с винтовым типом симметрии) имеют форму палочки с одним концом закругленным, а другим плоским.

Арбовирусы разрушаются под действием эфира, хлороформа и дезоксихолата. При t° 56—60° инаktivация происходит в течение 10—30 мин. Погибают при $pH = 3,0$. Протеолитические ферменты разрушают вирусы группы Б и совершенно не оказывают влияния на группу А.

Все арбовирусы патогенны для новорожденных мышей при заражении в мозг; многие из них патогенны для различных животных при разных путях введения. Патогенность для человека установлена уже более чем у 50 арбовирусов.

Размножаются в куриных эмбрионах, причем вирусы группы А часто вызывают их быструю гибель в течение 24—48 час. Культуры тканей многих видов животных, человека, птиц, комаров и клещей, а также культуры перевиваемых клеток способны поддерживать размножение арбовирусов *in vitro*; цитопатический эффект зависит от вида вируса и ткани; наиболее употребительны первичные культуры куриных фибробластов, почек хомячка и перевиваемые клетки HeLa. Подавляющее большинство арбовирусов обладает гемагглютинирующими свойствами. Гемагглютинины, устойчивые в щелочной среде ($pH=8,0—9,0$) и быстро погибающие в кислой ($pH=6,0$), выявляются в мозге, сыворотке крови зараженных мышей и в жидкой фазе тканевых культур после удаления ингибиторов. Для гемагглютинации используют 0,25% взвесь эритроцитов гусей или новорожденных цыплят. Гемагглютинация протекает в узкой, оптимальной для каждого вируса зоне pH . Лабораторная диагностика осуществляется выделением вирусов на 1—2-дневных мышках и тканевых культурах. Серологическая диагностика осуществляется при помощи РСК, реакций торможения гемагглютинации и нейтрализации с сыворотками реконвалесцентов.

Основанием для включения в группу арбовирусов новых членов служат: чувствительность к дезоксихолату, способность размножаться в комарах *Aedes aegypti* или наличие перекрестных серологических реакций с каким-нибудь представителем арбовирусов.

ХРОНОМЕТРАЖ

1. Определение исходного уровня знаний	80 мин.
2. Самостоятельная работа	90 мин.
3. Проверка протоколов	45 мин.
4. Уборка рабочего стола	45 мин.
5. Контроль конечного уровня знаний и задание на дом.	55 мин.